

# Diversidade Microbiana da Amazônia

Vol. 3

## ORGANIZADORES

LUIZ ANTONIO DE OLIVEIRA, JULIANA GOMES DE SOUZA OLIVEIRA,  
LUADIR GASPAROTTO, MARIA APARECIDA DE JESUS, LILIANE COELHO DA ROCHA,  
JANIA LILIA DA SILVA BENTES, LARISSA DE SOUZA KIRSCH, SUANNI LEMOS DE ANDRADE



**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

# Diversidade Microbiana da Amazônia

Vol. 3

**ORGANIZADORES**

LUIZ ANTONIO DE OLIVEIRA, JULIANA GOMES DE SOUZA OLIVEIRA,  
LUADIR GASPAROTTO, MARIA APARECIDA DE JESUS, LILIANE COELHO DA ROCHA,  
JANIA LILIA DA SILVA BENTES, LARISSA DE SOUZA KIRSCH, SUANNI LEMOS DE ANDRADE



Manaus  
2019

Copyright © 2019, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

**Capa**

Tito Fernandes e Rodrigo Verçosa

**Projeto gráfico e editoração eletrônica**

Rodrigo Verçosa

**EDITORA INPA**

**Editor-chefe**

Mario Cohn-Haft.

**Produção editorial**

Rodrigo Verçosa, Shirley Ribeiro Cavalcante, Tito Fernandes

**FICHA CATALOGRÁFICA**

---

D618 Diversidade microbiana da Amazônia / Organizador Luiz Antonio de Oliveira... [et.al].--

Manaus: Editora INPA, 2019.

35 mb, v. 3: il. color.

ISBN 978-65-5633-000-6

1. Microbiologia - Amazônia. 2. Diversidade. I. Oliveira, L. A.

CDD 576.9811



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

## AGRADECIMENTOS



Pelo apoio financeiro para a realização do evento.

## ORGANIZADORES



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
Fiocruz Rondônia



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
Fiocruz Amazônia



**ILMD** INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE  
Fiocruz Amazônia



MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



**PÁTRIA AMADA  
BRASIL**  
GOVERNO FEDERAL

## ORGANIZADORES DO LIVRO

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

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

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

Jania Lilia da Silva Bentes  
Universidade Federal do Amazonas  
jlbentes@ufam.edu.br

Larissa de Souza Kirsch  
Universidade do Estado do Amazonas  
lkirsch@uea.edu.br

Suanni Lemos de Andrade  
Universidade do Estado do Amazonas  
slandrade@uea.edu.br

## APRESENTAÇÃO

Ao divulgar o terceiro volume do livro Diversidade Microbiana da Amazônia, tendo como conteúdo, cerca de 65% dos trabalhos apresentados no 7º CDMicro – Congresso sobre Diversidade Microbiana da Amazônia - realizado no final de 2018 na cidade de Manaus, queremos agradecer aos participantes, todo o apoio dado ao nosso evento.

O CDMicro vem, ao longo desses anos, contribuindo para a divulgação e troca de informações sobre a microbiota, com ênfase à presente na Amazônia brasileira, e já se consolidou na região, servindo como referência para os alunos, professores e pesquisadores que trabalham com os microrganismos encontrados na natureza.

O livro é o coroamento do processo de divulgação da maior parte do conhecimento apresentado no congresso e fica à disposição a todos os interessados.

Esperamos com essa obra, estar contribuindo para que as informações sobre os microrganismos sejam mais intensamente compartilhadas entre todos aqueles que se dedicam a conhecê-los melhor.

A Comissão Organizadora

## SUMÁRIO

### Microbiologia de Alimentos

Produção e caracterização parcial de proteases de cogumelo comestível da Amazônia para aplicação industrial <i>Barbosa E.E.P., Gomes D.M.D., Figueiredo A.S., Teixeira M.F.S.</i>	01
Avaliação do teor de umidade e sua influência na viabilidade de microrganismos em diversos açúcares <i>Burton E.A., Espírito Santos M.C.E., Ramos S.N.M., Carmo E.J.</i>	06
Presença de coliformes em saladas cruas comercializadas em supermercados na cidade de Manaus-AM <i>Carvalho A.S.F., Klehm K.G., Souza E.O., Pereira K.D.E.S., Silva C.M.A.</i>	13
Produção de pigmentos do tipo azafilonas por <i>Penicillium sclerotiorum</i> <i>Guimarães D.R., Sousa T.F., Angolini C.F.F., Souza A.D.L., Silva F.M.A., Souza A.Q.L., Silva G.F., Koolen H.H.F.</i>	18
Influência do meio de cultura no crescimento e características de algumas bactérias capazes de degradarem a lactose e o glúten <i>Oliveira N.F., Miyamoto M.S.F., Minelli-Oliveira C., Oliveira L.A.</i>	24
Fungitoxicidade de óleos essenciais de <i>Piper</i> spp. sobre <i>Colletotrichum theobromicola</i> . <i>Oliveira S.S., Hanada R.E., Chaves F.C.M., Nascimento G.O., Assis L.A.G., Oliveira S.S., Oliveira M.R.</i>	29
Avaliação da qualidade microbiológica de leite cru produzido e comercializado no Estado do Amazonas <i>Pereira M.M., Azevedo P.C., Savi G.D., Souza A.Q.L., Perdigão L.M.R.</i>	34
Criação de uma micoteca de fungos endofíticos de frutas regionais com potencial antimalárico <i>Souza K.R., Alves B.G., Raposo D.S., Sousa T.F., Dantas P.H.S., Felix C.G.S., Kramer Y.V., Silva G.F., Koolen H.H.F.</i>	39
<i>Streptomyces</i> sp. isolados da Amazônia como agentes de biocontrole de fungos aflatoxigênicos <i>Sousa S.F., Liberal T.C.F., Sousa Júnior J.J.V., Santos B.V.L., Fabian M.Z., Santana R.C.F., Araújo J.M., Tsai S.M., Rabelo S.K.S.</i>	46
Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulase positiva em carne moída comercializada em Manaus, AM <i>Reis R.M., Pimentel E.T., Silva J.S., Oliveira B.C.R., Vasconcelos L.A.S., Santos F.F.</i>	50
Análise microbiológica de granola e sementes oleaginosas comercializadas em Manaus – Amazonas <i>Tinoco D.O., Mattos P.E., R.V., Espinoza C.M., Souza R.A.T., Cruz Filho R.F., Teixeira M.F.S., Martim S.R.</i>	55

### Microbiologia Ambiental

Colonização radicular por fungos micorrízicos arbusculares em frutíferas componentes de Sistemas Agroflorestais de duas propriedades rurais do Amazonas <i>Barbosa I.C.O.; Moreira F.W., Oliveira L.A.</i>	60
Aspectos nutricionais e ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares em frutíferas de propriedades rurais do Amazonas <i>Carvalho K.M., Moreira F.W., Oliveira L.A.</i>	65

Macrofungos (Basidiomycota) da Floresta Nacional do Tapajós, PA, Brasil <i>Couceiro D.M., Santana M.D.F., Couceiro S.R.M.</i>	70
Caracterização morfológica e avaliação da tolerância à acidez de rizóbios oriundos de solo ácidos <i>Hara F.A.S., Pereira Junior D.J.N., Alves K.B.</i>	78
Isolamento de fungos filamentosos endofíticos de <i>Panicum maximum</i> cv. Mombaça (capim-mombaça) <i>Coelho K.W.S.A., Costa Neto P.Q., Pereira J.O., Souza E.I.A., Seixas M.C.S., Pereira E.M.O., Souza L.S.A.</i>	83
Adubação potássica na incidência e na severidade da antracnose do camu-camu <i>Matos K.S., Carvalho L.B., Siqueira R.H.S., Uchôa S.C.P., Chagas E.A.</i>	88
Potencial antioxidante dos extratos de fungos endofíticos isolados de <i>Annona jahnii</i> (Annonaceae) <i>Sousa G.P., Sousa G.P., Flach A., Costa L.A.M.S., Souza A.Q.L., Odilair L.M.N., Lima D.F.</i>	94
Identificação de <i>Trichoderma</i> spp. isolados de ambientes tropicais através de análises morfológicas e moleculares <i>Fernandes K.R.P., Souza A.Q.L., Alencar L.F., Silva F.H., Evangelista D.E., Pereira J.O., Souza A.D.L.</i>	98
Macrofungos do gênero <i>Lentinus</i> Fr. e <i>Panus</i> Fr. (Polyporaceae Fr.) da Região Amazônica. <i>Gomes J.F., Jesus M.A.</i>	104
Efeito de doses de potássio na incidência e na severidade da antracnose da ata ( <i>Annona squamosa</i> ) <i>Matos K.S., Siqueira R.H.S., Montenegro R.A., Chagas E.A.</i>	111
Crescimento de fungos do gênero <i>Trichoderma</i> spp. em contato com gasolina <i>Menezes N.C., Costa G.S., Moreira F.W., Oliveira L.A.</i>	116
Perfil de resistência a antibióticos em isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. catalase positiva <i>Neves S.C.B., Fernandes G.S.T., Fernandes R.R.S., Ferreira A.K., Morais A.C.R., Frota J.K.C.</i>	120
Identificação do gênero <i>Candida</i> no tecido cutâneo de anfíbios em Santarém, Pará, Brasil <i>Peixoto A.S., Almeida R.S., Fernandes G.S.T., Kawashita-Ribeiro R.A., Canto E.S.M.</i>	126
Contribuição à taxonomia de <i>Phellinus gilvus</i> (Schwein.) Pat. (Hymenochaetaceae) da Região Amazônica <i>Rafaela Saraiva Peres R.S., Jesus M.A., Abreu R.L.S., Alves-Silva G.</i>	132
Vestígios de transmissão horizontal de bactérias cultiváveis em <i>Anopheles darlingi</i> Root, 1926 <i>Rocha E.M., Serrão D.M., Correa L.V., Katak R.M., Oliveira J.C., Muniz V.A., Ferreira F., Rocha Filho J.S., Pessoa M.C.F., Tadei W.P.</i>	136
Efeito antifúngico do extrato bruto dos resíduos madeireiros de <i>Hymenaea</i> sp. e <i>Dipteryx</i> sp. <i>Sousa S.F., Kasper A.A.M., Sousa Júnior J.J.V., Silva S.K.R., Moutinho V.H.P., Barata L.E.S.</i>	142
Avaliação da atividade antimicrobiana e modulatória de complexos de inclusão de óleo de <i>Euterpe oleraceae</i> Mart e $\beta$ -ciclodextrina e HP- $\beta$ -ciclodextrina <i>Magalhães T.S.S.A., Macedo P.C.O., Pacheco S.Y.K., Ferreira M.A.S., Almeida J.C., Lima A.A.N.</i>	147

## Microbiologia Básica

Isolamento e caracterização do agente causal da macha zonada em <i>Rollinia mucosa</i> <i>Catarino A.M., Queiroz C.A., Sousa T.F., Gasparotto L., Hanada R.E., Silva G.F.</i>	154
Importância da viabilidade, conservação e uso biotecnológico de fungos anamorfos <i>Costa G.S., Lima H.D.S., Melo G.R.P., Moraes J.C.F.B., Oliveira D.A.S., Jesus M.A.</i>	160
Prospecção de extratos brutos de <i>Aspergillus</i> spp. e <i>Penicillium</i> spp. com ação antimicrobiana <i>D'Elia G.M.A., Goiabeira C.V.S., Fernandes O.C.C., Rodrigues J.C.</i>	166
Identificação de fungos mitospóricos incorporados na Coleção Microbiológica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA <i>Melo G.R.P., Jesus M.A.</i>	171
Potencial antimicrobiano de <i>Bacillus</i> spp., contra cepas de importância médica <i>Muniz V.A., Katak R.M., Oliveira J.C., Rocha E.M.; Serrão D.M., Correa L.V., Tadei W.P.</i>	177
Detecção molecular do locus gênico <i>chi</i> em linhagens de bacilos amazônicos <i>Oliveira J.C., Katak R.M., Rocha E.M., Muniz V.A., Serrão D.M., Correa L.V., Rocha Filho J.S., Tadei W.P.</i>	183
Avaliação da influência da preservação por liofilização na viabilidade das propriedades macro morfológicas de fungos dos gêneros <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> <i>Oliveira L.C., Oliveira J.G.S., de Souza J.V.B.</i>	189
Otimização das condições para a produção de metabólitos no co-cultivo de <i>Quambalaria cyanescens</i> e <i>Paecilomyces</i> sp. <i>Raposo D.S., Maciel J.B.S., Sousa T.F., Silva G.F., Koolen H.H.F.</i>	194
Isolamento e identificação de fungos endofíticos de <i>Passovia stelis</i> (Loranthaceae) <i>Silva S.S., Costa M.B.S., Souza A.Q.L., Oliveira C.M.</i>	200

## Microbiologia Industrial

Produção de biossurfactantes em amostra de fungos endofíticos isolados de planta da Amazônia <i>Gustavia hexapetala</i> (Aubl.) Sm. <i>Ferreira F.S., Souza A.Q.L., Batista I.H., Fonseca M.D.P., Ferreira R.S., Silva M.E.T., Ferreira A.S., Albuquerque P.M., Duvoisin Junior S., Pereira J.O.</i>	204
Produção de etanol em sistemas SSF/SSCF em reator de coluna de bolhas com leveduras aclimatizadas <i>Boranelli A.B.L., Ramos L., Vasconcelos M.H., Santos J.C.</i>	212
Actinobactéria isolada de solo amazônico: uma promissora fonte de enzimas de aplicação industrial <i>Branco F.L.C., Sousa Júnior J.J., Sousa S.F., Santana R.C.F., Araújo J.M., Tsai S.M., Silva S.K.R.</i>	218
Enzimas extracelulares produzidas por <i>Colletotrichum</i> spp. isolados de frutíferas tropicais <i>Coelho K.W.S.A., Costa Neto P.Q., Pereira J.O.</i>	225

Identificação do <i>Streptomyces</i> CBA-61 usando o gene 23S e 16S rRNA <i>Marcolino M.R., Silva I.R., Procópio R.E.L.</i>	231
Avaliação da viabilidade do método de preservação Castellanni na conservação de fungos filamentosos <i>Matos R.S.M., Souza I.F., Oliveira G.F.S., Silva I.R.</i>	236
Avaliação do possível efeito imunomodulador de <i>Pleurotus ostreatus</i> em hepatócitos infectados pelo DENV-2 <i>Oliveira A.P., Souza M.M.M., Kirsch L.S., Lima Júnior R.S.</i>	241
Estudo de fungos termofílicos de compostagem para produção de biossurfactantes <i>Santos R.A., Santos R.R.C., Souza T.J.S.M., Santos M.M.S., Souza J.V.B., Souza E.S.</i>	247
Influência de condições de hidrólise e fermentação em reatores de coluna na produção de etanol 2G <i>Shibukawa V.P., Ramos L., Vasconcelos M.H., Santos J.C.</i>	251
Potencial biotecnológico de actinobactérias do bioma amazônico para produção de enzimas hidrolíticas <i>Marinho N.M.V., Silva A.S., Teixeira M.F.S.</i>	257
Atividade antimicrobiana de microrganismos promissores em diferentes condições de cultivo <i>Souza I.F., Silva I.F., Matos R.S.M., Pinheiro W.D., Silva I.R.</i>	262
Avaliação do possível efeito imunomodulador de exopolissacarídeos de <i>Pleurotus eryngii</i> em linhagem de hepatócitos (Huh-7) infectados pelo vírus Dengue <i>Souza, M.M.M., Oliveira, A.P., Lima Junior, R.S., Kirsch L.S.</i>	268
Perfil enzimático do fungo L3 Isolado de celulose reciclada e atuação sinérgica com enzimas de <i>Trichoderma reesei</i> comercial <i>Pimentel P.S.S.R., Oliveira J.B., Belmont E.L., Silva S.D., Nunes-Silva C.G.</i>	274
Seleção de microrganismos com potencial para produção de lipases e biossurfactantes <i>Silva I.R., Souza I.F., Pinheiro W.D., Matos R.S.M.</i>	280
Avaliação do crescimento e produção de proteases de culturas depositadas na Coleção de Fungos da Amazônia <i>Souza T.C., Rodrigues J.C., Goiabeira C.V.S., Degrave W.M.S., Lima L.M., Fernandes O.C.C.</i>	288
Análise de compostos poliméricos de <i>Pestalotiopsis microspora</i> por HPLC-ESI-MS para uso em Odontologia <i>Vieira A.P.C., Zacarias Filho R.P., Banhos E.F., Manzato L., Souza A.D.L., Souza A.Q.L.</i>	293
Obtenção de biomassa de leveduras produtoras de carotenoides em hidrolisado da casca de mandioca <i>Torres D.R., Souza J.V.B., Roberto I.C.</i>	299

## Médica e Veterinária

Avaliação da ação leishmanicida de <i>Fusarium solani</i> sobre promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> e <i>Leishmania guyanensis</i> <i>Alves T.A., Nascimento R.M., Rêgo L.A., Souza J.V.B., Rocha L.C., Flávia Moreira F.R.A.C.N.</i>	305
---	-----

---

Análise bacteriológica de mãos e unhas de estagiários em uma clínica veterinária em Manaus, AM <i>Aparício A.S.A., Lisbôa R.S., Souza F.S.</i>	311
Doença pulmonar fúngica associada a outras pneumopatias nos pacientes atendidos em hospital terciário de Manaus <i>Cavalcante Filho J.C., Menezes A.Q., Andrade S.L.</i>	317
Ocorrência de <i>Candida</i> spp. em cavidade oral de cães atendidos em clínica veterinária em Manaus, AM <i>Diniz N.F.L., Lisbôa R.S., Souza F.S.</i>	323
Brucelose em bovinos no município de Itacoatiara, Amazonas <i>Ferreira J.C.C., Ribeiro T.M.P., Francener S.F.</i>	328
Parasitas sanguíneos em cães do município de Araguaína, Tocantins, Brasil <i>Machado M.A.B., Ribeiro T.M.P., Freiria L.M.</i>	334
Controle do <i>Rhipicephalus microplus</i> com <i>Metarhizium</i> sp. da região Amazônica <i>Martins L.C., Araújo A.V., Carvalho C.M.</i>	338
Avaliação <i>in vitro</i> da atividade leishmanicida do extrato do fungo <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Nascimento R.M., Alves T.A., Souza J.V.B.<sup>3</sup>, Almeida-Campos F.R., Rocha L.C.</i>	344
Prevalência de microrganismos gram-negativos em um hospital público na região central de Rondônia <i>Novais V.P., Valiatti T.B., Romão N.F., Marson R.F., Sobral F.O.S.</i>	351
Atividade anti- <i>Staphylococcus</i> de variedades de banana ( <i>Musa</i> sp.) <i>Oliveira T.C., Oliveira K.K.C., Fernandes O.C.C., Oliveira L.A.</i>	356
<i>Streptomyces</i> sp. isolados de solo amazônico produtores de enzimas antitumorais <i>Silva H.A., Sousa Júnior J.J., Branco F.L.C., Andrade R.A.M., Mourão A.L.C., Santana R.C.F., Araújo J.M., Tsai S.M., Boger A.E., Silva S.K.R.</i>	361
Seleção e produção de exo ou polissacarídeos microbianos da Amazônia para o uso em Odontologia <i>Zacarias Filho R.P., Vieira A.P.C., Hanan S.A., Souza A.D.L., Souza A.Q.L.</i>	367

---

# Produção e caracterização parcial de proteases de cogumelo comestível da Amazônia para aplicação industrial

Elliza Emily Perrone Barbosa<sup>1</sup>, Dib Mady Diniz Gomes<sup>2</sup>, Adrya da Silva Figueiredo<sup>2</sup>,  
Maria Francisca Simas Teixeira<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Graduada em Ciências Biológicas na Universidade Federal do Amazonas

<sup>2</sup> PG em Biotecnologia – UFAM

<sup>3</sup> Professora associada e curadora da coleção de culturas DPUA – Universidade Federal do Amazonas

E-mail: elliza.perrone01@gmail.com<sup>1</sup>, msimasteixeira@gmail.com<sup>3</sup>

## Resumo

O uso das proteases de origem fúngica tem expandido nos últimos anos, e os basidiomicetos vem se destacando entre as diversas fontes existentes. Apresentando propriedades diferenciadas, vantagens para a indústria, produção rápida e fácil. Este trabalho teve por objetivo investigar a influência de diferentes fontes nutritivas na produção de protease por *Pleurotus ostreatoroseus*. Este cogumelo foi cultivado em caldo GYP (glicose, extrato de levedura e peptona), caldo Sabouraud (SAB) e Extrato de Malte (MEA), suplementados com extrato de levedura 0,5% (p/v). Em cada frasco de Erlenmeyer contendo 50 mL de meio foi inoculado 20 discos miceliais. A atividade das proteases foi determinada nos extratos brutos provenientes da fermentação submersa, utilizando azocaseína 1% (p/v) como substrato. Os resultados evidenciaram a atividade de proteases nos extratos recuperados dos cultivos de *P. ostreatoroseus*, no entanto, a atividade significativa foi determinada em caldo GYP ( $3,73 \pm 0,23$  U/mL). As proteases expressaram maiores atividades em pH 6,0, e temperatura ótima em 30 °C e 50 °C, resultado que revela a presença de proteases com potencial para aplicação na indústria alimentícia, têxtil e farmacêutica.

**Palavras-chave:** Atividade proteolítica, Fermentação, Enzima.

## Introdução

A maioria das proteases utilizadas atualmente são as de origem microbiana, estas que ganharam reconhecimento global por seu uso difundido em vários setores industriais, tais como na indústria alimentícia, química, na agricultura, e na biotecnologia (Choi *et al.*, 2015). As proteases microbianas representam 90% do mercado global devido ao grande uso em produtos industrializados ao longo dos anos (Inácio *et al.*, 2015).

A preferência no uso de proteases tem crescido justamente devido a fácil aplicação em biotecnologia e pelo seu baixo custo, além de serem enzimas de rápida produção, possuírem características não-tóxicas, e facilidade de manipulação dos micro-organismos (Yin *et al.*, 2014).

Uma das indústrias importantes em que as proteases desempenham um papel essencial é a de alimentos, onde atuam como agentes de modificação das propriedades funcionais das proteínas, no processamento de queijo (coagulação do leite, pela hidrólise de uma ligação específica na caseína), na obtenção de hidrolisados proteicos, melhorando o sabor de alguns alimentos e com boa atuação na panificação (Inácio *et al.*, 2015).

Essas enzimas podem ser produzidas por fermentação submersa, processo no qual fungos, bactérias ou leveduras crescem comumente, em condições padronizadas para síntese das enzimas de interesse. O cultivo submerso tem sido um método promissor para a produção eficiente e em larga escala de biomassa de micélio e metabólitos bioativos com menor tempo de incubação e menor risco de contaminação (Cui *et al.*, 2015).

Dentre os fungos, os cogumelos vêm se destacando como produtores de enzimas proteolíticas. Além da propriedade nutricional são considerados uma especiaria nobre na culinária, são fungos que estão ganhando espaço nas pesquisas, pois muitas espécies são fontes de compostos bioativos, necessitam de teores reduzidos de nutrientes para crescimento, e possuem excelente adaptação em meios naturais ou sintéticos (Manzur *et al.*, 2014). Além de seu valor nutricional, os cogumelos têm grande potencial para

a produção de metabólitos úteis (Tang *et al.*, 2016). Um bom exemplo são as espécies do gênero *Pleurotus* (Fonseca *et al.*, 2014).

Dentre esse gênero, *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. se destaca principalmente por sua coloração rósea e excelente sabor do corpo de frutificação, ocorrendo em áreas tropicais, crescendo bem em temperaturas superiores a 20°C. Esta espécie também é capaz de sintetizar enzimas extracelulares que degradam compostos orgânicos complexos em nutrientes assimiláveis (Yang *et al.*, 2015).

Portanto, apesar desta espécie de cogumelo ser bastante consumida, os registros em literatura sobre a produção de enzimas por *P. ostreatoroseus* ainda são escassos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar a influência de diferentes fontes nutritivas na produção de proteases por *Pleurotus ostreatoroseus* cultivado em meio líquido.

## Material e Métodos

Para este estudo, foi selecionada a espécie *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720, cedido pela Coleção de Culturas DPUA/UFAM. A cultura matriz foi obtida em ágar GYP (glicose, extrato de levedura e peptona), ágar Sabouraud (SAB) e ágar extrato de malte (MEA). SAB e MEA foram suplementados com extrato de levedura 0,5% (p/v), em placas de Petri. Os meios foram esterilizados a 121°C por 15 minutos. Os cultivos foram mantidos a 25 °C por oito dias.

Para a produção das enzimas foram utilizados GYP (glicose, extrato de levedura e peptona), extrato Sabouraud (SAB) e extrato de malte (MEA), suplementados com extrato de levedura 0,5% (p/v), em frascos de Erlenmeyer de 125 mL. Os meios foram esterilizados a 121°C por 15 minutos. Em cada frasco foi inoculado 20 discos miceliais de oito mm de diâmetro retirados da cultura matriz de *P. ostreatoroseus*. A fermentação foi realizada a 25 °C, a 150 rpm. Após oito dias os extratos foram recuperados por filtração a vácuo para análise enzimática.

Na determinação da atividade quantitativa das proteases foram adicionados 250 µL de solução de azocaseína 1% (p/v) em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2 em 150 µL de extrato bruto. Os tubos reação foram incubados por uma hora, a 25 °C, em câmara escura. Para a interrupção da reação foram adicionados 1,2 mL de ácido tricloroacético 10% (p/v) e em seguida procedeu-se a centrifugação por 10 minutos a 10000 rpm, a 4 °C. Em seguida, de cada sobrenadante, foram retirados 0,8 mL e transferidos para tubos de ensaio contendo 1,4 mL de hidróxido de sódio 1M. A leitura das amostras foi realizada a 440 nm. Como branco foi utilizada solução de azocaseína 1% (p/v) em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2. A leitura das amostras foi realizada a 440 nm. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorvância de 0,1 em uma hora (Kirsch *et al.*, 2013).

Para investigar o efeito do pH e da temperatura na atividade proteolítica, foi selecionado o extrato enzimático do meio onde foi obtida a maior atividade proteolítica. A análise do pH ótimo foi realizada incubando o extrato enzimático em diferentes faixas de pH (4,0 – 10,0), a 25 °C por 60 minutos. Os tampões utilizados foram Acetato de sódio 0,1 M (pH 4,0-6,0), Tris-HCl 0,2M (pH 7,0 e 8,0), Glicina-NaOH (pH 9,0 e 10,0). O efeito da temperatura foi determinado em 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C e 70 °C, 80°C por 60 minutos. A atividade das proteases foi determinada conforme descrito anteriormente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (Machado *et al.*, 2017).

Os dados foram submetidos à análise estatística descritiva média, desvio padrão, gráfico e os cálculos de atividade enzimática ( $R^2 \geq 95\%$ ) por meio de análise de variância (Anova) e teste Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando o software Minitab® versão 17.0.

## Resultados e Discussão

A produção de proteases é uma característica predominante em micro-organismos, tais como os fungos. Esta propriedade é bastante explorada comercialmente, principalmente via fermentação, devido à fácil e alta produtividade de enzimas (Batra e Walia, 2014).

Neste estudo, *P. ostreatoroseus* excretou proteases em todos os meios de fermentação submersa, cuja média de atividade proteolítica foi 3,35 U/mL. O valor médio significativo da atividade de proteases ( $3,73 \pm 0,23$  U/mL) foi verificado no extrato bruto recuperado do cultivo em GYP (glicose, extrato de levedura e peptona). O menor valor de atividade proteolítica ( $2,84 \pm 0,30$  U/mL) foi observado nos extratos de SAB (Figura 1).

As proteases microbianas podem ser produzidas de várias maneiras, e estudos mostraram que, dependendo das condições de cultura, diferentes formas da mesma protease podem ser expressas (Inácio *et al.*, 2015). No estudo em questão, a produção de proteases extracelulares por *P. ostreatoroseus* pode estar associada à necessidade do cogumelo em hidrolisar diferentes fontes de nutrientes proteicos (Fonseca *et al.*, 2014).

A baixa atividade de proteases em SAB pode estar relacionada com as propriedades nutricionais e as condições de fermentação, considerando que em cada meio de fermentação foram utilizadas diferentes fontes de carbono, nitrogênio, além da suplementação com extrato de levedura. Corroborando com as pesquisas de Souza *et al.* (2015), que afirma que a produção de protease é influenciada principalmente pela variação na relação Carbono/Nitrogênio, presença de alguns açúcares facilmente metabolizáveis, como glicose e íon metálico, fatores físicos, aeração, densidade do inóculo, pH, temperatura, incubação, tempo.

O extrato bruto com maior atividade proteolítica foi submetido à caracterização parcial de proteases. O efeito do pH na atividade dessas enzimas (Figura 2A) de *P. ostreatoroseus* em GYP apresentaram atividade catalítica ótima em pH 6,0 com valores de ( $4,75 \pm 0,38$  U/mL). Os dados obtidos corroboram com a pesquisa realizada por Martim *et al.* (2017), que obteve dados semelhantes na investigação da produção de enzimas de coagulação do leite por cogumelos, para serem aplicadas na produção de queijo, onde *Pleurotus albidus* sintetizou proteases com 100% de atividade catalítica em pH 6.

Dados semelhantes também foram obtidos por Machado *et al.* (2017), na pesquisa com *P. ostreatoroseus* com foco na produção e caracterização de peptidases a partir da biomassa micelial cultivada em tubérculos amazônicos, onde o cogumelo expressou atividade ótima em pH 7,0 e mantendo 88% de atividade em pH 6,0. De acordo com Jisha *et al.* (2013), proteases com pH ótimo de 5 a 8 têm aplicação em diversos segmentos industriais, como na indústria alimentícia, têxtil, farmacêutica, e possivelmente até em detergentes.

Com ênfase nas proteases neutras com aplicação na indústria alimentícia, estas têm forte potencial no processamento de alimentos, na produção de ração animal, e até mesmo para o tratamento de resíduos agroindustriais, e na panificação (Machado *et al.*, 2015).

Do ponto de vista da tecnologia de alimentos, o uso das proteases microbianas na matéria-prima ou durante o processamento dos alimentos foi proposto como uma vantagem na proteólise do glúten, antes da sua ingestão. Tendo em vista que na indústria de panificação, a adição de enzimas à farinha ou massa

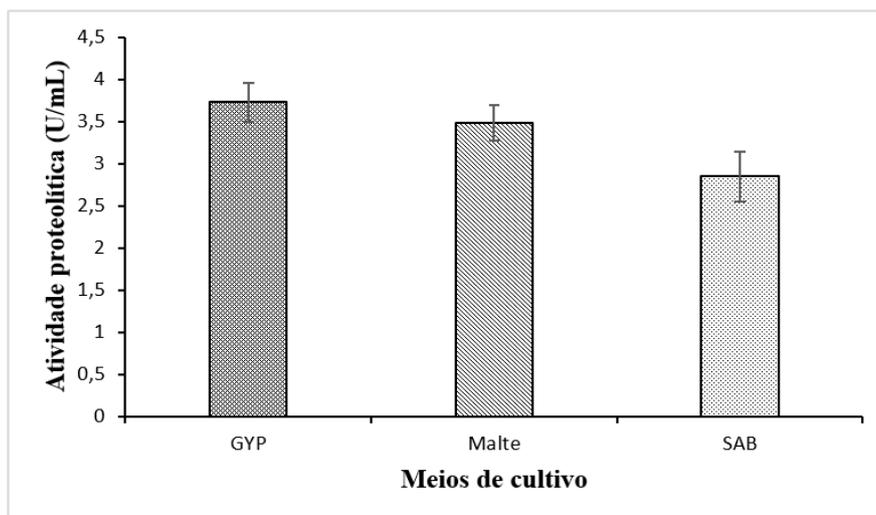
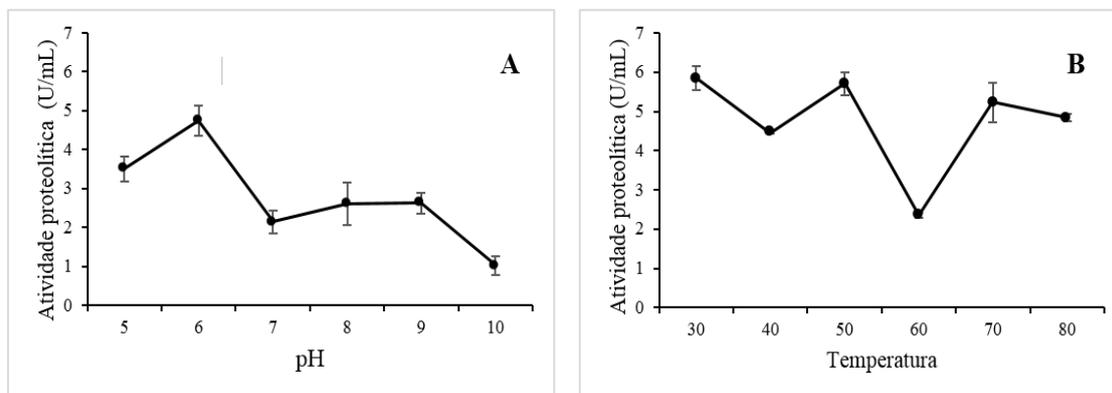


Figura 1. Média da atividade de proteases produzida por *P. ostreatoroseus* em diferentes meios de cultura líquidos.

é uma prática comum para melhorar a qualidade da massa e a sua viscosidade. E por esse motivo as proteases de origem fúngica tem sido rotineiramente usadas em larga escala comercial na produção de produtos de panificação, biscoitos e waffles (Heredia *et al.*, 2016).

Quanto ao efeito da temperatura na atividade das proteases de *P. ostreatoroseus*, os resultados desta investigação mostraram que houve atividade enzimática em todas as temperaturas testadas de 30°C à 80°C, contudo, a temperatura ótima de atividade proteolítica foi em 30°C e 50°C. E as mínimas atividades em 40°C e 60°C (Figura 2B).



**Figura 2.** Efeito do pH (A) e da temperatura (B) na atividade de proteases de *Pleurotus ostreatoroseus*.

Os resultados obtidos corroboram com estudos similares de Fonseca *et al.* (2014), e Machado *et al.* (2016), que obtiveram atividade ótima de temperatura do cogumelo *P. ostreatoroseus* entre 40°C e 50°C, respectivamente.

Os dados mostram que em média a atividade enzimática na faixa de 60°C foi reduzida. Este efeito está relacionado quando a temperatura é potencializada, e a energia cinética da enzima ultrapassa a barreira de energia, resultando na quebra das ligações de hidrogênio e hidrofóbicas fracas, que mantêm a estrutura da enzima. (Daniel *et al.*, 2010; Oueslati *et al.*, 2014; Martim *et al.*, 2017). Razão pela qual houve a redução de atividade catalítica em 60°C, devido a desnaturação da enzima.

Sendo assim, o estudo e a verificação do pH e da temperatura ótima mostram-se como importantes parâmetros para a indicação da aplicação das enzimas em processos industriais (Castro *et al.*, 2014).

## Conclusão

Dentre os meios analisados, *Pleurotus ostreatoroseus* produziu maior atividade de proteases quando cultivado em caldo GYP, tendo atividade catalítica significativa em pH 6,0 e temperatura ótima em 30°C e 50°C. Diante deste resultado, as proteases de *P. ostreatoroseus* apresentam potencial para aplicação na indústria alimentícia, têxtil e farmacêutica.

## Referências

- Batra N, Walia M 2014. Production and characterization of alkaline protease from bacteria strains isolated from cotton field. *African Journal of Microbiology Research*, 8:702-709.
- Castro RJS, Sato HH 2014. Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: An evaluation of the physical-chemical parameters using agroindustrial wastes as supports. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 3:20-25
- Choi JM, Han SS., Kim HS. 2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: status and future aspect. *Biotechnol Adv.*33:1443-1454. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.02.014.

- Cui M, Yang H, HG (2015). Submerged fermentation production and characterization of intracellular triterpenoids from *Ganoderma lucidum* using HPLC-ESI-MS. *Journal of Zhejiang University Science B*. 16(12):998-1010. doi:10.1631/jzus. B1500147.
- Daniel, RM, ME, Peterson MJ, Danson NC, Price SM, Kelly CR, Monk CS, Weinberg ML, Oudshoorn L, Lee CK (2010). The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity. *Biochemical Journal* 425(2): 353-360. doi: <https://doi.org/10.1042/BJ20091254>.
- Fonseca TRB, Barroncas JF, Teixeira MFS 2014. Produção em matriz sólida e caracterização parcial das proteases de cogumelo comestível da Floresta Amazônica. *Revista Brasileira de Tecnologia*, 8(01): 1227-1236.
- Heredia SNG, Valencia TMY, Calderón AM, Islas AR 2016. Microbial Proteases in Baked Goods: Modification of Gluten and Effects on Immunogenicity and Product Quality. Mariotti M, ed. *Foods*.5(3):59. doi:10.3390/foods5030059.
- Inácio F, Ferreira R, Araujo CV 2015. Proteases of Wood Rot Fungi with Emphasis on the Genus *Pleurotus*. *BioMed Research International*. 290161. doi:10.1155/2015/290161.
- Jisha VN, Smitha RB, Pradeep S, Sreedevi S, Unni KN, Sajith S, Priji P, Josh MS, Benjamin S 2013. Versatility of microbial proteases. *Advances in Enzyme Research*, v. 1, n.3, p. 39-51.
- Kirsch LS, Ebinuma VDCS, Teixeira MFS 2013. Mycelial biomass and biochemical properties of proteases produced by *Lentinus citrinus* DPUA 1535 (Higher Basidiomycetes) in submerged cultivation. *International journal of medicinal mushrooms*, 15(5): 505-515.
- Machado ARG, Teixeira MF, Kirsch LS, Campelo LC, Oliveira IMA 2015. Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid-state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. *Saudi Journal of Biological Sciences*. Doi:10.1016/j.sjbs.2015.07.002
- Machado ARG, Martim SR, Alecrim MA, Teixeira MFS. 2017. Production and characterization of proteases from edible mushrooms cultivated on amazonic tubers. *African Journal of Microbiology Research*. v. 16, n. (46), pp. 2160-2166, 15. doi: 10.5897/AJB2017. 16154. Article Number: ISSN 1684-5315.
- Manzur A, Sapna K, Rekha M, Bhat SG, Chandrasekaran M, Elyas K 2014. Trypsin Inhibitor from Edible Mushroom *Pleurotus floridanus* Active against Proteases of Microbial Origin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 173, p. 167-178.
- Martim SR, Silva LSCS, Souza LB, Carmo EJ, Alecrim MM, Vasconcellos MC, Oliveira IMA, Teixeira MFS. (2017). *Pleurotus albidus*: A new source of milk-clotting proteases. *African Journal of Microbiology Reserach*. doi: 10.5897/AJMR2017.8520.
- Martim SR, Silva LSCS, Alecrim MM Souza BC, Oliveira IMA, Teixeira MFS. 2017. Proteases ácidas de cogumelo comestível da Amazônia para aplicabilidade industrial. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Nat.*, Belém, v. 12, n. 3, p. 353-362.
- Oueslati A, Mounirhaouala 2014. Operating conditions effects on enzyme activity: case enzyme protease. *Journal of Engineering Research and Applications*. 4(9): 33-37.
- Souza P, Bittencourt M, Caprara C 2015. Uma perspectiva biotecnológica de proteases fúngicas. *Revista Brasileira de Microbiologia*.46 (2): 337-346. doi: 10.1590 / S1517-838246220140359.
- Tang C, Hoo X, Tan L 2016 Golden Needle Mushroom: A Culinary Medicine with Evidenced-Based Biological Activities and Health Promoting Properties. *Frontiers in Pharmacology*.7:474. doi:10.3389/fphar.2016.00474.
- Yang D, Liang J, Wang Y, Sun F, Tao H, XU Q, Zhang L, Zhang Z, Ho CT, Wan X (2015). Tea waste: an effective and economic substrate for oyster mushroom cultivation. *J. Sci. Food Agric*. 1: 1-5
- Yin C, Zheng L, Chen L, Tan Q, Shang XMA 2014. Cloning, expression, and characterization of a milk-clotting aspartic protease gene (Po-Asp) from *Pleurotus ostreatus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.172 (4):2119-2131. doi: 10.1007/s12010-013-0674-4.

## Avaliação do teor de umidade e sua influência na viabilidade de microrganismos em diversos açúcares

Elizianne Andrade Burton<sup>1</sup>, Michelle Carvalho do Espírito Santo<sup>2</sup>,  
Simone de Nazaré Melo Ramos<sup>3</sup>, Edson Júnior do Carmo<sup>4</sup>

<sup>1</sup> G Farmácia, Universidade do Estado do Amazonas

<sup>2</sup> G Farmácia, Universidade do Estado do Amazonas

<sup>3</sup> Doutora em Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas

<sup>4</sup> Doutor em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas

Emails: eab.gfa@uea.edu.br, mcdes.gfa@uea.edu.br, ramosdesimone@gmail.com, edsonjuniorbio@yahoo.com.br.

### Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar o teor de umidade dos diferentes tipos de açúcar comercializados em supermercados na cidade de Manaus/AM: açúcar cristal convencional (1, 2 e 3), açúcar demerara (4), açúcar light (5), açúcar mascavo (6) e açúcar refinado (7), relacionando este parâmetro com a qualidade microbiológica dos produtos a fim de verificar a padronização e adequação destes para consumo humano. Foi realizada a análise física para determinação de umidade através do método de secagem por radiação infravermelha, executada em triplicata no Laboratório de Vigilância da Secretaria Municipal de Saúde – SEMSA. A análise microbiológica para bactérias mesófilas totais foi realizada em meio de cultura Luria Bertani (LB) e a análise microbiológica para fungos em meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA). A identificação das colônias de fungos foi feita por meio das suas características macroscópicas e microscópicas. O microcultivo em lâmina utilizando Ágar BDA foi realizado quando necessário. Estas análises foram executadas no Laboratório de Microbiologia e Laboratório de Micologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Os valores do teor de umidade variaram de 0,06% a 4,25%, onde cinco amostras apresentaram-se dentro do padrão estabelecido pela legislação brasileira. Na análise microbiológica para bactérias mesófilas todas as amostras apresentaram-se dentro do padrão exigido pela legislação, porém na análise microbiológica para fungos houve desconformidade em seis das sete amostras de açúcar, com alta contaminação por fungos do gênero *Aspergillus* sp., *Candida* sp. e *Fusarium* sp. Estes resultados evidenciam inadequação no armazenamento, tornando estes produtos impróprios para o consumo humano. Considera-se a necessidade de fiscalização mais rigorosa durante a etapa de armazenamento dos açúcares, garantindo a proteção à saúde da população e a regulamentação dos padrões microbiológicos dos mesmos para evitar casos de saúde pública.

**Palavras-chave:** deterioração, fungos, microbiologia de alimentos.

### Introdução

Nos últimos anos, os consumidores têm procurado aprimorar seus hábitos alimentares gradativamente, buscando aumentar o consumo de produtos industriais menos processados e com menor adição de produtos químicos em sua fabricação, sejam substâncias para aumentar o tempo de prateleira, como os conservantes, ou apenas para tornar a aparência mais agradável e atraente como corantes e flavorizantes. De acordo com Lima (2006), os açúcares demerara e mascavo atendem aos grupos de pessoas que possuem hábitos alimentares baseados na diminuição ou eliminação de produtos químicos agregados.

O açúcar mascavo teve sua ascensão ainda mais vigorosa em relação ao demerara, pois segundo Generoso *et al.* (2009), seu uso moderado evita obesidade, diabetes, além de ajudar no bom funcionamento do sistema digestório e melhor desempenho das funções hepática e renal, devido à considerável presença de sais e vitaminas. Atualmente o açúcar mascavo tornou-se um produto de referência de acordo com suas características microbiológicas, além da ampla utilização do mesmo como base essencial para a produção de variados tipos de bebidas e alimentos. De acordo com Storel Júnior (2003), a determinação da umidade é uma das análises mais importantes e amplamente usada no processamento dos

alimentos e aplicada na análise destes, pois esse parâmetro está relacionado com a segurança, qualidade e composição de produtos alimentícios.

A presença de umidade/água em alimentos, afeta a sua estocagem (como os grãos estocados sob umidade excessiva, propensos à rápida deterioração devido à aflatoxina produzida por fungos em crescimento), a sua embalagem (como a velocidade de escurecimento em vegetais e frutas desidratadas pela ação de enzimas PPO – polifenol oxidase) e o seu processamento (como a umidade do trigo na fabricação de pão e outros produtos de confeitaria, ou, do açúcar, utilizado para os mesmos e/ou similares fins).

A preservação dos alimentos é importante para garantir a prevenção ou remoção da contaminação, além da inibição do crescimento e do metabolismo microbiano, com ação microbiostática, e destruição de microrganismos, ação microbicida (Amaral *et al.*, 2006). A água pode ser um interferente relevante quando presente em grande quantidade nos alimentos, sejam estes frescos ou processados. Isto ocorre devido à maior propensão de desenvolvimento e proliferação de microrganismos, os quais podem ser patogênicos à saúde humana. Em geral, a determinação de umidade, que parece um método simples, torna-se complicado em função da exatidão e precisão dos resultados. A umidade determinada por secagem (perda por dessecação) corresponde à perda em peso sofrida pelo produto quando aquecido em condições nas quais a água é removida. Outras substâncias que se volatilizam nessas condições também são removidas juntamente com a água.

O resíduo obtido no aquecimento direto é chamado de resíduo seco (matéria seca). O aquecimento direto na estufa a 105°C é um método muito utilizado para determinação de umidade ou resíduo seco, porém permite erros consideráveis como oscilação na temperatura da estufa, secagem incompleta, oxidação do material e erros do analisador. Existem ainda produtos que não devem ser submetidos à estufa a 105°C, pois além da água, são liberados outros compostos voláteis a esta faixa de temperatura. Nesta ocasião adota-se a temperatura de 65°C no período de 72h, tornando-se um processo demorado e não recomendável devido à maior variação no resultado (Coulter, 2004). Como a água não é fonte energética nem protagonista nos processos bioquímicos (mesmo sendo indispensável a eles), essa molécula pode ter sua importância nos alimentos subestimada, pois observando minuciosamente, verifica-se que a água possui importância determinante nas propriedades funcionais dos demais componentes dos alimentos e na conservação dos mesmos. Este composto nos fornece uma relação direta aos fatores intrínsecos do alimento de uma medida qualitativa de avaliação de água livre que pode ser suscetível a diversas reações químicas, físicas e biológicas, bem como quantitativa que define o teor da umidade através do peso de toda a água presente no produto, seja na forma livre ou ligada (Santos *et al.*, 2010). Não é de se esperar grande diversidade de microrganismos em análises microbiológicas de açúcares em geral, visto que seu crescimento depende, majoritariamente, se a umidade obtida for superior à especificada pela legislação vigente.

Entre as possíveis contaminações microbiológicas, pode-se destacar a contaminação por bactérias do gênero *Salmonella* sp. e *Escherichia coli* relacionada à manipulação inadequada na etapa de produção, e, por fungos considerados deteriorantes em potencial de alimentos – sendo muitos destes produtores de toxinas, denominadas micotoxinas – atrelada, principalmente, a problemas de conservação do produto, fator pertinente à região Norte do Brasil, a qual possui clima quente e úmido que dificulta o controle da umidade durante o armazenamento dos açúcares, diminuindo o tempo de prateleira.

Os gêneros mais comuns de fungos associados à produção de toxinas são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, encontrados facilmente em matérias-primas advindas do solo e plantações, em especial, milho, mandioca cana-de-açúcar. A contaminação de alimentos por estes microrganismos possui relevância patológica devido à produção de micotoxinas, dentre elas, destacam-se as aflatoxinas que são capazes de intoxicar vários tecidos e órgãos, em especial o fígado, que é responsável por metabolizar e armazenar nutrientes. A ligação íntima entre a qualidade microbiológica dos açúcares e o teor de umidade contido nos mesmos justifica o desenvolvimento deste trabalho.

O objetivo do trabalho foi avaliar a influência do teor de umidade na qualidade microbiológica e apontar os riscos à saúde humana devido à falta de padronização dos diferentes tipos de açúcar comercializados na cidade de Manaus/AM.

## Material e métodos

Para a realização dos experimentos, foram utilizadas amostras de 50 gramas de açúcar de cada amostra, as quais foram numeradas de 1 a 7, sendo: açúcar cristal convencional (1, 2 e 3), açúcar demerara (4), açúcar light (5), açúcar mascavo orgânico (6) e açúcar refinado convencional (7). As amostras foram obtidas em supermercados localizados na zona oeste da cidade de Manaus/AM. Foram usadas três repetições para cada tratamento, dando um total de 21 parcelas experimentais.

### *Análises microbiológicas*

As suspensões foram preparadas com 1g de alíquota de cada amostra de açúcar em 10mL de água autoclavada. A análise microbiológica para avaliar o crescimento de bactérias mesófilas totais foi realizada em meio de cultura Luria-Bertani (LB) em placas de Petri identificadas com o nome dos açúcares dispostos em ordem alfabética e numeradas de 1 a 7, contendo 200µL de diluição das diferentes amostras espalhadas com alça de Drigalski, incubadas a 37°C por 48 horas. A análise microbiológica para fungos foi realizada com meio de cultura Ágar BDA (Ágar Batata Dextrose) em placas de Petri arranjadas conforme anteriormente, contendo 100µL de diluição, incubadas a 30°C por 72 horas. Foi realizada a contagem de colônias em conta-colônias, de acordo com os padrões estabelecidos pelo Ministério da Saúde (1997). A identificação das colônias de fungos foi feita segundo Silva *et al.* em *Manual de métodos de análises microbiológicas em alimentos* (2007), por meio das suas características macroscópicas e microscópicas. O microcultivo em lâmina utilizando BDA foi realizado quando necessário. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia e Laboratório de Micologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

### *Análise física para determinação de umidade*

A determinação da umidade das amostras de açúcar foi realizada em aparelho analisador de umidade por infravermelho, SHIMADZU, modelo MOC63u, planejando a obtenção de dados mais precisos, procedimento menos demorado e a esquivar de erros como a oscilação na temperatura da estufa, secagem incompleta, oxidação do material, erros do analista e erros de pesagem e amostragem. A determinação de umidade foi realizada no Laboratório de Vigilância da Secretaria Municipal de Saúde – SEMSA e executada em triplicata. Utilizou-se da estatística descritiva, reunindo um conjunto de técnicas para sumarizar os dados obtidos, confeccionando a tabela 1, a qual possui variáveis quantitativas e discretas. Dentro das medidas de tendência central, foi utilizada a média por ser mais sensível e apresentar-se menos dispersa que a mediana. Entre as medidas de variabilidade, dentro da estatística descritiva, foram calculados a variância e o desvio padrão.

## Resultados e discussão

### *Análise física para determinação de umidade*

Referente aos teores de umidade foi possível observar uma variação entre 0,06% a 4,25%, considerada fora do padrão em relação aos parâmetros especificados pela legislação vigente. De acordo com Machado SS. *et al.*, em *Manual de Tecnologia da Fabricação de Açúcar* (2012), e o Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA em sua Instrução Normativa N°. 42 de 13 de novembro de 2017, o teor de umidade máximo considerado para açúcares do grupo I, classe “branco” e tipo “cristal” é de 0,1%, enquanto que para o grupo I, classe “bruto” e tipo “demerara” é de 1,2% devido ao seu processo de centrifugação. Segundo estudos descritos por Verruma-Bernardi *et al.* (2007), a especificação para teor de umidade do açúcar mascavo é de, no máximo, 2,4% em função da estabilidade do produto. Para o açúcar refinado a legislação prevê umidade máxima de 0,3% (Brasil, 1978). Conforme a avaliação dos açúcares, cinco apresentaram-se dentro do padrão estabelecido pela legislação brasileira, sendo que a amostra de açúcar cristal convencional (1) obteve uma média de teor de umidade de 0,46%, enquanto que a do açúcar mascavo (6) foi de 4,25%, parâmetro de especificação não previsto para estes tipos de açúcar, pela legislação brasileira.

O elevado teor de umidade em alguns gêneros alimentícios traz como consequência, riscos para a saúde do consumidor, por gerar um ambiente propício para a proliferação de microrganismos (INMETRO, 2016). Outros problemas que a alta umidade em açúcar pode causar, relatados por Generoso *et al.* (2009), foram o empedramento, dissolução de cristais (o açúcar se apresenta melado) e o desdobramento de sacarose em glicose e frutose, o que implica baixa vida útil para o produto. Os valores desta análise apresentados anteriormente foram dados pela média dos valores obtidos, haja vista que o experimento foi realizado em triplicata.

As medidas de variabilidade caracterizam a dispersão relacionando os dados; quanto maior a medida destes, maior a variabilidade (Vieira, 2015). A tabela 1 mostra a variabilidade dos resultados obtidos a partir da determinação do teor de umidade nas amostras de diferentes tipos de açúcar. É possível observar que a amostra de açúcar mascavo orgânico (6) mostrou o maior desvio padrão e a amostra de açúcar cristal convencional (1), por sua vez, mostrou o menor desvio padrão, sendo estas as que mais mostraram variação dentro da população amostral. Adotando os valores limites especificados pela legislação brasileira para o açúcar cristal convencional (0,1%) e para o açúcar mascavo orgânico (2,4%), pode-se prever um desvio padrão de 0,2 e de 0,73, respectivamente. Logo, o açúcar cristal convencional apresentou um resultado mais baixo e o açúcar mascavo apresentou um resultado mais alto que o esperado. Sabe-se que desvio padrão muito baixo indica que os pontos dos dados tendem a estar longe da média ou do valor esperado e um alto desvio padrão também indica que os pontos dos dados estão espalhados por uma ampla gama de valores, assim torna-se possível observar a discrepância entre o resultado obtido no presente estudo e o resultado esperado apontando a falta de padronização no teor de umidade destes produtos.

**Tabela 1.** Variabilidade no teor de umidade nas amostras de diferentes tipos de açúcar.

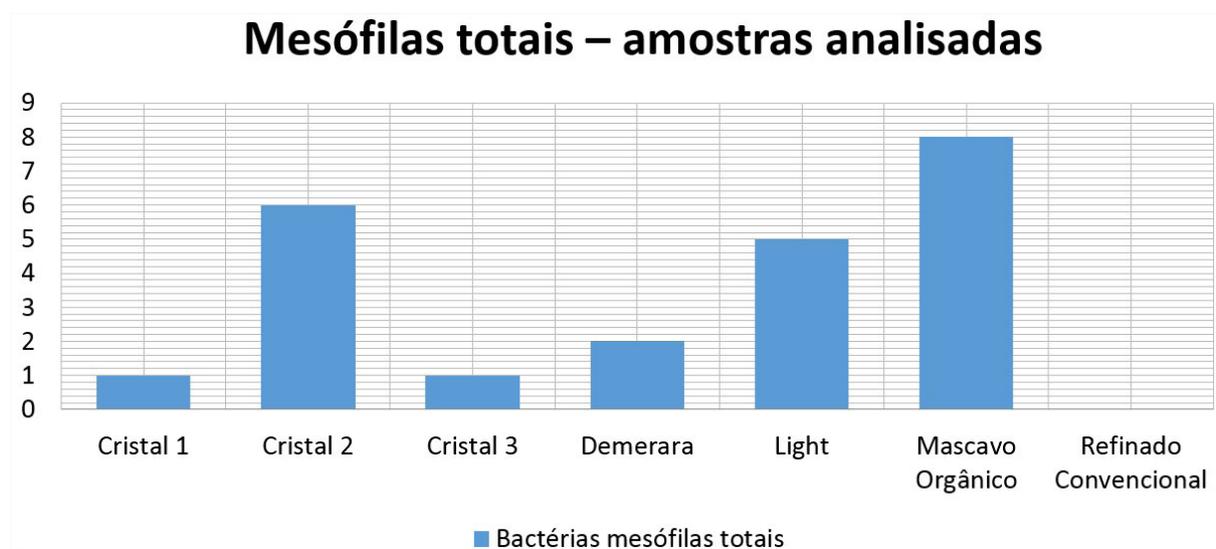
Tipo de açúcar	Média	Desvio padrão
1 - Cristalconvencional	0,46	0,12
2 - Cristal convencional	0,06	0,28
3 - Cristal convencional	0,07	0,28
4 - Demerara	0,25	0,2
5 - Light	0,09	0,27
6 - Mascavo orgânico	4,25	1,43
7 - Refinado convencional	0,087	0,27

### Análise microbiológica

Em relação à análise microbiológica dos açúcares, segundo os padrões da National Food Canners and Processors (1968), utilizados como parâmetro para qualidade dos açúcares, é estabelecido um limite de 50 UFC/g de açúcar para bactérias mesófilas totais e 50 UFC/g de açúcar para fungos. Os resultados microbiológicos para bactérias mesófilas apresentaram-se dentro do padrão exigido pela legislação internacional (Figura 1), sendo próprios para comercialização e consumo humano, considerando apenas o parâmetro de qualidade microbiológica para bactérias mesófilas. Embora nenhuma das amostras tenha apresentado alterações, as que mostraram maiores contaminações foram a do açúcar mascavo (6) e do açúcar cristal convencional (2), respectivamente. Os resultados microbiológicos para fungos, por sua vez, indicaram que houve desconformidade em seis das sete amostras de açúcar, com alta contaminação por fungos do gênero *Aspergillus* sp. encontrado em duas amostras, sendo estas de açúcar cristal convencional (1) e açúcar mascavo orgânico (6), *Candida* sp. encontrado em todas as amostras, porém dentro do valor especificado exclusivamente na amostra de açúcar refinado (7), o que pode ser explicado pelas extensas etapas de processamento do produto e, conseqüentemente, baixo teor de umidade do mesmo, e *Fusarium* sp. encontrado em uma amostra, sendo esta de açúcar mascavo orgânico (6).

Apesar da pertinente presença de fungos em todas as amostras, o açúcar cristal convencional (1) e açúcar mascavo (6) apresentaram resultados discrepantes de mais de 250 UFC/g de açúcar, o que evidencia uma inadequação no armazenamento, tornando estes produtos impróprios para o consumo humano. Na Figura 1 é possível observar a quantidade de bactérias mesófilas totais nas amostras de açúcar, resultado que aponta competência durante a manipulação e uma contaminação suficientemente baixa para evitar a promoção de patologias associadas a estas bactérias. Na Figura 2 pode ser observada a presença de fungos encontrados nestas amostras, notando-se a discrepância entre o valor limite estabelecido pela legislação vigente e o encontrado neste estudo. Tal resultado merece atenção pelo fato dos produtos analisados estarem devidamente embalados e passíveis de comercialização em supermercados, mostrando assim, problemas no armazenamento destes produtos devido ao clima quente e úmido característico da região Norte, o qual favorece o desenvolvimento de fungos toxigênicos, que, quando consumidos por indivíduos imunocomprometidos irão promover complicações, fragilizando ainda mais a sua saúde. Em contrapartida, as amostras dos produtos analisados no presente estudo apresentaram alta contaminação por fungos do gênero *Aspergillus* sp., *Candida* sp., e *Fusarium* sp. A contaminação observada, principalmente quando encontrados fungos do gênero *Aspergillus* e *Fusarium*, é de alta importância, considerando que os mesmos são potencialmente toxigênicos. As aflatoxinas produzidas por estes dois gêneros são particularmente perigosas, sendo descritas na literatura intoxicações severas seguidas por dor abdominal, vômitos negros, febre, icterícia, fígado palpável, culminando na morte do indivíduo (Amaral *et al.*, 2006).

De acordo com Generoso (2009), as micotoxinas encontram-se nos alimentos em baixas concentrações e assim requerem métodos analíticos sensíveis e confiáveis para sua detecção. Devido à variedade de estruturas químicas destes compostos, não é possível usar um método padrão para detectar todas as micotoxinas. A contaminação observada, mormente por fungos do gênero *Aspergillus* e *Fusarium*, é de alta importância, considerando que os mesmos são potencialmente toxigênicos, responsáveis por causar patologias como aspergilose pulmonar e ceratite, respectivamente, e micose sistêmica em sua letalidade. O potencial toxigênico não foi, no entanto, avaliado. Fungos do gênero *Candida* sp., apesar de não serem potentes produtores de micotoxinas, podem causar doenças infecciosas, como por exemplo, a candidíase, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Na tabela 2 pode-se observar a frequência dos gêneros de fungos encontrados nas amostras obtidas com a finalidade de evidenciar os produtos que apresentaram alta contaminação por microrganismos capazes de ameaçar a saúde humana.



**Figura 1.** UFC de bactérias mesófilas totais/g de açúcar.

## Fungos totais – amostras analisadas

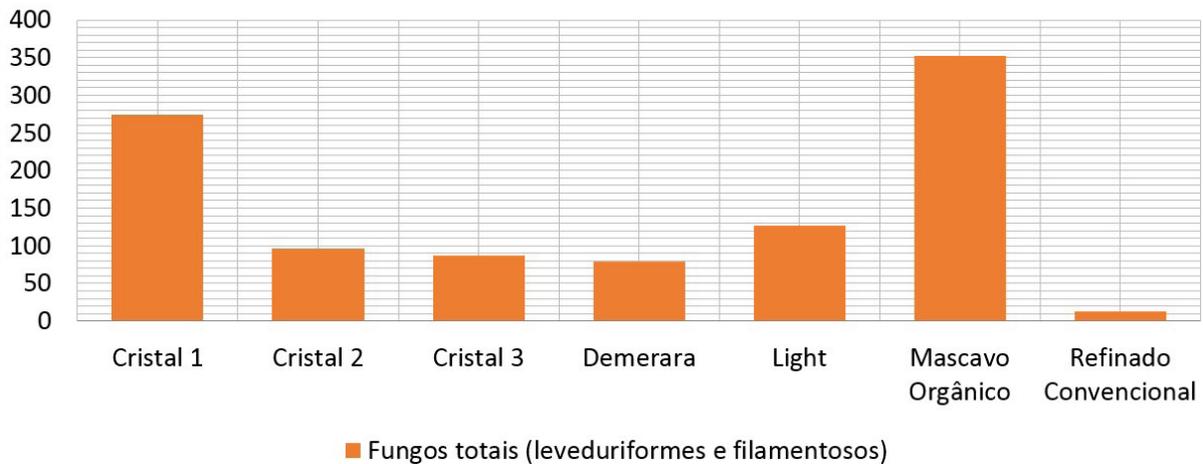
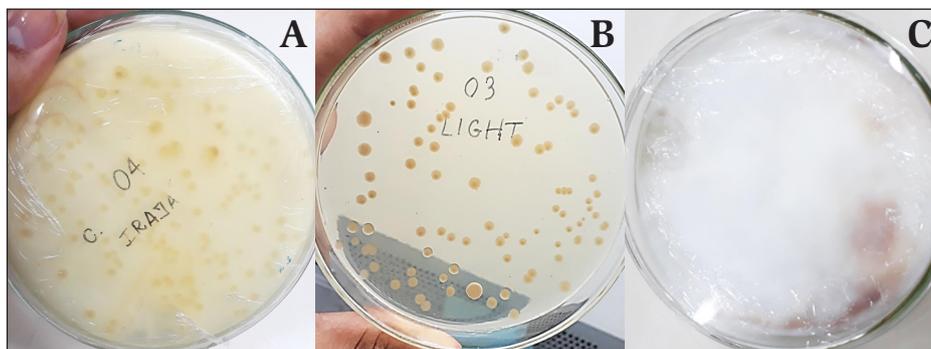


Figura 2. UFC de leveduras e bolores/g de açúcar.

Tabela 2. Frequência de gêneros de três fungos isolados obtidos a partir de sete amostras de açúcar da cidade de Manaus – AM – 2018.

Gênero	Números das amostras positivas	%
<i>Aspergillus</i> sp.	1,6	28,6
<i>Candida</i> sp.	Todas	100,0
<i>Fusarium</i> sp.	6	14,3

Os fungos do gênero *Aspergillus* sp. foram encontrados nas amostras de açúcar cristal convencional (1) e açúcar mascavo orgânico (6), enquanto que os fungos do gênero *Candida* sp. foram encontrados em todas as amostras de açúcar, porém em menor quantidade na amostra de açúcar refinado convencional (7), o que pode ser explicado pelas extensas etapas no processamento do produto e baixo teor de umidade do mesmo, segundo Machado SS *et al.* no manual *Tecnologia da Fabricação do Açúcar* (2012). Por fim, os fungos do gênero *Fusarium* sp. foram encontrados apenas na amostra de açúcar mascavo orgânico (6), desta forma, a manipulação inadequada pode justificar a contaminação do produto por estes microrganismos enquanto que o alto teor de umidade propicia sua viabilidade.



A) açúcar cristal convencional (1); B) açúcar light (5); C) açúcar mascavo orgânico (6)

Figura 3. Visualização macroscópica após 18 dias: placas de cultura axênicas dos fungos: A) *Aspergillus* sp. B) *Candida* sp. C) *Fusarium* sp.

Nas placas de açúcar cristal convencional (1) houve predominância de fungos do gênero *Aspergillus* sp., porém também foram encontrados fungos do gênero *Candida* sp., enquanto que nas demais placas de açúcar cristal convencional (2 e 3) e de açúcar demerara (4) houve crescimento de fungos do gênero *Candida* sp. semelhante à placa de açúcar branco light (5), não tendo assim suas imagens inclusas no trabalho. Na placa da amostra de açúcar mascavo orgânico (6) foram encontrados fungos do gênero *Aspergillus* sp., *Candida* sp. e *Fusarium* sp., entretanto após 18 dias houve predominância de *Fusarium* sp. Na placa de açúcar refinado convencional (7) houve crescimento de apenas sete colônias de fungos do gênero *Candida* sp.

### Considerações finais

A análise física para determinação de umidade apresentou valores bastante variáveis e fora das especificações legais evidenciando uma deficiência na padronização durante a etapa de armazenamento dos açúcares cristal (1) e mascavo (6), logo, o teor de umidade dos mesmos deve ser normatizado uma vez que este parâmetro está intimamente ligado ao tempo de vida útil do produto e às complicações da saúde humana. De acordo com os resultados obtidos, faz-se necessária a realização de mais pesquisas e análises acerca da qualidade do açúcar do grupo I, classe “bruto” e tipo mascavo, envolvendo diferentes marcas a fim de rastrear a padronização do produto e promover o aprimoramento deste. Com base nos resultados encontrados, convém recomendar acompanhamento dos órgãos de vigilância e maior fiscalização quanto à qualidade higiênica dos açúcares comercializados tanto em feiras quanto em supermercados, visto que são produtos de largo consumo na cidade de Manaus/AM, com o propósito de dificultar a viabilidade de microrganismos, especialmente os com potencial toxigênico.

### Referências

- Amaral KAS, Nascimento GB, Sekiyama BL, Janeiro V, Machinski Jr M 2006. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 26(2):336-342.
- Coultrate TP 2004. *Alimentos: a química de seus componentes*. 3 ed. Porto Alegre: ArtMed.
- Generoso WC 2009. *Avaliação microbiológica e físico-química de açúcares mascavo comerciais*. Revista do Instituto Adolfo Lutz, vol. 68. São Paulo.
- Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO. 2016. Produtos analisados [online]. Brasil, Disponível em: < [www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/acucar.asp](http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/acucar.asp) > Acesso em: 26 de abril de 2018.
- Lima EE 2006. *Alimentos orgânicos na alimentação escolar pública catarinense: um estudo de caso*. Florianópolis (SC): UFSC, 2006. 141 p.
- Machado SS 2012. *Tecnologia da fabricação do açúcar*. IFAM. Inhumas/GO.
- Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa N° 42, 13 de novembro de 2017.
- Santos RF, Borém A, Caldas C 2010. *Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool – tecnologias e perspectivas*. Viçosa, MG, UFV, 577 p.
- Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. 2007. *Manual de métodos de análises microbiológicas em alimentos*. 3 ed. São Paulo: Livraria Varela, 552 p.
- Vieira, S 2015. *Introdução à bioestatística*. Editora: Elsevier Brasil, 5 ed.
- Storel Júnior 2003. *A potencialidade do mercado de açúcar orgânico para a agroindústria canavieira do estado de São Paulo*. Campinas: UNICAMP/IE. 153 p.
- Verruma-Bernardi MR, Borges MTMR, Lopes CH, Modesta RCD, Antonini S 2007. Avaliação microbiológica, físico-química e sensorial de açúcares mascavos comercializados na cidade de São Carlos – SP. *Brazilian Journal of Food Technology*. Campinas, 10:205–211.

## Presença de coliformes em saladas cruas comercializadas em supermercados na cidade de Manaus-AM

Amanda Saraiva Fermin Carvalho<sup>1\*</sup>, Kedma Gaspar Klehm<sup>1</sup>, Erica Oliveira de Souza<sup>1</sup>, Keila Dayane do Espírito Santo Pereira<sup>2</sup>, Cristiany de Moura Apolinário e Silva<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Especialista em Microbiologia Geral, Escola Superior Batista do Amazonas

<sup>2</sup> Doutoranda em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas

<sup>3</sup> Mestre em Biologia de Água Doce e Pesca Interior, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia

Emails: <sup>1\*</sup>amandafermin@gmail.com, <sup>3\*</sup>cristianysilva@yahoo.com.br

### Resumo

A modernização durante o último século resultou em urbanização juntamente com modificações nos estilos de vida e hábitos alimentares. As hortaliças ganham importância no cardápio por serem fontes de micronutrientes, fibras e de outros componentes. A proliferação de microrganismos na salada crua ocorre devido ao seu teor de água, que favorece o crescimento de leveduras e bactérias, pH ácido, favorecendo o crescimento de fungos, a alta manipulação durante o preparo, podendo levar à contaminação por microrganismos indicadores, além de condições inadequadas de temperatura durante o armazenamento. O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica de saladas cruas e as condições higiênic-sanitárias através de ocorrência de microrganismos indicadores, como coliformes totais e termotolerantes. Foram adquiridas 15 amostras de saladas cruas de diferentes supermercados, que apresentaram crescimento de coliformes totais em todas as amostras e, crescimento de coliformes termotolerantes em amostras provenientes de quatro estabelecimentos. Avaliando os resultados, foi possível concluir que as amostras se encontram fora dos parâmetros preconizados pela RDC 12/2001 da ANVISA, não estando adequadas para o consumo, demonstrando que boas práticas devem ser implantadas e fiscalizadas durante a produção e venda desses alimentos.

**Palavras-chave:** Análise microbiológica, Salada crua, Grupo coliforme.

### Introdução

As alterações no padrão de consumo de alimentos são bastante perceptíveis quando comparado ao padrão de consumo da primeira metade do século XX. Antes os alimentos eram produzidos, servidos e consumidos no momento e com ingredientes frescos de origem local, e tinham um baixo risco de contaminação, sendo mais saudáveis (Santos e Campos Cunha, 2007).

A modernização durante o último século resultou em urbanização, juntamente com modificações nos estilos de vida e hábitos alimentares (Pasha *et al.*, 2014), aliada à falta de tempo disponível para a preparação dos alimentos e/ou para o consumo, o que vem despertando a preferência dos consumidores por refeições mais convenientes no que se refere à facilidade de aquisição e preparo (Baltazar *et al.*, 2006).

As hortaliças ganham importância no cardápio por oferecerem uma alimentação balanceada, pois são fontes de micronutrientes, fibras e de outros componentes com propriedades funcionais que ajudam a melhorar o funcionamento do organismo (Rolls *et al.*, 2004).

De acordo com Zandonadi *et al.* (2007), a contaminação dos alimentos se inicia na produção da matéria-prima e se estende às etapas de transporte, recepção, armazenamento e comercialização. Durante a manipulação pode haver contaminação por condições precárias de higiene de manipuladores, equipamentos, utensílios, ambiente e condições inadequadas de armazenamento dos produtos prontos para consumo.

A grande proliferação de microrganismos nas saladas cruas ocorre devido ao seu teor de água, que favorece o crescimento de leveduras e bactérias; pH ácido, favorecendo o crescimento de bolores e leveduras; a alta manipulação durante o preparo, podendo levar à contaminação por microrganismos indicadores; além de condições inadequadas de temperaturas durante o armazenamento (Franco e Landgraf, 2008).

Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) são todas as ocorrências clínicas consequentes da ingestão de alimentos que possam estar contaminados com microrganismos patogênicos (infecciosos, toxigênicos ou infestantes), substâncias químicas, objetos lesivos ou que contenham em sua constituição, estruturas naturalmente tóxicas, ou seja, são doenças consequentes da ingestão de produtos biológicos, químicos ou físicos presentes nos alimentos (Silva Junior, 2014). Existem mais de 250 tipos de DTA e a maioria é a infecção causada por bactérias e suas toxinas, vírus e parasitas (Brasil, 2014). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que, a cada ano, mais de dois milhões de pessoas morram por doenças diarreicas, muitas das quais adquiriram ao ingerir alimentos e/ou água contaminados (Brasil, 2014).

Para garantir a segurança desses alimentos, a Resolução - RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (Brasil, 2001), estabeleceu padrões microbiológicos em relação às bactérias *Salmonella* spp e coliformes a 45°C. Segundo tais padrões, hortaliças cruas não devem apresentar *Salmonella* spp em 25 g de produto e, para coliformes, a tolerância para amostra indicativa é de  $10^2$  NMPg<sup>-1</sup>.

Coliformes são definidos como bactérias tipo bastonetes gram-negativos aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, não-formadores de endósporos (Tortora, 2017). O grupo dos coliformes totais é um subgrupo da família Enterobacteriaceae, que inclui 44 gêneros e 176 espécies. No grupo dos coliformes totais estão apenas as enterobactérias capazes de fermentar a lactose com produção de gás em 24 a 48 horas a 35 °C. O grupo dos coliformes termotolerantes é um subgrupo dos coliformes totais, restrito aos membros capazes de fermentar a lactose em 24 horas a 44,5-45,5 °C, com produção de gás. São microrganismos indicadores usados para avaliar a segurança e higiene dos alimentos (Silva *et al.*, 2010).

Microrganismos indicadores são grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento de alimentos de origem vegetal ou animal (Franco e Landgraf, 2008).

A produção de alimentos seguros deve gerar produtos microbiologicamente estáveis. É necessário certificar-se de que nenhum microrganismo do alimento vai se multiplicar até doses infecciosas (Forsythe, 2013).

Portanto há uma grande importância em avaliar as condições higiênico-sanitárias e qualidade microbiológica de saladas cruas comercializadas em supermercados, por ser este um alimento muito manipulado favorecendo a proliferação de microrganismos.

Diante do exposto objetivou-se avaliar a qualidade microbiológica de saladas cruas e as condições higiênico-sanitárias pela ocorrência de microrganismos indicadores, como Coliformes Totais e Termotolerantes, comercializadas na cidade de Manaus-AM.

## Material e Métodos

O material utilizado nesse estudo estava sendo comercializado em supermercados da Cidade de Manaus-AM, onde foi feita a aquisição das saladas cruas prontas para o consumo em cinco pontos na zona centro-sul da cidade. Em cada estabelecimento foram adquiridas três amostras, imediatamente identificadas e transportadas em embalagem para viagem, conforme cada estabelecimento, até o Laboratório Multidisciplinar da Esbam para realização das análises. De cada amostra foram pesados 25 g da salada crua, adicionados 225 mL de água peptonada a 0,1 % esterilizada e procedeu-se à homogeneização das amostras, obtendo a diluição inicial  $10^{-1}$ . Em seguida, preparou-se diluições decimais sucessivas até  $10^{-3}$  (Silva *et al.*, 2007).

Foram preparados os meios de cultura M Endo Agar® e M FC Agar® de acordo com as instruções do fabricante e vertido em placas de Petri, em ambiente asséptico usando-o ao solidificar (Silva *et al.*, 2010).

Para a determinação de coliformes totais e coliformes termotolerantes, foram transferidos 0,1 mL da diluição  $10^{-3}$  das amostras para as placas de Petri contendo os meios de cultura específico, espalhando o

inóculo por toda a superfície do meio. Incubou-se em estufa bacteriológica a 35 °C para Coliforme total e 45 °C para Coliforme termotolerante, ambos por 48 h para o desenvolvimento das colônias.

Todo o material utilizado para o processamento das amostras estava esterilizado e todo procedimento foi realizado próximo ao bico de Bunsen com a chama a meia altura em uma câmara de fluxo laminar (Silva *et al.*, 2007).

Os resultados foram considerados positivos quando houve formação de colônias com características compatíveis ao de Coliformes Totais (colônias verde com brilho metálico) e Coliformes Termotolerantes (colônias azuis para fecal e colônias cinza a cor creme para não fecal), sendo então realizadas as contagens das colônias e expressas em UFC/g (Unidades Formadoras de Colônias por gramas).

## Resultados e Discussão

Foram analisadas 15 amostras de saladas cruas comercializadas em cinco supermercados da cidade de Manaus-AM através da metodologia de plaqueamento em superfície. Os estabelecimentos um, dois, três, quatro e cinco ficam localizados em uma das principais ruas dos bairros: Adrianópolis, Nossa Senhora das Graças, Adrianópolis, Nossa Senhora das Graças e Parque 10 de Novembro respectivamente.

Os resultados da pesquisa para coliforme total encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1.** Contagem das Unidades Formadoras de Colônias de Coliforme Total em amostras de salada crua comercializada na cidade de Manaus-AM.

Estabelecimento	Frequência de UFC/g por aquisição		
	Coliforme Total		
	1ª aquisição	2ª aquisição	3ª aquisição
1	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>
2	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>
3	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>
4	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>
5	3,1 x 10 <sup>4</sup>	5,4 x 10 <sup>4</sup>	3,6 x 10 <sup>4</sup>
LMA	-	-	-

Legenda: LMA= Limite Máximo Aceitável (RDC Nº 12, 2001).

Na tabela 2 estão representados os resultados obtidos na pesquisa de coliformes termotolerantes. Observa-se que nos cinco estabelecimentos analisados, as amostras apresentaram contagem elevada de coliformes totais. A RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 não estabelece limites de tolerância para o grupo dos coliformes totais em saladas cruas. Entretanto, a presença desses microrganismos evidencia condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, podendo-se considerar que os cinco estabelecimentos praticam de forma incorreta a higienização das hortaliças, colocando em risco a saúde dos consumidores (Mallet *et al.*, 2017).

**Tabela 2.** Contagem das Unidades Formadoras de Colônias de Coliforme Termotolerante em amostras de salada crua comercializada na cidade de Manaus-AM.

Estabelecimento	Frequência de UFC/g por aquisição		
	Coliforme Termotolerante		
	1ª aquisição	2ª aquisição	3ª aquisição
1	Aus.	Aus.	Aus.
2	3,0 x 10 <sup>3</sup>	4,0 x 10 <sup>3</sup>	9,0 x 10 <sup>3</sup>
3	5,0 x 10 <sup>3</sup>	Aus.	Aus.
4	Aus.	Aus.	1,0 x 10 <sup>3</sup>
5	1,0 x 10 <sup>3</sup>	1,0 x 10 <sup>4</sup>	6,0 x 10 <sup>3</sup>
LMA	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>

Legenda: LMA= Limite Máximo Aceitável (RDC Nº 12, 2001); Aus=Ausente

Segundo Monteiro (2016), a elevada contaminação das saladas prontas para consumo pode ser atribuída a uma contaminação inicial elevada, a ações de higiene inadequadas e condições inconvenientes de temperatura durante o acondicionamento. De acordo com Lima *et al.* (2003) a utilização de soluções cloradas, controle de temperatura e processamento por radiação gama constitui uma combinação de procedimentos que podem contribuir para a melhoria da qualidade microbiológica de vegetais minimamente processados.

A pesquisa realizada por Rocha *et al.* (2014) com saladas cruas adquiridas em restaurantes da cidade de Teresina-PI obteve resultados semelhantes ao nosso, já que 100% das amostras apresentaram índices elevados de contaminação por coliformes totais, fato relatado também por Santos *et al.* (2015) ao analisar saladas cruas e cozidas comercializadas em Cruz das Almas, Bahia.

Nas amostras obtidas nos supermercados identificados de 1 a 4 temos uma quantidade de colônias que ultrapassa o limite superior da contagem significativa, que segundo Schortemeyer *et al.* (1996) é de 300.

Observa-se que amostras dos estabelecimentos dois a cinco apresentaram presença de coliformes a 45°C de origem fecal, sendo considerada em desacordo com a legislação vigente estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2001), que estabelece um parâmetro máximo de 10<sup>2</sup> UFC/g para hortaliças cruas. Então, de acordo com a legislação, tais amostras foram consideradas como “produtos em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias” para o consumo. Os coliformes fecais são microrganismos que podem ser encontrados nas fezes. Uma pessoa que ingere alimentos contaminados por coliformes fecais pode apresentar sintomas desde uma diarreia, náuseas e vômitos, até mesmo uma infecção urinária (Franco e Landgraf, 2008).

A presença de coliformes nas amostras analisadas indicam que os comerciantes deveriam conhecer e seguir a RDC n° 216, de 15 de setembro de 2004, que dispõe sobre regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentação a fim de garantir as condições higiênico-sanitárias do alimento preparado (Brasil, 2004).

Observa-se também que é essencial a implementação de ações que fiscalizem as condições higiênico-sanitárias de supermercados, a fim de promover a distribuição de alimentos seguros aos consumidores.

## Conclusões

A qualidade microbiológica das saladas cruas comercializadas em supermercados na cidade Manaus-AM foi insatisfatória, de acordo com as normas da ANVISA, devido à ocorrência de contaminação por coliformes totais e termotolerantes, indicando falta de condições higiênico-sanitárias durante o preparo do alimento analisado.

As condições higiênico-sanitárias são indispensáveis durante o preparo de saladas e a manipulação incorreta pode comprometer a qualidade final desse produto. Os surtos causados por microrganismos podem causar doenças graves, sobretudo em crianças, idosos e imunodeprimidos.

## Referências

- ANVISA Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2001. Resolução RDC n° 12, de 02 de janeiro de 2001. Dispõe sobre os princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: < <http://www.vigilanciasanitaria.gov.br/anvisa.htm>. Acesso em: 27 mai. 2018.
- ANVISA Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2004. Resolução RDC n° 216, de 15 de setembro de 2004. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 15 set. 2004, Seção 1, 25p.
- Baltazar, C, Shimosako HJ, Amaku M, Pinheiro SR, Perondi AT 2006. Avaliação higiênico sanitária de estabelecimentos da rede fast food no município de São Paulo. *Revista Higiene Alimentar*. 20 (142):46- 51.
- Brasil. Ministério da Saúde. 2014. Descrição da Doença. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/>. Acesso em: 27 mai. 2018.
- Brasil. Ministério da Saúde. 2014. Doenças transmitidas por alimentos. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/>. Acesso em: 27 mai. 2018.

- Forsythe, S. J. 2013. *Microbiologia da Segurança dos Alimentos*. Porto Alegre: Artmed, 2ª edição.
- Franco, BDGM, Landgraf M 2008. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu.
- Lima KSC, Lima ALS, Luchese RH, Godoy RLO, Sabaa-Srur AUO 2003. Cenouras minimamente processadas em embalagens com atmosferas modificadas e tratadas com radiação gama: avaliação microbiológica, físico-química e química. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23(2):240-250.
- Mallet ACT, Rocha KS, Oliveira CF, Saron MLG, Souza EB 2017. Avaliação microbiológica de saladas cruas servidas em restaurantes do tipo self-service do município de Volta Redonda (RJ). *Cadernos UniFOA, Volta Redonda*, n. 34, 89-96p.
- Monteiro SEA 2016. *Avaliação da qualidade microbiológica de saladas prontas para consumo comercializadas na região de Lisboa*. Lisboa, Portugal. (MSc Dissertação. Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa).
- Pasha I, Saeed F, Sultan MT, Khan MR, Rohi M 2014. Recent Developments in Minimal Processing: A Tool to Retain Nutritional Quality of Food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54 (3), 340-351p.
- Rocha ANF, Soares RP, Beserra ML S. 2014. Análise microbiológica de saladas cruas em restaurantes em Teresina-Pi. *R. Interd.* v. 7, n. 2, abr. mai. jun, 11-17p.
- Rolls BJ, Tohill BC, Ello-Martin, JA 2004. What can intervention studies tell us about the relationship between fruit and vegetable consumption and weight management. *NutrReviews*, v.62, n.1, 1-17p.
- Santos MS, Evangelista-Barreto NS, da Silva RAR, Reis NA, de Sousa Bernardes F 2015. Risco microbiológico no consumo de saladas cruas e cozidas servidas em restaurantes self-service em Cruz das Almas, Bahia, Brasil. *Magistra*, 27(2), 245-252p.
- Santos I, Cunha IC. 2007. Patogênicos Emergentes em Alimentos. *Segurança e Qualidade Alimentar*, 2:10-13.
- Silva Junior EA 2014. *Manual de Controle Higiênico Sanitário em Serviços de Alimentação*. 7 ed., São Paulo, Varela.
- Silva N, Christina V, Ferraz N, Hiromi M, Francisco R, Abeliar R 2007. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos*. 3 ed., São Paulo, Varela. 91p.
- Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. 2010. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água*. 4 ed., São Paulo, Varela. 580p.
- Schortemeyer M, Hartwing UA, Hendrey GR, Sadowsky MJ 1996. Microbial community changes in the rhizospheres of white clover and perennial ryegrass exposed to free air carbon dioxide enrichment (face). *Soil Biology and Biochemistry*, v.28, 1717-1724p.
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL, Daian DSO, Dorvillé LFM. 2017. *Microbiologia*. Editora Artmed, 12ª Edição, Porto Alegre.
- Zandonadi RP, Botelho RBA, Sávio KEO, Akutsu RC, Araújo WMC 2007. Atitudes de risco do consumidor em restaurantes de auto serviço. *Revista de Nutrição*. Campinas, 20(1):19 - 26.

## Produção de pigmentos do tipo azafilonas por *Penicillium sclerotiorum*

Danielle Rolim Guimarães<sup>1</sup>, Thiago Fernandes Sousa<sup>1</sup>, Célio Fernando Figueiredo Angolini<sup>2</sup>, Afonso Duarte Leão Souza<sup>3</sup>, Felipe Moura Araújo da Silva<sup>3</sup>, Antonia Queiroz Lima de Souza<sup>4</sup>, Gilvan Ferreira da Silva<sup>5</sup>, Hector Henrique Ferreira Koolen<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Discentes da Graduação em Ciências Biológicas, Escola Normal Superior, Universidade do Estado do Amazonas

<sup>2</sup> Pesquisador da Universidade Estadual de Campinas

<sup>3</sup> Pesquisador e Docente do Departamento de Química da Universidade Federal do Amazonas

<sup>4</sup> Pesquisadores e Docentes do Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais, Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas

<sup>5</sup> Pesquisador da EMBRAPA Amazônia Ocidental

Emails: drg.bio17@uea.edu.br, hkoolen@uea.edu.br

### Resumo

Fungos são seres vivos que apresentam grande importância ecológica, econômica e industrial. Estes são conhecidos por serem capazes de biossintetizar metabólitos secundários úteis, especialmente para as indústrias farmacêutica e alimentícia. Dentre os biocompostos produzidos por esses organismos estão as azafilonas, pigmentos naturais com atividade antimicrobiana extraídos de fungos de diversos gêneros, entre eles o *Penicillium*. Considerando o potencial biotecnológico das espécies deste gênero e dos metabólitos produzidas por elas, este trabalho apresenta técnicas indutoras de desvios metabólicos (OSMAC) utilizadas no cultivo do fungo *Penicillium sclerotiorum*, endofítico isolado da planta *Duguetia stelechantha* (Annonaceae). Por meio desta estratégia, concluiu-se que meios pobres em carbono estimulam o acúmulo de pigmentos nas células. Por meio da espectrometria de massas, cinco azafilonas foram identificadas como os constituintes majoritários do extrato.

**Palavras-chave:** Metabolismo microbiano, pigmentos, policetídeos.

### Introdução

Os fungos endofíticos colonizam os tecidos internos das plantas por pelo menos um período do seu ciclo de vida sem causar sintomas visíveis. Neste tipo de associação mutualística ocorre uma especializada e complexa comunicação química na qual nenhum dos parceiros interagentes é prejudicado. Além disso, benefícios individuais ocorrem para ambos os organismos (Zhang *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2011; Kusari *et al.*, 2012).

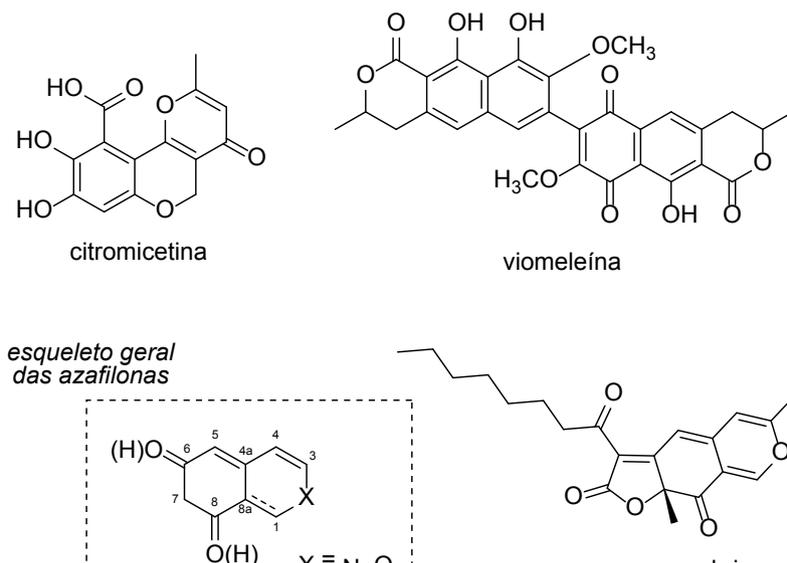
Estes organismos vêm sendo amplamente investigados quimicamente por sua capacidade de biossintetizar metabólitos secundários das mais diversas classes. Substâncias estas, que em certas situações podem ser utilizadas pela hospedeira como uma defesa química (Zhang *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2011; Kusari *et al.*, 2012; Meng *et al.*, 2015; Spiteller, 2015).

Em outras situações, os fungos incorporam parte do material genético de sua hospedeira operando como verdadeiros produtores de metabólitos especializados outrora apenas produzidos pelas plantas (Zhang *et al.*, 2006). Vários desses metabólitos são fármacos de interesse industrial, o que só aumenta o interesse biotecnológico por estes organismos. Alguns exemplos clássicos desta interação denominada transferência gênica horizontal são a produção de paclitaxel por *Taxomyces andreanae* (Stierle *et al.*, 1993) e de desoxipodofilotoxina por *Aspergillus fumigatus* (Kusari *et al.*, 2009).

Dentre os fungos mais frequentemente encontrados como endofíticos, destacam-se os representantes do gênero *Penicillium* (Zhang *et al.*, 2006; Mapari *et al.*, 2010; Meng *et al.*, 2011). Estes organismos são responsáveis por produzir, em determinadas circunstâncias, grandes quantidades de metabólitos secundários com as mais diversas atividades, tais como antibacteriana, anticâncer, antifúngica, inseticida,

herbicida, dentre outras. Além deste potencial, este gênero destaca-se pela produção de pigmentos das mais variadas cores e classes químicas (Guo *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2013).

Dentre os principais pigmentos com potencial na indústria alimentícia isolados de *Penicillium* spp. encontram-se moléculas como: citromicetina, viomeleína e em especial, uma série de compostos denominados azafilonas, tendo como principal representante o composto monascorubrina (Figura 1).



**Figura 1.** Estruturas químicas de alguns pigmentos fúngicos não-tóxicos e estrutura geral das azafilonas.

Na Ásia, esta classe de compostos é utilizada há séculos para colorir o arroz (Mapari *et al.*, 2010). Além do potencial colorífico, certas azafilonas possuem variadas propriedades biológicas como antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória e redutora do colesterol, esta última responsável por incluir esta classe como um nutraceutico (Mapari *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2013).

O objetivo desse trabalho foi utilizar uma abordagem de OSMAC (*One Strain Many Compounds*) no cultivo do fungo endofítico *Penicillium sclerotiorum*, variando os meios de cultura e a oxigenação com o intuito de otimizar a produção de metabólitos secundários do mesmo.

## Material e Métodos

O fungo *Penicillium sclerotiorum* (código DgC3.2.2) foi isolado no Laboratório de Bioensaios e de Microrganismos (LABMICRA) da Universidade Federal do Amazonas a partir do caule da planta *Duguetia stelechantha* (Annonaceae). Para esta etapa, o material vegetal (fragmentos de 5 mm x 5 mm) passou por assepsia em uma câmara de fluxo laminar. O procedimento ocorreu por meio de imersão em álcool 70% por 1 minuto, em hipoclorito 2.5% por 4 minutos e novamente em álcool 70% por 2 minutos (Souza *et al.*, 2004). Ao final, os fragmentos foram lavados por imersão em água destilada esterilizada e inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (200 g/L de batata, 20 g/L de dextrose e 15 g/L de ágar) com o antibiótico terramicina a 4%. Após o inóculo, as placas foram incubadas em câmaras do tipo demanda bioquímica de oxigênio (BOD) a 26 °C, e a cada 24 horas foi realizada a verificação do crescimento fúngico, seguido de sucessivos repiques.

A purificação das cepas fúngicas se deu por meio da obtenção de culturas monospóricas. Esta etapa foi feita através de diluições seriadas dos esporos (Petrini *et al.*, 1993). As colônias puras foram preservadas conforme metodologia de Castellani (De Capriles *et al.*, 1989) e depositadas na coleção de microrganismos do LABMICRA e cedida pela Dra. Antonia Souza para o Grupo de Pesquisa em Metabolômica e Espectrometria de Massas (MMSRG) da UEA.

A caracterização em nível de gênero foi realizada por microcultivo e análise das estruturas reprodutivas por microscopia ótica. Em seguida, o isolado monospórico foi cultivado em meio líquido batata dextrose levedura (BDL, batata 200 g/L, dextrose 10 g/L, extrato de levedura 2 g/L) sob agitação a 150 rpm e 28 °C para obtenção de massa micelial. Após a separação das células do caldo fermentado por meio de filtração à vácuo, o ácido desoxirribonucleico (DNA) total foi obtido conforme o protocolo de extração por detergente catiônico 2% (Doyle e Doyle, 1987). A integridade do DNA extraído foi visualizada por meio de gel de agarose 0,8% (m/m), quantificada em um espectrofotômetro UV-Vis modelo NanoDrop 2000 e logo após diluída para a concentração de 100 ng/μL.

A identificação molecular dos isolados foi feita com base na região do espaçador interno transcrito e domínios D1/D2 da região 28S do rDNA utilizando-se os primers ITS 1F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), (Arnheim *et al.*, 1990). Os amplicons esperados foram fragmentos de aproximadamente 700 pares de bases correspondentes à região ITS. Reações de PCR foram realizadas utilizando 100 ng do DNA total; 0,5 pmol de cada primer; 1X de tampão de reação (100 mM Tris-HCl (pH 8,8 a 25 °C), 500 mM KCl, 0,8% (v/v) Nonidet P40); 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1 mM de dNTPs e uma unidade de Taq DNA polimerase (DNA Express) para um volume final de 25 μL. As condições de PCR foram: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento 57 °C por 1 min., extensão a 72 °C por 1,5 min, seguido de extensão final a 72 °C por 5 min.

Os amplicons gerados foram visualizados em gel de agarose com auxílio do marcador 1kb para confirmar a amplificação apenas da região de interesse. Os produtos de PCR foram tratados com polietilenoglicol (PEG 20%) e sequenciadas usando o kit BigDye™ Terminator v3.1, no 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™) conforme recomendações do fabricante. A sequência consenso para cada locus foi obtida com base no sequenciamento das fitas *forward* (F) e *reverse* (R) utilizando-se o programa DNA Baser v.4.36 (<http://www.dnabaser.com/>) para montagem de contig. o Alinhamento das sequências obtidas foi realizado utilizando-se a ferramenta nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências foram depositadas no GenBank.

Para a avaliação das condições de cultivo, esporos do fungo *P. sclerotiorum* (50 μL) foram inoculados em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL contendo 125 mL de diferentes meios de cultura (Tabela 1). Os cultivos ocorreram a 26 °C avaliando-se a influência de oxigenação constante (agitação em shaker à 180 rpm) e reduzida (estático) durante 28 dias.

Após este período, uma filtração a vácuo foi realizada para separar o micélio do caldo fermentado. Em seguida, o meio líquido contendo os metabólitos foi extraído com acetato de etila por meio de procedimento de partição líquido-líquido (125 mL, 1:1 v/v), enquanto que os metabólitos presentes no micélio foram extraídos com metanol (125 mL).

**Tabela 1.** Diferentes meios de cultura para a variação da fonte de carbono e condições de cultivo de *P. sclerotiorum* (DgC3.2.2).

Meio de cultura	Composição em água	Fonte primária de carbono
BDL	batata (200 g/L) D-glicose anidra (20 g/L) extrato de levedura (2 g/L)	carboidratos livres (glicose, arabinose, xilose), polissacarídeos (pectina)
ISP2	amido de milho (4 g/L) extrato de levedura (4 g/L) extrato de malte (10 g/L)	polissacarídeos (amilose e amilopectina)
Czapek modificado	D-glicose anidra (10 g/L) sulfato de ferro III (10 mg/L) nitrato de sódio (3 g/L) fosfato de potássio bibásico (1 g/L) sulfato de magnésio (500 mg/L) cloreto de potássio (500 mg/L)	carboidrato livre (glicose)
Malte	extrato de malte (20 g/L)	dissacarídeo (maltose)
Meio de Carne	extrato de carne (20 g/L) D-glicose anidra (20 g/L)	hidrolisado proteico (aminoácidos)

As caracterizações dos pigmentos produzidos foram realizadas em um sistema de LC-MS/MS 6550 iFunnel da Agilent, constituído de um cromatógrafo de alta performance acoplado a um espectrômetro de massas com geometria do quadrupolo tempo de voo (Q-TOF). A técnica de ionização utilizada foi a eletrospray (ESI) e os parâmetros de ionização foram os seguintes: voltagem do capilar, 4000 V; tensão do bocal, 0 V; fragmentador, 100 V; skimmer (capilar de transferência), 65 V; temperatura do gás, 275 °C; vazão de gás, 14 L/min; nebulizador, 45 psi. A temperatura do auto-amostrador foi mantida a 20 °C e o volume de injeção foi de 10 µL.

A separação dos compostos foi realizada em uma coluna Poroshell 120 EC-C18 (Dimensões 50 mm x 4.6 mm, diâmetro da partícula 2.7 µm) utilizando uma fase binária (solvente A: água, solvente B: metanol) para as separações. A eluição em gradiente a 30 °C foi a seguinte: 0-2 min, 5% B; 2-15 min, 5-60% (v/v) B; 15-25 min, 60-70% (v/v) B; 25-35 min, 70-100% (v/v) B; 35-50 min, 100% de B a uma vazão de 0,4 mL/min. As identificações foram realizadas por meio da interpretação manual dos espectros de MS/MS em comparação com a literatura adequada. Os espectros obtidos foram processados utilizando-se o software Mass Hunter Qualitative Analysis versão B.07.00.

Ao final, o solvente foi removido por meio de roto-evaporação à vácuo e os extratos totalmente secos em dessecadores contendo sílica granular para remoção da umidade. O rendimento de produção de pigmento foi calculado em porcentagem através da equação:

$$\% \text{ rendimento} = \frac{\text{massa da fonte de carbono}}{\text{massa de extrato obtido}} \times 100\%$$

## Resultados e discussão

A avaliação da produção de pigmentos foi realizada por meio do cálculo de rendimento de extrato obtido contendo metabólitos (azafilonas). Inicialmente observou-se que durante o crescimento fúngico os pigmentos eram acumulados nas células (micélio) e que ao longo do tempo de crescimento estes eram excretados para o meio de cultura. Também se observou que a produção dos pigmentos (alteração nos padrões de cor) atinge seu ponto máximo a partir do vigésimo terceiro dia, fato este que se deu pela observação da mudança de intensidade da cor do meio de laranja claro para um vermelho escuro em um período de 72 horas (Figura 2).

Após verificadas as condições do tempo de cultivo, extratos foram produzidos para cada condição ao fim de 28 dias. Em relação ao total da massa do extrato obtida a partir do caldo fermentado (extrólitos), o cultivo no meio ISP2 sob agitação foi o mais promissor. Nesta situação, foram obtidos 747 mg de extrato de pigmentos, o que representa um rendimento de 4,15% (m/m).

Entretanto, o meio em Czapek em modo estático, ainda que menos rico em nutrientes e com pouca oxigenação nesta condição, apresentou a recuperação de 519 mg de extrato. Considerando a massa de fonte de carbono que neste último é apenas a glicose, este é o meio com o maior rendimento. Foram

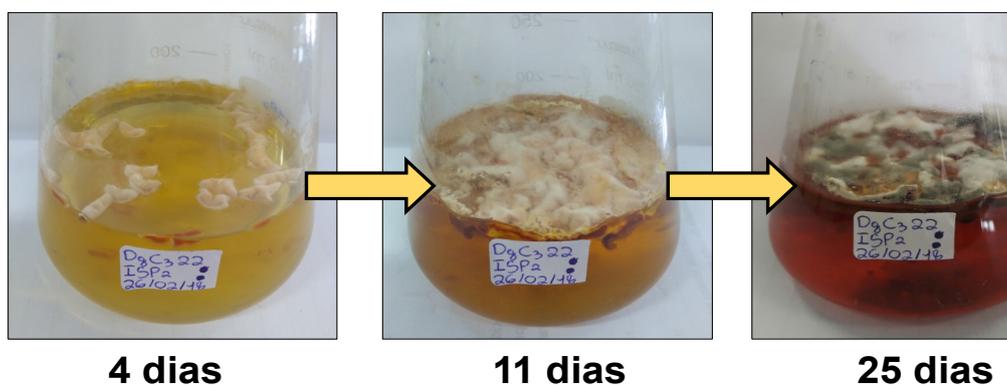


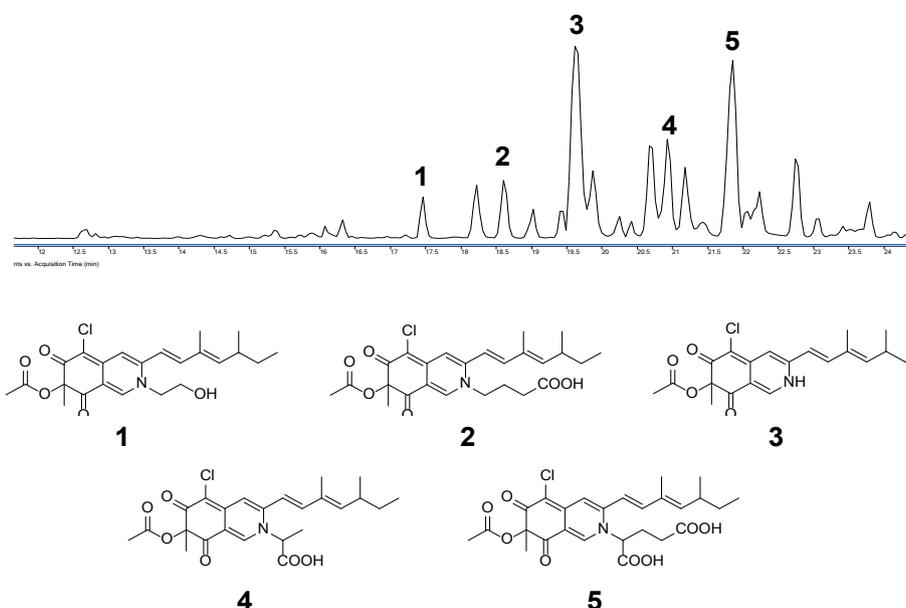
Figura 2. Crescimento estático do isolado no meio de cultura ISP2 no qual pode-se observar a pigmentação do meio.

recuperados do caldo, cerca de 5,19% (m/m) da massa fornecida na forma de pigmentos. No geral, houve alternância no modo de fermentação. Para o cultivo estático, os meios de cultura BDL e Czapek foram melhores, enquanto que os meios ISP2 e extrato de carne proporcionaram mais pigmentos sob agitação. Os resultados obtidos neste trabalho apresentam rendimentos comparáveis aos das produções de azafilonas pelos fungos *Penicillium* sp. TA85S (Ogihara *et al.*, 2000) e ao da recém descoberta espécie *Talaromyces atroseus* (Frisvad *et al.*, 2013).

Tendo em vista que os pigmentos estudados neste trabalho foram excretados para o meio fermentado a partir da segunda semana, os micélios também foram analisados quanto ao seu rendimento. Para os cultivos estáticos, o micélio acumulou mais pigmentos em todos os meios de cultura, com exceção do Czapek. Curiosamente, quando submetido à agitação, o mesmo meio passou a ter o maior rendimento, cerca de 12,8% (m/m). Desta forma, escolheu-se o meio em Czapek para as identificações das azafilonas presentes mediante cultivo sob agitação e nas células desta cepa (micélio, metabólitos intracelulares).

Ao ser submetida às análises por LC-MS/MS, o extrato do micélio de *P. sclerotiorum* em Czapek apresentou uma alta complexidade. Em torno de 30 picos foram detectados por espectrometria como sendo constituintes válidos deste extrato (Figura 3). A interpretação manual dos espectros de íons produtos indicou que a amostra é realmente dominada por azafilonas. Surpreendentemente, todos os picos que possuem relação com azafilonas apresentaram moléculas protonadas ( $[M + H]^+$ ) com razão massa/carga ( $m/z$ ) pares e padrão isotópico condizente à presença de um átomo de cloro na estrutura, estratégia que adotamos inspirada em metodologias recém descritas (Allard *et al.*, 2016), mas até então, não aplicadas para pigmentos do tipo das azafilonas.

O fato de apresentarem  $m/z$  pares confirmou que se tratam de azafilonas com um número ímpar de nitrogênios em suas estruturas (regra do nitrogênio). A análise dos dados obtidos de fragmentação por meio do experimento de varredura de íons produtos permitiu a identificação de cinco azafilonas cloradas neste extrato (Figura 3). Utilizando-se como modelo a fragmentação em fase gasosa do pico majoritário, a esclerotioramina (3), foram identificadas as azafilonas: isocromofilona VI (1), isocromofilona IX (2), 2(6H)-Isoquinolineacetic acid, 7-(acetyloxy)-5-chloro-3-(3,5-dimethyl-1,3-heptadien-1-yl)-7,8-dihydro- $\alpha$ ,7-dimethyl-6,8-dioxo- (4) e Pentanedioic acid, 2-[7-(acetyloxy)-5-chloro-3-(3,5-dimethyl-1,3-heptadien-1-yl)-7,8-dihydro-7-methyl-6,8-dioxo-2(6H)-isoquinolinyl]- (5). Estas azafilonas foram identificadas em algumas espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Diaporthe*, *Monascus* e *Penicillium* (Gao *et al.*, 2013).



**Figura 3.** Cromatograma de íons totais da análise por LC-MS/MS do extrato de pigmentos produzido por *Penicillium sclerotiorum* em meio Czapek e estruturas das azafilonas identificadas.

## Conclusões

A linhagem endofítica de *Penicillium sclerotiorum* é uma prolífica produtora de pigmentos com potencial biotecnológico.

Ao aplicar-se a técnica de OSMAC, verificou-se que uma fonte pobre de carbono baseada em glicose e que nela o nitrogênio fosse inorgânico permitiu a produção de metabólitos complexos. Nesta condição os pigmentos ficaram retidos em sua maioria no micélio (metabólitos intracelulares), possivelmente como reserva de carbono.

A análise química da condição com maior rendimento de produção revelou a presença de azafilonas nitrogenadas e cloradas como moléculas dominantes no extrato.

## Referências

- Allard PM, Péresse T, Bisson J, Gindro K, Marcourt L, Pham VC, Roussi F, Litaudon M, Wolfender JL 2016. Integration of molecular networking and in-silico MS/MS fragmentation for natural products dereplication. *Analytical Chemistry*, 88(6):3317-3323.
- Arnheim N, White T, Rainey WE 1990. Application of PCR: Organismal and population biology. *BioScience*, 40(3):174-182.
- De Capriles CH, Mata S, Middelveen M 1989. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia*, 106(1):73-79.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1):11-15.
- Frisvad JC, Yilmaz N, Thrane U, Rasmussen KB, Houbraken J, Samson RA 2013. *Talaromyces atroseus*, a new species efficiently producing industrially relevant red pigments. *PLoS ONE*, 8(12):84102.
- Gao JM, Yang SX, Qin JC 2013. Azaphilones: Chemistry and biology. *Chemical Reviews*, 113(7):4755-4811.
- Guo B, Wang Y, Sun X, Tang K 2008. Bioactive natural products from endophytes: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(2):136-142.
- Huang H, Feng X, Xiao Z, Liu L, Li H, Ma L, Lu Y, Ju J, She Z, Lin Y 2011. Azaphilones and p-terphenyls from the mangrove endophytic fungus *Penicillium chermesinum* (ZH4-E2) isolated from the south China sea. *Journal of Natural Products*, 74(5):997-1002.
- Kusari S, Hertweck C, Spiteller M 2012. Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. *Chemistry & Biology*, 19(7):792-798.
- Kusari S, Zühlke S, Spiteller M 2009. An Endophytic Fungus from *Camptotheca acuminata* That Produces Camptothecin and Analogues. *Journal of Natural Products*, 72(1):2-7.
- Mapari SAS, Thrane U, Meyer AS 2010. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? *Trends in Biotechnology*, 28(6):300-307.
- Meng L, Sun P, Tang H, Li L, Draeger S, Schulz B, Krohn K, Hussain H, Zhang W, Yi Y 2011. Endophytic fungus *Penicillium chrysogenum*, a new source of hypocrellins. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(2):163-165.
- Meng LH, Li XM, Liu Y, Wang BG 2015. Polyoxygenated dihydropyrano[2,3c]-pyrrole-4,5-dione derivatives from the marine mangrove-derived endophytic fungus *Penicillium brocae* MA-231 and their antimicrobial activity. *Chinese Chemical Letters*, 26(5):610-612.
- Ogihara J, Kato J, Oishi K, Fujimoto Y, Eguchi T 2000. Production and structural analysis of PP-V, a homologue of monascorubramine, produced by a new isolate of *Penicillium* sp. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 40(5):549-554.
- Petrini O, Sieber TN, Toti L, Viret O 1993. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins*, 1(3): 185-196.
- Souza AQL, Souza ADL, Filho SA, Pinheiro MLB, Sarquis MIM, Pereira JO 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazonica*, 34(2):185-195.
- Spiteller P 2015. Chemical ecology of fungi. *Natural Product Reports*, 32(7):971-993.
- Stierle A, Strobel GA, Stierle D 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 260(5105):214-216.
- Zhang WH, Song YC, Tan RX 2006. Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*, 23(5):753-771.

## Influência do meio de cultura no crescimento e características de algumas bactérias capazes de degradarem a lactose e o glúten

Nathasha Fernandes de Oliveira<sup>1</sup>, Mirna Sayuri Farias Miyamoto<sup>2</sup>,  
Cassiane Minelli-Oliveira<sup>1</sup>, Luiz Antonio de Oliveira<sup>2</sup>

<sup>1</sup> PPG Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Emails: nathhfer@gmail.com, mirna.miyamoto@inpa.gov.br, cassyminelli@gmail.com, luiz.oliveira@inpa.gov.br

### Resumo

Os microrganismos têm um metabolismo bastante diversificado e podem reagir de forma diferente quando colocados em condições diferentes de meios de cultura, temperatura, pH e pressão de oxigênio. Conhecer essas variações pode ser importante para entender como usam os nutrientes dos meios de cultura, principalmente quando se altera a fonte de carbono de proteínas para carboidratos e vice versa. Esse trabalho teve como objetivo, avaliar o crescimento e as modificações das colônias de seis bactérias capazes de degradar a lactose (carboidratos) e o glúten (proteínas) como forma de melhor entender seus metabolismos e potenciais biotecnológicos. Foram testadas as bactérias INPA BLG01, BLG22, BLG28, BLG52, BLG56 e BLG70. Houve influência dos meios de cultura nas taxas de crescimento e nas características das colônias das seis bactérias degradadoras de lactose e glúten. O meio cuja fonte de carbono é constituída de proteínas (glúten) foi o que mais favoreceu o crescimento das bactérias INPA BLG01, BLG22, BLG28, BLG52. Os Índices de Degradação do Glúten (IDG) dessas bactérias variaram de 0,0 a 2,42 após 24 horas de incubação e de 1,45 a 3,55 após 48 horas. As bactérias que apresentaram as maiores taxas de crescimento no meio com glúten foram as INPA BLG01, BLG22, BLG28. Todas as seis bactérias mostraram modificações quanto ao aspecto das colônias em decorrência da constituição da fonte de carbono do meio de cultura. Essas diferenças de características podem ser usadas para facilitar futuros estudos com essas bactérias.

**Palavras-chave:** Metabolismo microbiano, biotecnologia, microbiota amazônica.

### Introdução

Os microrganismos têm um metabolismo bastante diversificado e muitos reagem de forma diferente quando colocados em condições diversas de meios de cultura, temperatura, pH e pressão de oxigênio (Salanitro *et al.*, 1974; Son *et al.*, 2002; Cho e Giovannoni, 2004; Oliveira *et al.*, 2004; Leite, 2012).

Essas reações diferenciadas permitem selecionar aqueles de interesse econômico ou ecológico, dependendo do seu manancial enzimático e metabólico. Além disso, ao longo do tempo, essas respostas, de acordo com os meios de cultivo, serviram para separar e identificar com mais precisão, determinados microrganismos. Devido a isso, existem manuais e artigos relatando meios de cultura capazes de identificar grupos de microrganismos de acordo com suas características bioquímicas e fisiológicas (Zimbardo *et al.*, 2009; Atlas, 2010), facilitando o isolamento, seleção e caracterização daqueles de interesse humano. Apesar da relevância da morfologia de colônias bacterianas para o seu reconhecimento, poucos estudos são realizados com esse objetivo (Sousa *et al.*, 2013). Perceber as mudanças das características das colônias e dos microrganismos nos meios de cultura facilitam o trabalho de seleção e identificação dos mesmos.

Estudos iniciais realizados com bactérias capazes de degradar a lactose e o glúten, com potencial para serem usados futuramente como probióticos ou supridores de lactases e gluteases para indivíduos com intolerância à lactose e/ou Doença Celíaca indicaram mudanças de características nos meios contendo esses dois componentes como fontes de carbono (Minelli-Oliveira, 2017). Para um melhor entendimento dessas mudanças, foram realizados alguns testes visando mostrar algumas dessas modificações fisiológicas de seis dessas bactérias.

## Material e Métodos

Foram usadas as bactérias INPA BLG01, BLG22, BLG28, BLG52, BLG56 e BLG70, que em testes iniciais, mostraram mudanças de características quando colocadas para crescer em meios contendo lactose ou glúten como fontes de carbono (Minelli-Oliveira, 2017). As bactérias foram repicadas em placas de Petri contendo meio YMA (Vincent, 1970), substituindo o manitol pela lactose ou pelo glúten.

Com o auxílio de palitos de dentes esterilizados, foi retirada uma porção da colônia bacteriana, realizando-se um leve toque no meio de cultura; cada placa conteve cinco colônias como repetições. As placas foram incubadas a 37 °C e avaliadas 24 e 48 horas depois quanto ao crescimento microbiano e características das colônias. No caso do meio contendo glúten, também foi avaliado o halo de degradação usando um paquímetro digital. A avaliação nessa temperatura teve como finalidade, verificar a habilidade dessas bactérias em crescer e produzir metabólitos capazes de degradar o glúten na temperatura corporal humana.

A partir dessas medidas, foram obtidos os Índices de Degradação do Glúten (IDG) para cada bactéria, pela fórmula:  $DD$  (diâmetro da zona de degradação em mm)/ $DC$  (diâmetro da colônia em mm), adaptando-se os critérios e cálculos de Berraquero *et al.* (1976). Com base nos índices, os isolados foram classificados de acordo com a capacidade de degradação do glúten em: baixa ( $IDG < 2$ ), média ( $2 \leq IDG < 4$ ) e alta ( $IDG \geq 4$ ).

Além disso, foi realizada a caracterização visual das colônias bacterianas segundo as metodologias de Vincent (1970), Hungria e Araújo (1994), Prescott *et al.* (2004) e Malajovich (2015), como forma de conhecer melhor cada uma delas quando crescidas em cada um dos dois meios de cultura.

As avaliações das colônias dessas bactérias foram realizadas nos dois meios sólidos em placas de Petri, quanto ao crescimento lento (colônias visíveis apenas depois de quatro dias) e rápido (colônias visíveis em até três dias), diâmetro (pequena, média ou grande), forma da colônia (circular, irregular, rizóide, filamentososa ou puntiforme), elevação (côncava, elevada, ondulada, protuberante, achatada ou convexa), bordos (lisos, lacerados, lobados, filamentosos ou ondulados), estrutura (lisa, granulosa, filamentososa ou rugosa), brilho (transparente, translúcida ou opaca), coloração (incolor ou pigmentada) e aspecto (viscosa, úmida, membranosa, gelatinosa ou leitosa).

## Resultados e discussão

Houve diferença nos crescimentos das bactérias em resposta aos meios de cultura já na primeira avaliação, após 24 horas de incubação. No meio com glúten, as bactérias apresentaram um diâmetro médio quase o dobro (8,5 mm) do apresentado no meio com lactose (4,5 mm). Das seis bactérias, apenas as INPA BLG56 e BLG70 não mostraram diferença de crescimento nos dois meios de cultura. O mesmo comportamento foi observado após 48 horas de incubação. A única diferença perceptível foi o crescimento mais acelerado da INPA BLG22 no meio com glúten, que mostrou as maiores colônias, com média quase o dobro da segunda maior, a INPA BLG01. Com 24 horas, suas colônias apresentaram diâmetros iguais (13,3 mm). Devido a esse crescimento no meio com glúten, não foi possível avaliar adequadamente os diâmetros dos halos de degradação desse complexo proteico e nem calcular o seu Índice de Degradação do Glúten (IDG).

Essas diferenças de comportamentos das bactérias são devido às características intrínsecas da lactose e do glúten. A lactose (Galactose  $\beta$ -1,4 glucose) é um carboidrato característico do leite, sendo o constituinte predominante e menos variável da sua matéria seca. É o mais importante em quantidade dos sólidos não gordurosos (Veisseyre, 1988, Mattar e Mazo, 2010). É um dissacarídeo redutor sintetizado nas células alveolares das glândulas mamárias, formado por dois monossacarídeos, uma molécula de  $\alpha$ -D-glicose e uma de  $\beta$ -D-galactose.

O glúten, por outro lado, é um termo geral para definir as proteínas da farinha de trigo que são pouco solúveis em água. Do ponto de vista bioquímico, o glúten é uma mistura de quatro tipos de proteínas: albuminas, globulinas, gliadinas e gluteninas. As albuminas e globulinas correspondem a aproximadamente 15 % das proteínas, enquanto que os restantes 85 % são formados por proteínas monoméricas e poliméricas, denominadas gliadina e glutenina, dos quais 40% são gliadinas (Morón *et al.*, 2008).

Percebe-se, portanto (Tabela 1), que as bactérias INPA BLG01, BLG22 e BLG28 metabolizam as proteínas que constituem o glúten com mais eficiência do que o dissacarídeo lactose. Essa diferença de metabolismo também foi observada com menos intensidade na bactéria INPA BLG52, mas não houve diferença de metabolismo desses dois compostos pelas bactérias INPA BLG56 e BLG70.

Com relação à habilidade de degradarem o glúten, avaliadas pelos seus Índices de Degradação do Glúten (IDG), observa-se que variaram de 0,0 a 2,42 após 24 horas de incubação e de 1,45 a 3,55 após 48 horas, com a INPA BLG56 apresentando os maiores índices. Com base nos critérios de Berraquero *et al.* (1976), esses valores são considerados como baixos ou médios. No entanto, esse método não leva em conta, os tamanhos das colônias. As altas taxas de crescimento das bactérias INPA BLG01, BLG22 e BLG28 no meio contendo glúten indicam que elas apresentam altas capacidades de degradar esse complexo proteico, apesar de seus IDG não refletirem esses potenciais.

Além de influenciar no crescimento das bactérias, a lactose e o glúten também proporcionaram comportamentos distintos quanto às características morfológicas das colônias desses microrganismos (Tabela 2).

**Tabela 1.** Crescimento das colônias e Índice de Degradação do Glúten das bactérias em meios contendo lactose e glúten.

Bactéria INPA BLG	24 horas				48 horas			
	Lactose		Glúten		Lactose		Glúten	
	Diâmetro colônia	Diâmetro colônia	Diâmetro halo	IDG	Diâmetro colônia	Diâmetro colônia	Diâmetro halo	IDG
----- mm -----		----- mm -----		----- mm -----		----- mm -----		
01	5,8 b	13,3 a	16,9	1,27	10,6 b	17,6 a	25,5	1,45
22	4,2 b	13,3 a	19,5	1,47	10,3 b	30,6 a	>40,0*	---
28	5,2 b	10,5 a	20,5	1,95	9,3 b	13,2 a	28,5	2,16
52	1,8 b	3,8 a	0,0	0,0	1,9 b	4,7 a	10,2	2,17
56	4,9 a	4,8 a	11,6	2,42	5,6 a	5,1 a	18,1	3,55
70	5,0 a	5,3 a	6,9	1,30	6,5 a	6,2 a	11,6	1,87
<b>Médias</b>	<b>4,5 b</b>	<b>8,5 a</b>	<b>12,6</b>	<b>1,40</b>	<b>7,4 b</b>	<b>12,9 a</b>	<b>18,8**</b>	<b>2,24**</b>

\* Halos se juntaram sem possibilidade de medição exata. \*\* Média sem o valor da INPA BLG22. As letras mostram as diferenças de crescimento de cada bactéria em cada um dos meios (lactose e glúten) pelo teste de Tukey a 5 %.

**Tabela 2.** Caracterização fenotípica das colônias das bactérias em meios com glúten e lactose.

Características das colônias	Bactérias INPA						
		BLG 01	BLG 22	BLG 28	BLG 52	BLG 56	BLG 70
Crescimento	G	Rápido	Rápido	Rápido	Rápido	Rápido	Rápido
	L	Rápido	Rápido	Rápido	Rápido	Rápido	Rápido
Tamanho	G	Grande	Grande	Grande	Grande	Grande	Grande
	L	Grande	Grande	Grande	Médio	Médio	Médio
Forma	G	Irregular	Irregular	Irregular	Circular	Circular	Circular
	L	Irregular	Irregular	Irregular	Circular	Circular	Circular
Elevação	G	Achatada	Elevada	Ondulada	Elevada	Ondulada	Achatada
	L	Achatada	Achatada	Achatada	Achatada	Ondulada	Achatada
Bordas	G	Lisas	Lobadas	Lobadas	Lisas	Lisas	Lobadas
	L	Onduladas	Onduladas	Onduladas	Lisas	Lisas	Lisas
Estrutura	G	Rugosa	Rugosa	Lisa	Lisa	Rugosa	Rugosa
	L	Lisa	Rugosa	Lisa	Lisa	Lisa	Rugosa
Brilho	G	Opaco	Opaco	Opaco	Opaco	Opaco	Opaco
	L	Translúcido	Translúcido	Opaco	Transpa-rente	Translúcido	Translúcido
Cor	G	Branca	Verde azulada	Branca	Incolor	Branca	Branca
	L	Incolor	Branca	Branca	Incolor	Branca	Branca
Aspecto	G	Membra-noso	Membra-noso	Gelati-noso	Leitoso	Leitoso	Membra-noso
	L	Membra-noso	Membra-noso	Membra-noso	Membra-noso	Membra-noso	Membra-noso

G: Meio contendo glúten. L: Meio contendo lactose

Todas as bactérias apresentaram crescimento rápido (colônias visíveis com menos de 48 horas) em ambos os meios de cultura. Foram observadas mudanças na morfologia externa das colônias de algumas bactérias quando comparados seus crescimentos nos dois meios: no tamanho das colônias, todas as seis bactérias mostraram crescimento elevado no meio rico em proteínas (glúten), mas no meio rico em carboidratos (lactose), metade das bactérias (INPA BLG52, BLG56 e BLG70) mostrou crescimento médio, indicando preferência pelo meio rico em proteínas.

Com relação à forma das colônias, três delas mostraram formato irregular e três, circular, sem serem afetadas pela fonte de carbono do meio de cultura. Quanto à elevação das colônias, as seis bactérias apresentaram elevações achatadas, elevadas e onduladas, sendo que o meio de cultura só afetou essa característica nas colônias das bactérias INPA BLG22, BLG28 e BLG52. Quanto às bordas, as colônias apresentaram aspectos lisos, lobados e ondulados, com os meios de cultura influenciando essa característica de quatro das seis bactérias.

As colônias se mostraram rugosas e lisas, com os meios de cultura interferindo em apenas duas das bactérias, as INPA BLG 01 e BLG56. As colônias das seis bactérias apresentaram brilhos opacos, translúcidos ou transparentes, com os meios de cultura interferindo em cinco das seis bactérias. Apenas a INPA BLG28 não mostrou diferença quanto a esse aspecto ao crescer em ambos os meios. Quanto à cor, foram observadas as cores branca, incolor e verde azulada. Essa cor foi observada nas colônias da INPA BLG22 no meio rico em proteínas (glúten), sendo que no meio com lactose suas colônias apresentaram coloração branca. Além dessa bactéria, a INPA BLG01 também foi influenciada pelos meios de cultura. Finalmente, com relação ao aspecto das colônias, foram observados o membranoso, gelatinoso e leitoso. Nesse caso, os meios de cultura também afetaram esse aspecto das colônias de três das seis bactérias, das INPA BLG28, BLG52 e BLG56.

Segundo Sousa *et al.* (2013), a taxa de crescimento, densidade de colônias nas placas, meios de cultura, formação de biofilme, características genéticas da bactéria podem interferir no aspecto das colônias. Com base nessas variáveis, esses autores identificaram 18 morfotipos diferentes em duas estirpes de *Pseudomonas aeruginosa*, que mostraram variações nos tamanhos, formas, cores, texturas e margens, permitindo-lhes caracterizar com mais detalhes, as duas estirpes bacterianas. Usar essas informações, portanto, pode facilitar a identificação de bactérias e possíveis mutações que possam ocorrer, além de evitar a presença de contaminantes em culturas puras.

## Conclusões

Houve influência dos meios de cultura nas taxas de crescimento e nas características das colônias das bactérias degradadoras de lactose e glúten, INPA BLG01, BLG22, BLG28, BLG52, BLG56 e BLG70.

O meio cuja fonte de carbono é constituída de proteínas (glúten) foi o que mais favoreceu o crescimento das bactérias INPA BLG01, BLG22, BLG28, BLG52.

Os Índices de Degradação do Glúten (IDG) dessas bactérias variaram de 0,0 a 2,42 após 24 horas de incubação e de 1,45 a 3,55 após 48 horas.

As bactérias que apresentaram as maiores taxas de crescimento no meio com glúten foram as INPA BLG01, BLG22, BLG28.

Todas as seis bactérias mostraram modificações quanto ao aspecto das colônias em decorrência da constituição da fonte de carbono do meio de cultura (carboidrato: lactose ou proteínas:glúten).

Essas diferenças de características podem ser usadas para facilitar futuros estudos com essas bactérias.

## Referências

- Atlas, RM 2010. *Handbook of Microbiological media*, Fourth Edition, CRC Press, Boca Raton, 2043p.
- Berraquero, FR, Baya AM, Cormenzana, AR 1976. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. *Ars Pharmaceutica*, 17:399- 406.

- Cho JC, Giovannoni SJ 2004. Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine *Gammaproteobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(1):432-440. doi: 10.1128/AEM.70.1.432-440.2004
- Hungria M, Araújo RS 1994. *Microorganismos de importância agrícola*. Brasília: Embrapa SPI. (Embrapa, Documentos, 44).
- Leite SS 2012. *Influência de fatores abióticos no crescimento e esporulação de isolados geneticamente distintos de Trichoderma stromaticum*. Bahia, Brasil. (Msc. Dissertação. Universidade Estadual de Santa Cruz). 68f.
- Malajovich MA 2018. Caracterização morfológica das colônias. Disponível em: [www.bteduc.bio.br/guias/58\\_Caracterizacao\\_morfologica\\_de\\_colonias\\_microbianas.pdf](http://www.bteduc.bio.br/guias/58_Caracterizacao_morfologica_de_colonias_microbianas.pdf). Acessado em 06/03/2018.
- Mattar R, Mazo DFC 2010. Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 56:2-230.
- Minelli-Oliveira C 2017. Bactérias degradadoras de lactose e glúten presentes em queijos e iogurtes encontrados no mercado de Manaus: alternativas para a intolerância à lactose e à Doença Celíaca. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas. Manaus. 184 p.
- Morón B, Cebolla Á, Manyani H, Álvarez-Maqueda M, Megías M, Thomas MC, López MC, Sousa C. 2008. Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide. *Am. J. Clin. Nutr.* 87:405-14.
- Oliveira WF, Cardoso WM, Marques LCL, Salles RPR, Aguiar Filho JLC, Teixeira RSC, Romão JM, Lima ACP. 2004. Utilização de diferentes meios de cultura para o isolamento de enterobactérias em amostras fecais de frangos de corte procedentes de explorações industriais do Estado do Ceará, Brasil. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 99(552):211-214.
- Prescott LM, Harley JP, Klein DA 2005. *Microbiology 6th edition*, McGraw Hill International edition, New York.
- Salanitro JP, Fairchild IG, Zgornicki YD 1974. Isolation, culture characteristics, and identification of anaerobic bacteria from the chicken cecum. *Appl Microbiol.*, 27(4):678-687.
- Son C, Chung S, Lee J, Kim S 2002. Isolation and cultivation characteristics of *Acetobacter xylinum* KJ-1 producing bacterial cellulose in shaking cultures. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 12(5):722-728
- Sousa AM, Machado I, Nicolau A, Pereira MO 2013. Improvements on colony morphology identification towards bacterial profiling. *J. of Microbiol. Methods*, 95:327-335.
- Veisseyre R 1988. *Lactologia técnica. Composición, recogida, tratamiento y transformación de la lche*. Espanha (Zaragoza) Editorial Acribia, 288-291.
- Vincent JM 1970. *A manual for the practical study of root nodule bacteria*. Oxford: Blackwell Scientific Publications (International Biology Program Handbook, 15. London), 164 p., 1970.
- Zimbro MJ, Power DA, Miller SM, Wilson GE, Johnson JA 2009. *Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media*. Second Edition, Becton Dickinson and Co., Sparks, Maryland, 686p.

## Fungitoxicidade de óleos essenciais de *Piper* spp. sobre *Colletotrichum theobromicola*

Samara da Silva Oliveira<sup>1</sup>, Rogério Eiji Hanada<sup>1</sup>, Francisco Célio Maia Chaves<sup>2</sup>,  
Gleisson de Oliveira Nascimento<sup>3</sup>, Luiz Alberto Guimarães de Assis<sup>1</sup>,  
Sabrina Silva de Oliveira<sup>1</sup>, Marcelo Róseo Oliveira<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

<sup>2</sup> Embrapa Amazônia Ocidental

<sup>3</sup> Universidade Federal do Acre

Emails: agroufac174@gmail.com, rhanada.inpa@gmail.com, celio.chaves@embrapa.com,  
gleissonnascimento582@gmail.com, luizlab1@hotmail.com, sabrina\_ufac@hotmail.com,  
marceloroseo@embrapa.br.

### Resumo

Os óleos essenciais são alternativas promissoras para o manejo de doença de plantas devido sua reconhecida atividade antimicrobiana. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito fungitóxico de óleos essenciais de *Piper aduncum*, *P. hispidinervum*, *P. hispidum*, *P. marginatum* e *P. callosum* no controle alternativo a *Colletotrichum theobromicola* agente causal da antracnose da cebolinha (*Allium fistulosum*). Discos de 0,7 cm de diâmetro do fungo *C. theobromicola* foram depositados individualmente no centro das placas de Petri contendo meio de cultura BDA e óleos essenciais nas respectivas concentrações 0%, 0,03%, 0,1%, 0,2%, 0,5% e 1%. Após 30 dias de incubação, avaliou-se a esporulação fúngica sob o efeito das diferentes concentrações dos óleos essenciais. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizados em esquema fatorial (5 x 6), com óleos essenciais de cinco espécies vegetais e seis concentrações e cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de regressão linear ao nível de 5% de significância. Foi constatado que os óleos essenciais de todas as espécies estudadas apresentaram atividade antifúngica frente à *C. theobromicola*. No entanto, apenas nas espécies *P. marginatum* e *P. callosum* na concentração 1% houve total inibição do patógeno. Quanto à esporulação, na concentração 1% de óleo essencial das espécies *P. callosum*, *P. marginatum*, *P. hispidinervum* e *P. aduncum* houve total inibição. Enquanto que o óleo essencial de *P. hispidum* estimulou a produção de esporos de *C. theobromicola*. Os resultados obtidos nesse estudo comprovam que os óleos essenciais de *Piper* spp. é uma alternativa promissora para o controle da antracnose em cebolinha.

**Palavra-chave:** Controle alternativo, Piperaceae, *C. theobromicola*.

### Introdução

A cebolinha (*Allium fistulosum* L.) é infectada por diversos patógenos que ocasionam prejuízos aos produtores. Dentre os agentes causadores de doenças na cebolinha destaca-se o *Colletotrichum theobromicola* (Delacroix), agente causal da antracnose (Matos *et al.*, 2017). Não há fungicidas registrados para essa cultura e uma das possíveis justificativas é a sua exploração em pequenas áreas (AGROFIT, 2018). O uso de agrotóxicos neste hospedeiro seria considerado problemático, pois a planta apresenta ciclo curto e os resíduos dos produtos podem permanecer nas folhas comercializáveis (Araújo *et al.*, 2012). O uso de produtos naturais é considerado fonte segura no controle alternativo de doenças em plantas e compatível com esse patossistema.

Os óleos essenciais são considerados fungicidas naturais com potencial por suas reconhecidas propriedades antimicrobianas, pois as substâncias bioativas encontradas nas plantas causam inibição do crescimento de fungos, inibição de esporulação e germinação de conídios, além de reduzir lesões causadas por fitopatógenos (Chiejina e Ukeh, 2012; Ramos *et al.*, 2016). Dentre as grandes famílias botânicas produtoras de óleos essenciais, as Piperaceae merecem destaque. O gênero *Piper*, o maior da família Piperáceae, é conhecido por ser rico em óleos essenciais e algumas espécies desse gênero, como *Piper*

*aduncum*, *Piper hispidinervum*, *Piper hispidum*, *Piper callosum* e *Piper marginatum* são ricas em óleos essenciais que apresentam atividade antifúngica.

Na agricultura, estas espécies podem ser usadas como inseticidas naturais, bem como fungicidas naturais como descrito por Bastos e Albuquerque (2004). Assim, devido à baixa toxicidade, por serem biodegradáveis, somado à ampla aceitação pelo público, os óleos essenciais podem ser usados como alternativa promissora aos fungicidas.

Diante do exposto, o presente trabalho foi conduzido com objetivo de avaliar a atividade antifúngica de óleos essenciais de *P. aduncum*, *P. hispidinervum*, *P. hispidum*, *P. marginatum* e *P. callosum* sobre o crescimento micelial e produção de esporos de *C. theobromicola*, agente causador da antracnose da cebolinha.

## Material e Métodos

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA e no Laboratório de Plantas Medicinais e Fotoquímica da Embrapa Amazônia Ocidental, onde os óleos essenciais foram extraídos por aparelho tipo Clevenger.

As soluções de óleos foram preparadas nas concentrações de 1%, 0,5%, 0,2%, 0,1% e 0,03%, as quais foram incorporadas em meio BDA (batata-dextrose-ágar) fundente e vertidos 15 mL em placas de Petri. Após a solidificação, discos de micélio (7 mm de diâmetro) do isolado *C. theobromicola* foram depositados no centro das placas. Posteriormente foram mantidas em câmara de crescimento a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h. A partir do segundo dia após a repicagem, foram realizadas avaliações a cada 24 h, até cobertura total do tratamento controle na borda da placa de Petri. O crescimento micelial foi obtido pela medida do diâmetro das colônias em dois sentidos perpendiculares, com o auxílio de um escalímetro. Com os dados obtidos, foi determinado o percentual de inibição do crescimento micelial (PIC), utilizando a fórmula proposta por Bastos (1997).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, esquema fatorial (5 x 6), sendo cinco espécies de Piperaceae (*P. aduncum*, *P. marginatum*, *P. callosum*, *P. hispidum*, *P. hispidinervum*) e seis concentrações dos respectivos óleos essenciais com 5 repetições, onde cada placa de Petri constituiu uma unidade experimental. Os dados foram submetidos à análise de regressão linear ao nível de 5% de significância para verificar a influência das concentrações de óleos essenciais sobre o crescimento micelial e esporulação fúngica.

A avaliação da esporulação fúngica realizou-se 30 dias após a repicagem. Para tanto, 10 mL de água destilada foi acrescentada sobre as colônias nas placas de Petri. Posteriormente, com uma lâmina de microscópio, realizou-se uma raspagem superficial do meio de cultura e a suspensão foi filtrada em gaze, com o auxílio de um funil de vidro e recolhida em um béquer. A contagem do número de esporos procedeu-se em câmara de Neubauer.

## Resultados e Discussão

Todos os óleos essenciais testados, independente das concentrações, apresentaram atividade inibitória sobre o crescimento micelial de *C. theobromicola*. No entanto, apenas os óleos das espécies *P. marginatum* e *P. callosum* na concentração 1% inibiram totalmente o crescimento micelial do patógeno (Figura 1).

No tratamento controle, o crescimento micelial apresentou diâmetros da colônia fúngica superior a oito cm de diâmetro, enquanto que os tratamentos com as respectivas concentrações, o crescimento micelial atingiu quatro centímetros na concentração de 0,2% e 2,5 cm nas concentrações acima de 0,5% e 0,8% dos óleos essenciais. Na Figura 1, observa-se que o crescimento micelial de *C. theobromicola* decresce em resposta ao aumento das concentrações dos óleos essenciais de *Piper* spp. ( $p < 0,05$ ).

As pesquisas realizadas por Bastos e Albuquerque (2004) corroboram com o presente trabalho. Esses autores verificaram que o óleo essencial de *P. aduncum* na concentração acima de 100 µg.mL<sup>-1</sup> inibiu em 100% tanto o crescimento micelial quanto a germinação de conídios de *C. musae* e reduziu 100%

a severidade e intensidade da antracnose em banana prata na concentração de 1,0% do óleo essencial, tendo o mesmo efeito fungitóxico que o fungicida benomil.

O óleo essencial de *P. aduncum* apresentou atividade antifúngica sobre *Moniliophora perniciosa*, agente causador da vassoura-de-bruxa no cupuaçuzeiro nas quatro concentrações testadas (0,25; 0,50; 0,75; 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), inibindo totalmente o crescimento micelial do fungo (Rocha *et al.*, 2013).

A ação fungicida ou fungistática dos óleos essenciais de *Piper* spp. pode estar relacionada com os constituintes químicos encontrados nos respectivos óleos ou devido à atuação dos compostos que atuam de maneira sinérgica ou antagonista. Na Tabela 1 verifica-se a porcentagem de inibição do crescimento micelial, com valores de 7,5% de inibição de *C. theobromicola* na concentração 0,03% do óleo de *P. hispidum*, até valores de 56,2% de inibição com óleo de *P. aduncum*. Constatou-se que da concentração 0,2% até 1% houve inibição acima de 50% do patógeno, exceto para a espécie *P. hispidum* e 100% de inibição do crescimento foi verificado na concentração de 1% utilizando óleo essencial de *P. callosum* e *P. marginatum*.

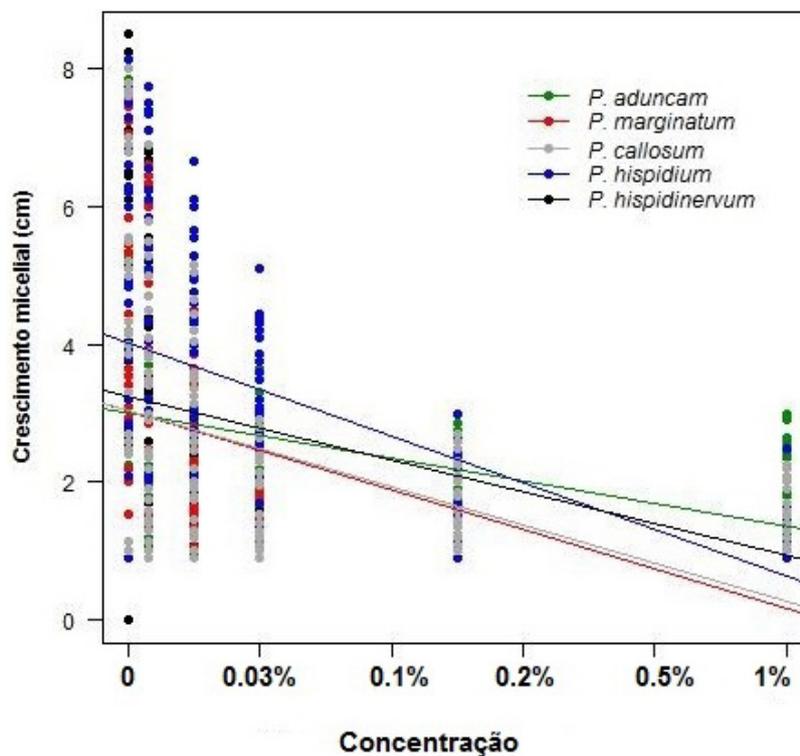


Figura 1. Crescimento micelial de *Colletotrichum theobromicola* na presença de diferentes concentrações de óleos essenciais de *Piper* spp.

Tabela 1. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *C. theobromicola* frente às diferentes concentrações de óleos essenciais.

Espécies	Porcentagem de Inibição do Crescimento Micelial de <i>Colletotrichum theobromicola</i>					
	Concentrações					
	0%	0,03%	0,1%	0,2%	0,5%	1%
<i>Piper hispidum</i>	0	7,5	20,0	45,0	66,7	76,2
<i>P. marginatum</i>	0	18,7	62,5	83,7	88,7	100,0
<i>P. callosum</i>	0	22,5	48,0	77,9	83,8	100,0
<i>P. hispidinervum</i>	0	31,2	46,2	68,7	68,7	75,0
<i>P. aduncum</i>	0	56,2	62,5	62,5	66,2	66,2

O aumento da concentração do óleo essencial proporcionou redução na esporulação do fungo, exceto com o óleo essencial de *P. hispidum*. Os óleos essenciais de *Piper callosum*, *P. marginatum*, *P. hispidinervum* e *P. aduncum*, na concentração de 1%, inibiram 100% a esporulação de *C. theobromicola*, enquanto que o óleo essencial de *P. hispidum* estimulou a produção de esporos de *C. theobromicola* (Figura 2).

Flaishman e Kolattukudy (1994) relatam que a germinação de conídios de alguns fungos fitopatogênicos pode ser estimulada pela combinação de certos constituintes do óleo essencial. Isso se deve ao mecanismo desenvolvido por alguns fungos patogênicos que utilizam os metabólitos secundários como um sinal para iniciar a germinação, formação de apressórios e infecção.

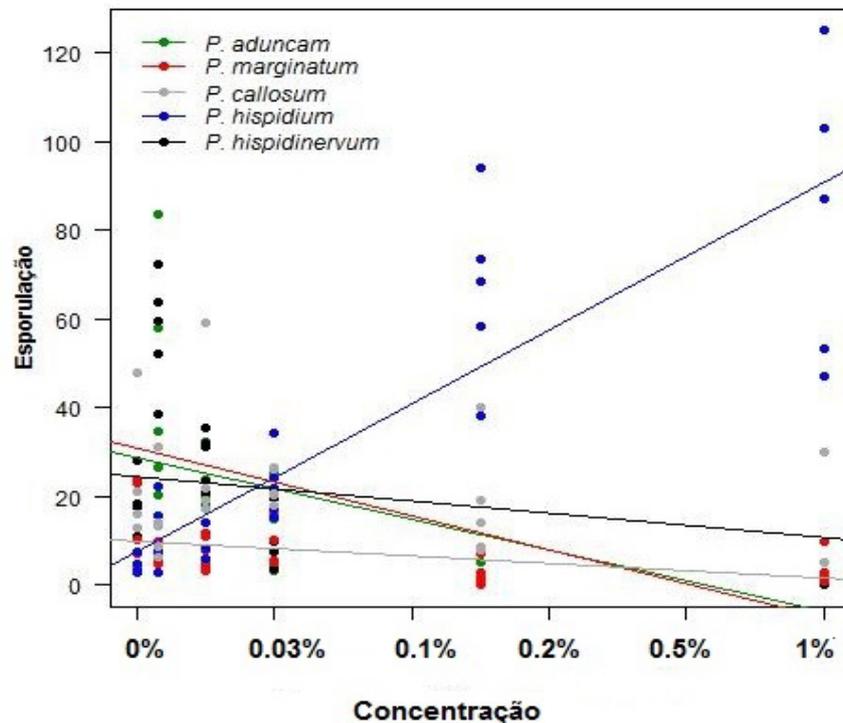


Figura 2. Esporulação fúngica de *Colletotrichum theobromicola* após 30 dias de incubação.

## Conclusões

Óleos essenciais de *Piper marginatum* e *P. callosum* inibiram em até 100% o crescimento micelial de *Colletotrichum theobromicola*.

Os óleos essenciais *P. aduncum*, *P. hispidinervum*, *P. marginatum* e *P. callosum* consideradas neste estudo reduziram a produção de esporos de *C. theobromicola* e *P. hispidum* estimulou a produção de esporos.

Portanto, espécies do gênero *Piper* são consideradas potenciais para o controle de agentes fitopatogênicos que acometem culturas de interesse econômico.

## Referências

- AGROFIT 2018. ([www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)). Acesso 4/06/2018.
- Araújo IB, Luiz AM, Stadnik MJ 2012. Efeito do extrato de alga e de argila silicatada na severidade da Alternariose e na produtividade da cebolinha comum (*Allium fistulosum* L.). *Tropical Plant Pathology*, 37: 363-367.
- Bastos CN, Albuquerque PSB 2004. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. *Fitopatologia Brasileira*, 29: 555-557.
- Bastos CN. 1997. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipelis pernicioso* e outros fungos fitopatogênicos. *Fitopatologia Brasileira*, 22:441.

- Chiejina NV, Ukeh JA 2012. Antimicrobial properties and phytochemical analysis of methanolic extracts of *Aframomum melegueta* and *Zingiber officinale* on fungal diseases of tomato fruit. *Journal of Natural Sciences Research*, 2:10-15.
- Flaishman MA, Kolattukudy PE 1994. Timing of fungal invasion using hosts ripening hormones as a signal. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America*, 91:6579–6583.
- Matos KS, Santana KFA, Catarino AM, Hanada RE 2017. First report of antracnose on welsh onion (*Allium fistulosum*) in Brazil caused by *Colletotrichum theobromicola* and *C. truncatun*. *Plant Disease*, 101: 1055.
- Ramos K, Andreani Júnior R, Kozusny-Andreani DI 2016. Óleos essenciais e vegetais no controle in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 18: 605-612.
- Rocha SIB, Majolo C, Souza MG, Chaves FCM 2013. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Piper aduncum* por bioautografia indireta no controle de *Moniliophthora perniciosa*. Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus-AM.
- Ramos K, Andreani Júnior R, Kozusny-Andreani DI 2016. Óleos essenciais e vegetais no controle in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 18: 605-612.
- Rocha SIB, Majolo C, Souza MG, Chaves FCM 2013. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Piper aduncum* por bioautografia indireta no controle de *Moniliophthora perniciosa*. Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus-AM.

## Avaliação da qualidade microbiológica de leite cru produzido e comercializado no Estado do Amazonas

Maristela Martins Pereira<sup>1\*</sup>, Priscila Cordeiro de Azevedo<sup>1</sup>, Geovana Dagostim Savi<sup>2</sup>,  
Antonia Queiroz Lima de Souza<sup>1</sup>, Lourdes Mylla Rocha Perdigão<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Agrárias, Manaus, Amazonas

<sup>2</sup> Universidade do Extremo Sul Catarinense, Iparque-Unesc, Parque Científico e Tecnológico, Criciúma, Santa Catarina

\*Email: mary22on@hotmail.com

### Resumo

O leite cru é um excelente meio de proliferação microbiana, devido ao seu alto valor nutricional, pH neutro, teor de água e temperatura adequados à proliferação dos microrganismos. Este trabalho teve como objetivo, analisar a qualidade microbiológica do leite cru disponibilizado para o mercado informal no Estado do Amazonas. Foram coletadas 15 amostras em cinco diferentes locais de comercialização na cidade de Manaus-AM. As amostras passaram por análises microbiológicas para a detecção de coliformes totais e termotolerantes (NMP/g ou mL), *Staphylococcus aureus* e *Salmonella spp.* Os resultados obtidos mostraram que todas as amostras analisadas apresentaram valores altos de contaminação por coliformes totais e fecais. Nenhuma amostra foi detectada com *Staphylococcus* e apenas uma indicou presença de *Salmonella spp.* As amostras de leite cru estudadas apresentaram irregularidades quanto a sua qualidade microbiológica, indicando falta de qualidade no manuseio e produção deste alimento. Ainda assim, o leite não apresentou cepas positivas de *Staphylococcus aureus* e apenas uma com presença de *Salmonella*, confirmando a baixa incidência desta bactéria no leite.

**Palavras-chave:** Coliformes, leite informal, patógenos.

### Introdução

Segundo a Instrução Normativa nº 62 de 2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 'entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda'.

Devido sua equilibrada composição de nutrientes, o leite possui um alto valor biológico, sendo considerado um dos mais completos alimentos in natura, por isso a importância do controle da qualidade deste produto amplamente consumido em todo o mundo (Tronco, 2008). Apresenta alto conteúdo de aminoácidos essenciais, carboidratos, gordura, vitaminas e minerais. Os elementos sólidos representam aproximadamente 12 a 13 % do leite, e a água aproximadamente 87 %. Os principais elementos sólidos do leite são lipídios (3,5% a 5,3%), carboidratos (4,7% a 5,2%), proteínas (3% a 4%), sais minerais e vitaminas (1%) (Fernandes, 2010).

Segundo Claeys *et al.* (2013), o leite cru é um excelente meio de proliferação microbiana, devido ao seu alto valor nutricional, pH neutro, teor de água e temperatura adequados à proliferação dos microrganismos. Isto acaba sendo uma problemática de saúde pública no momento em que o leite cru é comercializado, pois o mesmo passa a ser um veículo causador de doenças transmitidas por alimentos.

A comercialização de leite cru no Brasil ocorre de forma informal e por isso, é uma grande ameaça à saúde pública visto que, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), dezesseis doenças bacterianas e sete viróticas são veiculadas pelo produto, dentre elas, a tuberculose, brucelose e gastroenterites, sendo esta uma grave consequência da baixa qualidade do leite proveniente do mercado informal (Mendes *et al.*, 2010). No Amazonas, a prática da produção leiteira é desenvolvida, principalmente, por agricultores familiares, sem os cuidados mínimos com relação às condições higiênico-sanitárias.

Entre os microrganismos indicadores de contaminação, incluem-se os coliformes a 45°C, grupo de bactérias Gram-negativas com alta incidência de *Escherichia coli*. Essa bactéria é considerada o melhor indicador de contaminação de origem fecal e sua presença no leite eleva o risco de patógenos, como *Salmonella*, estarem presentes (APHA, 2001). *Staphylococcus aureus* também é considerado um importante patógeno no leite, podendo contaminá-lo principalmente quando está presente como agente etiológico da mastite ou por meio dos ordenhadores, muitas vezes portadores assintomáticos desse microrganismo e possuidores de maus hábitos higiênicos (Brito *et al.*, 2004). Uma vez presente e encontrando condições favoráveis à sua multiplicação, o *S. aureus* pode atingir números elevados, com produção de enterotoxinas potencialmente capazes de causar toxinfecção alimentar (Jay, 2005). Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de leite cru refrigerado produzido e comercializado no Estado do Amazonas.

## Material e Métodos

### *Amostras*

Amostras de leite cru foram adquiridas em cinco pontos de venda, localizados na cidade de Manaus-AM, nos períodos de dezembro de 2016 a fevereiro de 2017. Nesses estabelecimentos o leite cru era comumente fornecido por diferentes produtores. A aquisição das amostras se deu mediante compra sem informar aos proprietários que se tratava de uma pesquisa.

As amostras foram acondicionadas em embalagens esterilizadas (capacidade de 1 Litro), identificadas e imediatamente transportadas até o Laboratório de Processamento de Leite e Derivados da Universidade Federal do Amazonas em caixas isotérmicas contendo gelo. No laboratório foram transferidas para frascos com tampas rosqueáveis, estilizados. As amostras foram armazenadas a -18°C até o momento das análises.

### *Análises Microbiológicas*

#### *Quantificação de coliformes totais (CT) pela técnica de tubos múltiplos – Número mais provável (NMP)*

Para a determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais (CT), foi realizada a técnica dos tubos múltiplos (Kornacki e Johnson, 2001). Para a inoculação foram realizadas as diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  da amostra e inoculou-se 3 séries de três tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), em seguida foram adicionados 1 mL de cada diluição por tubo de LST com tubos de Durham invertidos. Após transferências das amostras diluídas para seus respectivos tubos com LST, estes foram incubados a 35°C por 24h. Após este período, observou-se se houve o crescimento com produção de gás. Nos casos positivos seguiram-se os passos subsequentes. Nos casos negativos, foram reincubados até completar 48hs e repetiu-se a leitura, passando para os itens subsequentes os tubos com crescimento de gás. Após este período foi realizada a contagem de coliformes totais. Dos tubos positivos com LST, transferiu-se uma alçada de cada cultura para tubos de Caldo Verde Brilhante Bile 2% (VB). Depois foram incubados a 35°C por 24 h e observou-se se houve o crescimento com produção de gás. Nos casos negativos, foram reincubados até 48 h e repetiu-se a leitura, anotando o número de tubos de VB positivos, confirmativos para a presença de coliformes totais e em seguida foi determinado o número mais provável (NMP / mL<sup>-1</sup>).

#### *Quantificação de coliformes fecais (CF) através da técnica de tubos múltiplos*

Das amostras que apresentaram resultado positivo no teste presuntivo (LST), foi realizada a transferência de três alçadas de cada tubo positivo (com crescimento e produção de gás) para tubos contendo 5mL de caldo EC, os quais foram incubados em estufa BOD a 45°C por 24 horas. Após o período de incubação, realizou-se a leitura, considerando-se positivos os tubos de caldo EC que apresentaram produção de gás no tubo de Durham. Em seguida foi determinado o NMP de coliformes termotolerantes por ml das amostras analisadas.

### *Staphylococcus aureus*

As análises de *Staphylococcus aureus* foram realizadas segundo Lancette e Bennet (2001). Foram feitas 3 diluições para cada amostra. Inicialmente foram preparados 1 vidro com 90 mL de água peptonada e mais 2 tubos de ensaio com 9 mL de água peptonada para obter 3 diluições para cada amostra:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$

e  $10^{-3}$ . Para cada amostra, foram adicionados 10 mL no vidro, para a diluição  $10^{-1}$ . Após homogeneização, 1 mL da diluição  $10^{-1}$  foi adicionada ao tubo de ensaio para obter a diluição  $10^{-2}$ . Após homogeneização, 1 mL da diluição  $10^{-2}$  foi adicionada ao terceiro tubo de ensaio para a diluição  $10^{-3}$ . De cada diluição da amostra, foram inoculados 1 mL na superfície de placas de ágar Baird Parker (BP) e foi espalhado com alça de Drigalski, da placa de maior para a placa de menor diluição. As placas de cultura de cada amostra foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas em estufa microbiológica. Após este período foi verificada a presença ou ausência de colônias.

### *Salmonella* spp.

Na Pesquisa com *Salmonella* spp., alíquotas de 25 mL foram submetidas ao pré-enriquecimento em caldo lactosado a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Em seguida, foram transferidas alíquotas de 1 mL das amostras pré-enriquecidas para 10 mL de caldos selenito cistina e tetracionato, incubando todos os tubos a  $35^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas. A partir de cada caldo seletivo de enriquecimento, foi transferida uma alçada da amostra para uma placa de ágar verde brilhante e uma placa de ágar *Salmonella*-Shigella, estriando de forma a se obter colônias isoladas. As placas foram incubadas invertidas a  $35^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas. Foram selecionadas de 3 a 10 colônias suspeitas por amostra e repicadas em ágar ferro tríplex açúcar (TSI) e ágar ferro lisina (LIA) inclinados para confirmação preliminar. Esses meios foram inoculados através de picada profunda e estriamento na superfície inclinada do bisel, e incubados a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

## Resultados e Discussão

Os resultados das análises microbiológicas podem ser observados na Tabela 1. Dentre as 15 amostras analisadas, todas (100%) foram negativas para a enumeração de *Staphylococcus* e apenas uma amostra (6,66%) apresentou-se positiva para *Salmonella*. Quanto aos coliformes termotolerantes, seis (40%) das amostras analisadas apresentaram valores acima do permitido, considerando-se os parâmetros da ANVISA (2001).

Cabe salientar que os coliformes termotolerantes são indicadores higiênico-sanitários (Bezerra *et al.*, 2012), portanto, torna-se fundamental a observação e respeito às boas práticas de fabricação a fim de garantir a segurança do produto.

Na pesquisa realizada por Alves *et al.* (2009) detectou-se números elevados de coliformes totais e termotolerantes no leite cru comercializado informalmente na cidade de São Luís, Maranhão, sendo que algumas amostras possuíam valores que se encontravam na margem de  $10^3$  a  $10^7$  NMP/mL tanto de

**Tabela 1.** Resultados das análises microbiológicas das amostras de leite cru

Amostras	Coliformes Totais NMP/g ou mL	Coliformes fecais NMP/g ou MI	<i>S. aureus</i>			<i>Salmonella</i>
			10-1	10-2	10-3	Caldo seletivo
1	>1100	1100	Ausência	-	-	Ausência
2	>1100	>1100	-	-	-	Ausência
3	>1100	>1100	-	-	-	Ausência
4	1100	1100	-	-	-	Ausência
5	>1100	>1100	-	-	-	Ausência
6	>1100	>1100	-	-	-	Ausência
7	290	Ausência	-	-	-	Ausência
8	>1100	Ausência	-	-	-	Ausência
9	>1100	Ausência	-	-	-	Ausência
10	>1100	Ausência	-	-	-	Ausência
11	>1100	Ausência	-	-	-	Ausência
12	>1100	Ausência	-	-	-	Ausência
13	1100	Ausência	-	-	-	Ausência
14	210	Ausência	-	-	-	Ausência
15	>1100	Ausência	-	-	-	Presença

NMP/g ou mL = Número mais provável por g ou mL; Simplificar a tabela. Retirar as 3 linhas de *S. aureus* e colocar Ausência como na coluna da *Salmonella*.

coliformes totais como de termotolerantes. Em uma pesquisa realizada na cidade de Solânea, na Paraíba, por Amaral e Santos (2011), as amostras de leite cru comercializadas por ambulantes apresentaram valores superiores a 1.100 NMP/mL de coliformes totais e termotolerantes. Tais resultados corroboram com os dados encontrados neste estudo, demonstrando que o leite cru não é apropriado à venda direta ao consumidor, sem antes ser submetido a um processamento.

Maciel *et al.* (2008) avaliaram amostras de leite cru na cidade de Itapetinga, Bahia, armazenadas em latões e estocados em temperatura ambiente. Os resultados obtidos por esses autores também corroboram com os encontrados nesta pesquisa, sendo observados elevados índices de coliformes totais e termotolerantes. Os resultados do presente trabalho foram semelhantes aos observados por Polegato e Rudge (2003), que constataram excesso de coliformes em 93% das amostras de leite analisadas na Região de Marília – SP.

No estudo realizado por Dias *et al.* (2015), todas as 16 amostras analisadas de leite cru apresentaram-se positivas para coliformes totais. No trabalho realizado por Nero *et al.* (2005), 48,57% das amostras analisadas se apresentaram em desacordo com a Instrução Normativa 51 (Brasil, 2002). Bueno *et al.* (2002) analisaram 20 amostras de leite cru refrigerado no estado de Goiás, onde 15 (75%) das amostras apresentaram contagens acima de  $10^6$  UFC/mL.

Segundo os padrões exigidos pela Resolução – RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o leite próprio para consumo pode apresentar máxima concentração de 4 NMP/mL para coliformes termotolerantes e ausência de *Salmonella*. Entre as amostras analisadas, todas apresentaram-se fora dos padrões microbiológicos quanto ao Número Mais Provável de Coliformes Termotolerantes. Com base nesses resultados, pode-se inferir que o leite não foi obtido de forma higiênica ou de acordo com as boas práticas agrícolas.

A ausência de *Salmonella* foi observada por diversos autores, confirmando a baixa incidência desse patógeno no leite (Ávila, 1996, Tessari e Cardoso, 2002). Nero *et al.* (2004) também não detectaram a presença de *Salmonella* em 210 amostras nos estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Rio Grande do Sul. O resultado negativo obtido para *Staphylococcus aureus* também foi observado por Cordeiro *et al.* (2002), que também não encontraram cepas positivas de tal bactéria.

## Conclusões

As amostras de leite cru apresentaram irregularidades quanto à sua qualidade microbiológica, com valores altos de contaminação por coliformes totais e fecais, indicando falta de qualidade no manuseio e produção deste alimento.

O elevado número de coliformes totais e termotolerantes detectados no leite cru indicam uma má qualidade higiênico-sanitária em alguma das etapas de produção ou comercialização desses produtos.

Há uma necessidade de melhoria em boas práticas de produção a fim de reduzir a contaminação na cadeia produtiva do leite visando melhoria na qualidade do produto final.

O leite não apresentou cepas positivas de *Staphylococcus aureus* e apenas uma com presença de *Salmonella*, confirmando a baixa incidência desta bactéria no leite.

## Referências

- Amaral CRS, Santos EP 2011. Leite cru comercializado na cidade de Solânea, PB: caracterização físico-química e microbiológica. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 13(1):07-13.
- Alves LMC, Amaral LA, Corrêa MR, Sales SS 2009. Qualidade microbiológica do leite cru e de queijo de coalho comercializados informalmente na cidade de São Luís - MA. *Pesquisa Foco*, v. 17, n. 2, p. 01-13.
- APHA 2001. American Public Health Association. (2001). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4 th ed. Washington.
- Ávila CR, Gallo CR. 1996. Pesquisa de *Salmonella* spp. em leite cru, leite pasteurizado tipo c e queijo “minas frescal” comercializados no município de Piracicaba - SP. *Sci. agric.* 53(1).

- Bezerra MVP, Abrantes MR, Silvestre MKS, Sousa ES, Rocha MOC, Faustino JG, Silva JBA 2012. Avaliação microbiológica e físico química de linguiça toscana no município de Mossoró, RN. *Arquivo do Instituto Biológico*, 79:297-300.
- Brasil 2001. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2001. Resolução RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001. *Regulamento Técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos*.
- Brasil 2002. Ministério da Saúde, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa n° 51, de 20 de setembro de 2002*. Anexo IV - Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. Diário Oficial da União, Brasília, p.13, 20 set. 2002. Seção 1.
- Brasil 2011. MAPA - Ministério da Agricultura Pesca e Abastecimento. *Instrução Normativa n° 62, 29 dez. 2011*. Brasília: Diário Oficial da União; 2011.
- Brito JRF, Pinto SM, Souza GN, Arcuri EF, Brito MAVP, Silva MR 2004. Adoção de boas práticas agropecuárias em propriedades leiteiras da Região Sudeste do Brasil como um passo para a produção de leite seguro. *Acta Scientiae Veterinariae*, 32(2):125-131.
- Bueno VFF, Mesquita AJ, Nicolau ES, Mansur J RG, Neves RBS 2002. *Parameters of microbiological quality of raw milk and water in dairy farms in Goiás state - Brazil*. II Congresso Panamericano de Qualidade do Leite e Controle de Mastite, Ribeirão Preto, SP, 24 a 27 de novembro de 2002.
- Claeys WL, Cardoen S, Daube G, Block JD, Dewettinck K, Dierick K, Zutter LD, Huyghebaert A, Imberechts H, Thiange P, Vandenplas Y, Herman L 2013. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control*, 31(1):251-262.
- Cordeiro CAM, Carlos LA, Martins MLL. 2002. Qualidade microbiológica de leite pasteurizado tipo C, proveniente de microusinas de Campos de Goytacazes, RJ. *Revista Higiene Alimentar*, 16(92):41-44.
- Dias ND, Fontinele LL, Machado SMO, Oliveira JS, Ferreira GP, Pereira ACTC 2015. Avaliação das condições -sanitárias de leite cru e queijo coalho comercializados em mercados públicos no Norte do Piauí. *Saúde e Pesquisa*, Maringá (PR). 8(2):277-284.
- Fernandes VG, Maricato E 2010. Análises físico-químicas de amostras de leite cru de um laticínio em Bicas – MG. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 375(65):3-10.
- IBGE- 2012. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística da Produção Pecuária. Disponível em: <http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?view=noticia&redirecionado=1&id=1&busca=1&idnoticia=>. Acesso em 12/07/2018.
- Jay JM 2005. *Microbiologia de alimentos*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed. 512p.
- Kornacki JL, Johnson JL 2001. Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Downes F P, Ito K. (Eds). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington: Apha, p.69-80.
- Lancette GA, Bennett RW 2001. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal Enterotoxins*. In: Downes F. P; Ito, K. (Eds). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington: Apha, p. 387-403
- Maciel JF, Carvalho EA, Santos LS, Araújo JB, Nunes VS 2008. Qualidade microbiológica de leite cru comercializado em Itapetinga-BA. *Revista Brasileira de Saúde e Proteção Animal*, 9(3):443-448.
- Mendes CG, Sakamoto SM, Silva JBA, Jácome CGM, Leite AI 2010. Análise Físico-químicas e Pesquisa de Fraude no Leite Informal Comercializado no Município de Mossoró – RN. *Ciência Animal Brasileira*. 11(2):349-356.
- Nero LA, Mattos MR, Beloti V, Barros MAF, Pontes Netto D, Pinto JPAN, Andrade NJ, Silva WP, Franco BDGM 2004. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of Salmonella spp, Listeria monocytogenes and chemical residues. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, 35(3):211-215.
- Nero LA, Mattos MR, Beloti V, Barros MAF, Pinto JPAN, Andrade NJ, Silva WP, Franco BDGM 2005. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela instrução normativa 51. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 25(1):191-195.
- Polegato EPS; Rudge AC 2003. Estudo das características físico-químicas e microbiológicas dos leites produzidos por mini-usinas da região de Marília - São Paulo/ Brasil. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, 17(110):56-63.
- Tessari ENC, Cardoso ALSPC 2002. Qualidade microbiológica do leite tipo “a” pasteurizado, comercializado em cidade de Descalvado, SP. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, 16(96):65-68.
- Tronco VM 2003. *Manual para Inspeção da Qualidade do Leite*. 2ª ed. Santa Maria: UFSM.

## Criação de uma micoteca de fungos endofíticos de frutas regionais com potencial antimalárico

Kathiane Rebouças de Souza<sup>1</sup>, Beatriz Gomes Alves<sup>1</sup>, Débora de Sena Raposo<sup>1</sup>,  
Thiago Fernandes Sousa<sup>1</sup>, Paula Hariana Silva Dantas<sup>1</sup>, Cathele Gabriele Silva Felix<sup>1</sup>,  
Yasmin Verçosa Kramer<sup>1</sup>, Gilvan Ferreira da Silva<sup>2</sup>, Hector Henrique Ferreira Koolen<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Discentes da Graduação em Ciências Biológicas, Escola Normal Superior, Universidade do Estado do Amazonas

<sup>2</sup> Pesquisador da EMBRAPA Amazônia Ocidental

<sup>3</sup> Pesquisador e Docente do Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais, Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas

Emails: krds.bio16@uea.edu.br; hkoolen@uea.edu.br

### Resumo

O bioma Amazônico abriga alta diversidade vegetal e microbiana. Nesta encontram-se os fungos endofíticos, capazes de habitar o interior das plantas, colonizando seus tecidos sem lhes causar danos aparentes. Estes também são capazes de produzir metabólitos secundários de importância econômica. Portanto, objetivou-se através deste estudo, a criação de uma micoteca de fungos endofíticos associados a frutas regionais com atividade antimalárica. Técnicas clássicas em microbiologia e ferramentas de biologia molecular foram empregadas. Ao fim, os isolados foram fermentados e seus extratos estudados quanto à sua atividade contra *Plasmodium falciparum*. Das 210 linhagens obtidas, apenas nove apresentaram potencial antimalárico, destacando-se as linhagens *Paecilomyces* sp. MMSRG-024 e *Aspergillus sydowii* MMSRG-031 com dosagens mínimas de inibição na concentração de 6,25 µg. mL<sup>-1</sup>. Estes resultados, demonstram a importância de fungos como promissoras fontes de moléculas bioativas, bem como endófitos de frutos do Amazonas como fontes de linhagens promissoras.

**Palavras chave:** fungos endofíticos, frutas Amazônicas, malária, Plasmodium.

### Introdução

A Floresta Amazônica é considerada a maior floresta tropical do planeta, representando cerca de 20% da biodiversidade mundial e destacando-se por possuir a maior diversidade de animais e de plantas do planeta (Souza *et al.*, 2004). Quanto às plantas, uma biodiversidade de aproximadamente 30.000 espécies é encontrada neste bioma, o que corresponde a 10% das plantas de todo o planeta. Adentrando a diversidade vegetal, os frutos amazônicos são igualmente diversos. Muitos deles, fonte de alimentos e/ou base para cosméticos e medicamentos.

Assim como possui uma alta diversidade vegetal, a Floresta Amazônica traz consigo, uma vasta diversidade microbiana associada. Dentre os microrganismos presentes nos tecidos vegetais, destacam-se os fungos e as bactérias. Estes seres associados são denominados microrganismos endofíticos sendo caracterizados pela capacidade de habitar o interior das plantas colonizando os tecidos saudáveis. Isto pode ocorrer apenas durante uma parte de seu ciclo de vida, como em sua totalidade. O que diferencia os endófitos dos demais seres é a sua capacidade de colonizar as plantas sem lhes causar danos (Souza *et al.*, 2004).

Os fungos endofíticos apresentam potencialidades biotecnológicas, uma vez que são capazes de biosintetizar uma vasta gama de metabólitos secundários com diversas propriedades biológicas (Specian *et al.*, 2014). A produção desses metabólitos pode ser influenciada por fatores bióticos e/ou abióticos, estando relacionados com a situação fisiológica do próprio hospedeiro (Azevedo *et al.*, 2000). Diversos estudos têm sido conduzidos visando a prospecção de metabólitos secundários por fungos endofíticos. Isto se deu inicialmente com a descoberta de uma cepa de *Taxomyces andreanae* capaz de mimetizar as vias metabólicas de sua hospedeira e assim produzir a molécula taxol, um poderoso quimioterápico no combate a certos tipos de câncer (Strobel e Daisy, 2003). Desta forma, diversas moléculas com potenciais bioativos foram descritas. Como exemplos têm-se as pestacinas, com atividade antioxidante (Harper *et al.*, 2003), subglutinóis

A e B com atividade imunossupressora (Lee *et al.*, 1995), a podofilotoxina com atividade anticancerígena (Puri *et al.*, 2006), a alantrifenona (Fabio *et al.*, 2005) como inseticida, dentre outras. A importância do estudo de metabólitos secundários presentes em fungos endofíticos justifica-se à medida que essas substâncias podem contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de doenças, em especial, doenças negligenciadas, como a malária, de alta ocorrência regional.

## Material e métodos

As frutas regionais açaí do Amazonas (*Euterpe precatoria*), bacuri (*Platonia insignis*), biribá (*Annona mucosa*), buriti (*Mauritia flexuosa*), maracujá do mato (*Passiflora cincinnata*), sapota do Solimões (*Matisia cordata*) e umari (*Geoffroea spinosa*) foram adquiridas na banca do Rosa (rodovia AM-010, Manaus, Amazonas). Após a aquisição, o material foi imediatamente lavado com água destilada para posterior processo de isolamento de fungos endofíticos. Para esta etapa, foram utilizadas apenas as polpas dos frutos maduros. Para sua assepsia, em uma câmara de fluxo laminar, fragmentos (5 mm x 5 mm) das polpas foram imersos em álcool 70% por 1 minuto, em hipoclorito 2.5% por 4 minutos e novamente em álcool 70% por 2 minutos (Souza *et al.*, 2004). Ao final, os fragmentos foram lavados por imersão em água destilada esterilizada e inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (200g de batata, 20g de dextrose e 15g de ágar) contendo o antibiótico cloranfenicol a 2%. Após o inóculo, as placas foram incubadas em BOD a 28 °C, e a cada 24 horas foi realizada a verificação do crescimento fúngico, seguido de sucessivos repiques.

A purificação das cepas fúngicas se deu por meio da obtenção de culturas monospóricas. Esta etapa foi feita através de diluições seriadas dos esporos (Petrini *et al.*, 1992). As colônias puras foram preservadas conforme metodologia de Castellani (De Capriles e Middelveen, 1989) e depositadas na coleção de microrganismos do Grupo de Pesquisa em Metabolômica e Espectrometria de Massas (MMSRG) da UEA a fim de constituir a micoteca do grupo citado. Para o cadastro, cada linhagem teve suas características morfológicas avaliadas por microscopia óptica e as estruturas reprodutivas foram utilizadas para formar grupos de isolados. Nesta etapa, apenas uma parte das linhagens foi passível apenas de identificação ao nível taxonômico de gênero.

Em seguida, os isolados monospóricos foram crescidos em meio líquido batata dextrose levedura (BDL, batata 200 g/L, dextrose 10 g/L, extrato de levedura 2 g/L) sob agitação a 150 rpm e 28 °C para obtenção de massa micelial. Após a separação das células do caldo fermentado por meio de filtração à vácuo, o DNA total foi obtido conforme o protocolo de extração por detergente catiônico 2% (Doyle e Doyle, 1987). A integridade do DNA extraído foi visualizada por meio de gel de agarose 0,8% (m/m) e quantificada em um espectrofotômetro UV-Vis modelo NanoDrop 2000 e logo após diluídas para a concentração de 100 ng/μL.

A identificação molecular dos isolados foi feita com base na região do espaçador interno transcrito e domínios D1/D2 da região 28S do rDNA utilizando-se os primers ITS 1F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') (Arheim *et al.*, 1990) e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (Carbone e Kohn, 1999). Os amplicons esperados foram fragmentos de aproximadamente 1200 pares de bases, destes, aproximadamente 500 pb correspondem à região ITS e 700 pb correspondem a LSU 28S.

Reações de PCR foram realizadas utilizando 100 ng do DNA total; 0,5 pmol de cada primer; 1X de tampão de reação (100 mM Tris-HCl (pH 8,8 a 25 °C), 500 mM KCl, 0,8% (v/v) Nonidet P40); 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1 mM de dNTPs e uma unidade de Taq DNA polimerase (DNA Express) para um volume final de 25 μL. As condições de PCR foram: desnaturação inicial foi de 94 °C por 3 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento 57 °C por 1 min., extensão de 72 °C por 1,5 min, seguido de extensão final a 72 °C por 5 min. Os amplicons gerados foram visualizados em gel de agarose com auxílio do marcador 1kb para confirmar a amplificação apenas da região de interesse. Os produtos de PCR foram tratados com polietilenoglicol (PEG 20%) e sequenciadas usando o kit BigDye™ Terminator v3.1, no 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™) conforme recomendações do fabricante. A sequência consenso para cada locus foi obtida com base no sequenciamento das fitas *forward* (F) e *reverse* (R) utilizando-se o

programa DNA Baser v.4.36 (<http://www.dnabaser.com/>) para montagem de contig. o Alinhamento das sequências obtidas foi realizado utilizando-se a ferramenta nucleotídeo BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências foram depositadas no GenBank.

Inicialmente, sob condições de assepsia, os preservados da micoteca (n = 210) foram reativados em placas de Petri com a mesma composição da etapa de isolamento. Em seguida, as placas inoculadas foram armazenadas em estufas incubadoras BOD à 28 °C durante 7 dias. Em seguida, plugues circulares (diâmetro = 5 mm, n = 4) das culturas em placa foram transferidos para frascos do tipo Erlenmeyer (125 mL) contendo diferentes fontes de carbono autoclavadas. Para esta etapa, foram utilizados o meio em arroz (30 g de arroz parboilizado tipo 1 com 20 mL de água destilada) e sucrilhos (30 g de sucrilhos Kelloggs® com 20 mL de água destilada). Esta etapa fermentativa ocorreu durante 21 dias em estufas incubadoras BOD à 28 °C.

Após este período, 60 mL de acetato de etila grau HPLC foram adicionados e todo o conteúdo foi triturado com auxílio de um moedor do tipo ultra-turrax. A mistura repousou durante 24 horas e após este período, o material foi filtrado à vácuo com auxílio de papel de filtro. Em seguida, a porção líquida contendo os metabólitos fúngicos foi centrifugada a 3000 rpm durante 5 minutos para remoção de esporos residuais. Ao final, o solvente foi eliminado por meio de roto-evaporação à vácuo gerando um extrato correspondente a cada fungo em sua forma específica de cultivo.

Para o cultivo de *Plasmodium falciparum* (cepa FRC3), foi utilizado o meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 25 mM de HEPES, hipoxantina (50 mg/L), glicose (2g/L) e de gentamicina (50 mg/L) (Ljungström *et al.*, 2004). Ao meio RPMI foi adicionado 10% de soro humano tipo AB+ e eritrócitos humanos normais. A incubação foi realizada durante 72 horas em câmara de hipóxia à 37 °C em uma atmosfera contendo mistura gasosa específica (5% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>) (Trager e Jensen, 1976).

Os ensaios antimaláricos foram realizados em placas de 96 poços de fundo chato, com um volume total de 100 µL, nos quais foram testadas diferentes concentrações dos extratos por meio de diluições seriadas (50 → 3,12 µg/mL). A proporção para cada poço foi de 50 µL de extrato em DMSO para 50 µL de suspensão de eritrócitos infectados por *P. falciparum* em meio RPMI (hematócrito final 2% e parasitemia 1%). O crescimento parasitário foi comparado com os controles positivo (ausência de droga), e negativo (quinina). As placas de 96 poços ficaram incubadas por 72 horas à 37 °C na mesma atmosfera utilizada anteriormente.

A verificação da parasitemia final foi realizada por citometria de fluxo em um equipamento modelo FACSCanto II. A análise das amostras foi realizada através do software Getting Started with BD FACSDiva. Como corante para a fluorescência foi utilizado o brometo de etídio. Ao final foi calculada a inibição do crescimento parasitário no software GraphPad GraphPad Prism 6 de acordo com a fórmula:

$$\%inib. = 100 - \frac{\%fluorescência amostra - \%fluorescência erit. sádios}{\%fluorescência controle - \%fluorescência erit. sádios} \times 100$$

Ao final, foram considerados ativos os extratos com inibições superiores a 70% (parasitemia ~ 3,5).

## Resultados e discussão

Um total de 210 linhagens de fungos associados às polpas de frutos Amazônicos foram isolados, o que demonstra a rica diversidade da microbiota que habita alimentos consumidos no estado do Amazonas. Dentre estas, maiores quantidades de isolados foram obtidas do açaí (n = 51) e buriti (n = 42) frutos estes com elevadas taxas de substâncias antioxidantes como antocianidinas e flavonoides no açaí e, carotenoides no buriti. O açaí, que possui a maior taxa de substâncias fenólicas entre as frutas estudadas, e logo, a fruta com maior poder antimicrobiano, foi também a que mais apresentou fungos cultiváveis. Em seguida está a polpa do biribá, da qual, 31 linhagens foram isoladas. As demais frutas tiveram um número próximo de fungos isolados (~ 20) (Figura 1). Um fato a ser mencionado é que mesmo com o

uso de cloranfenicol a 2%, cerca de 1% das placas apresentaram crescimento de bactérias endofíticas, fato este que deverá ser estudado futuramente por questões de segurança alimentar.

Cada isolado passou por processo de microcultivo para visualização de suas estruturas reprodutivas por meio de microscopia óptica. Esta etapa possibilitou a classificação dos 210 isolados em 12 diferentes grupos. Destes, 10 eram referentes a gêneros específicos, um para representantes do filo Basidiomycota e outro para os isolados não identificados (N.I.) (Figura 2). Dentre todos os isolados, destacaram-se indivíduos do gênero *Penicillium*, totalizando 44 linhagens seguidos dos grupos N.I. ( $n = 30$ ), *Aspergillus* ( $n = 29$ ) e *Trichoderma* ( $n = 25$ ).

Dentre estes, destaca-se a presença de linhagens do gênero *Aspergillus*, as quais podem ou não apresentar toxicidade por meio da produção de aflatoxinas. Menos recorrentes, grupos representados pelos gêneros *Colletotrichum*, *Diaporthe* e *Cladosporium* também foram isolados das polpas., Representantes do filo Basidiomycota foram encontrados com certa recorrência, especialmente nos frutos da sapota do Solimões e do açáí.

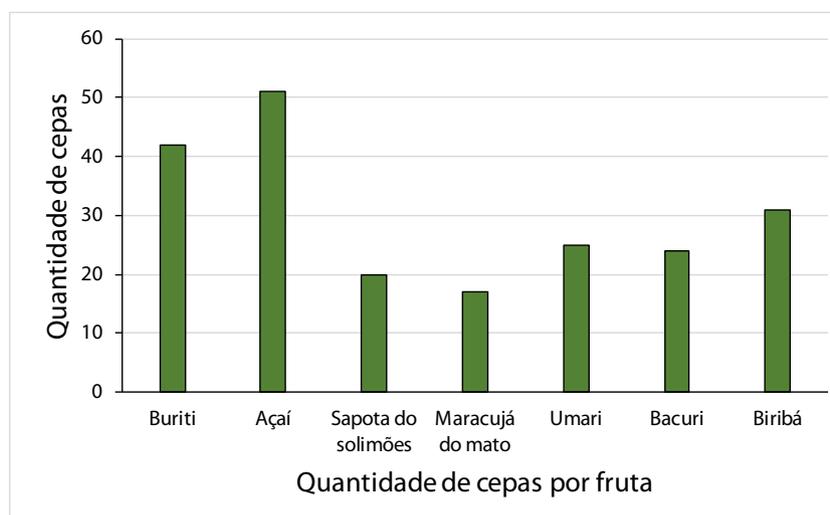


Figura 1. Identificação das frutas.

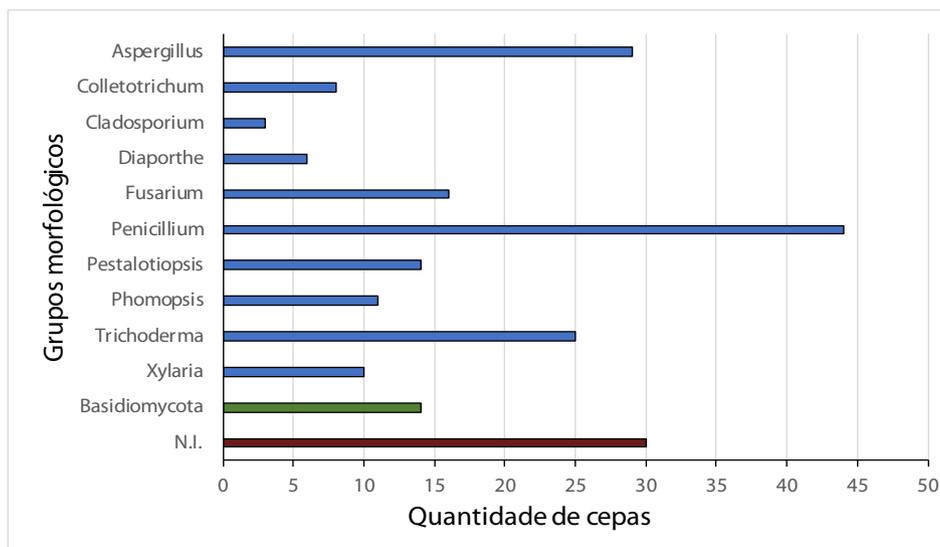
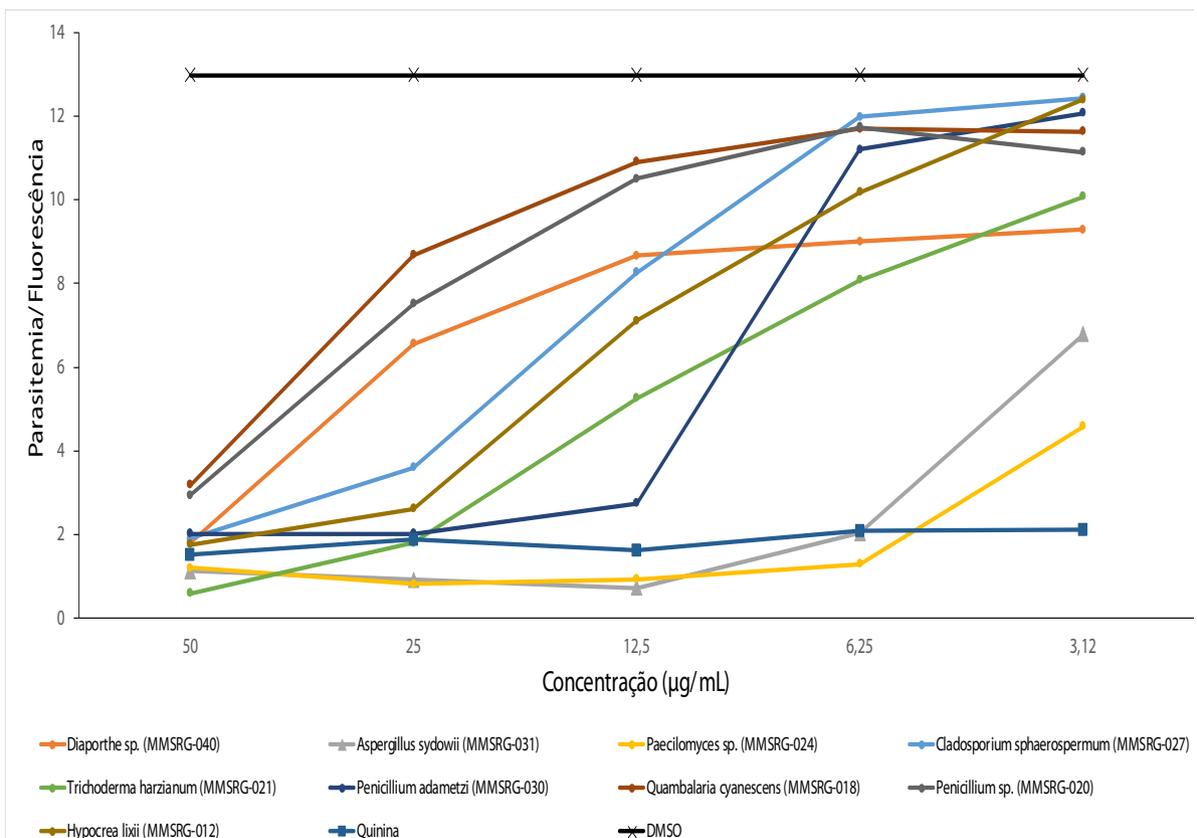


Figura 2. Distribuição das classificações em grupos ( $n = 12$ ) baseado na morfologia e análise por microscopia óptica das linhagens isoladas a partir das frutas regionais.

Os microrganismos isolados, após adequadamente preservados, foram fermentados em meios sólidos arroz e sucrilhos de modo a serem produzidos os metabólitos a serem testados. No total, 420 fermentações foram realizadas, onde observou-se que todos as linhagens apresentaram crescimento satisfatório. Em especial, o meio de sucrilhos, inédito neste trabalho, apresentou uma taxa de crescimento micelial e produção de metabólitos superior ao arroz e a meios líquidos convencionais. Isto abre possibilidades para a utilização deste meio de cultura de baixo custo, especialmente para a padronização de formulações com aditivos, sejam eles orgânicos ou inorgânicos. Ao final foram excluídas as linhagens que não apresentaram produção de metabólitos adequada (rendimento < 0,01 % de extrato, m/m). Desta forma, foram selecionados 348 extratos para os testes.

Observa-se que apenas 2,6% dos extratos testados foram ativos. Desta forma, apenas as linhagens que apresentam atividade foram selecionadas para serem identificadas por ferramenta moleculares. A Figura 3 apresenta os resultados em termos da concentração inibitória mínima que resultou em pelo menos 70% de inibição, e ou parasitemia (fluorescência) entre 0 e 3,5.

Dentre as linhagens que apresentaram atividade, os fungos *Penicillium* sp. MMSRG-020, *Diaporthe* sp. MMSRG-040 e *Quambalaria cyanensis* MMSRG-018 apresentaram atividade antimalárica apenas na concentração basal de 50 µg/mL, o que caracteriza uma atividade fraca. Este último, o único representante do filo Basidiomycota de nossa coleção que apresentou atividade. Fungos deste gênero são de rara ocorrência, sendo mais descritos como patógenos do eucalipto e até mesmo como patógenos humanos (Kuan *et al.*, 2015). Este fungo apresenta brotamento de pseudo-hifas e células leveduriformes, além de ausência de corpo de frutificação, o que o mantém isolado dentro da família Quambalariaceae da classe dos Exobasidiomycetes (Simpson, 2000).



**Figura 3.** Distribuição da parasitemia em função da concentração (µg/mL) para as espécies ativas. Controle positivo quinina e controle negativo DMSO.

Os fungos *Cladosporium sphaerospermum* MMSRG-027, *Hypocrea lixii* MMSRG-012 e *Trichoderma harzianum* MMSRG-021 apresentaram potencial antimalárico moderado (25 µg/mL). Destaca-se que em estudos prévios, a substância trichodermol isolada de *T. polysporum* e *T. sporulosum* é um potencial agente antimalárico (Reino *et al.*, 2008). Além disso, o gênero *Hypocrea* é o telomorfo de *Trichoderma*, e conseqüentemente, possui potencial para produzir substâncias semelhantes, o que demanda estudo futuros.

O fungo *Penicillium adametzi* MMSRG-030 apresentou potencial elevado com inibição na concentração de 12,5 µg/mL. Diversas moléculas antimaláricas foram descritas para este gênero, em especial destacam-se as recentemente descritas: ácido puberélico e viticolinas A-C de *P. viticola* (Iwatsuki *et al.*, 2010 e os penicilinos A-E de *Penicillium* sp. (Intaraudom *et al.*, 2013). Os fungos *Paecilomyces* sp. MMSRG-024 e *Aspergillus sydowii* MMSRG-031 apresentaram elevado potencial antimalárico com inibição na concentração de 6,25 µg/mL, comparável à do fármaco quinina (1,6 µg/mL). Destes gêneros foram isoladas moléculas com elevada atividade contra *P. falciparum*, como o ciclodepsipeptídeo beuvaricina de *Paecilomyces tenuipes* (Nilanonta *et al.*, 2000) e dibenzofuranonas karnatakafuranos A e B de *A. karnatakaensis* (Manniche *et al.*, 2004). Em especial, a espécie *A. sydowii* é de rara ocorrência em ambientes terrestres sendo este encontrado como patógeno em diversos corais do caribe (Alker *et al.*, 2001).

## Conclusões

Frutos regionais comestíveis constituem uma fonte promissora de fungos endofíticos das mais diversas espécies. Destaca-se o isolamento de aproximadamente 210 linhagens dos filos Ascomycota e Basidiomycota habitando as polpas dos frutos açaí do Amazonas (*Euterpe precatória*), bacuri (*Platonia insignis*), biribá (*Annona mucosa*), buriti (*Mauritia flexuosa*), maracujá do mato (*Passiflora cincinnata*), sapota do Solimões (*Matisia cordata*) e umari (*Geoffroea spinosa*).

Grande parte das linhagens demonstrou potencial para a produção de metabólitos na forma de extratos.

O meio em sucrrilhos foi o mais promissor, pois apresentou maior pigmentação quando comparado ao meio clássico de arroz. Dentre todos os fungos ensaiados, apenas nove apresentaram potencial antimalárico.

Destacaram-se as linhagens *Paecilomyces* sp. MMSRG-024 e *Aspergillus sydowii* MMSRG-031 com dosagens mínimas de inibição de 6,25 µg/mL.

Estes resultados demonstram que fungos são promissores fontes de novas moléculas no combate a malária, bem como endofíticos de frutos do Amazonas apresentam o mesmo potencial, porém ainda inexplorado.

## Referências

- Alker AP, Smith GW, Kim K 2001. Characterization of *Aspergillus sydowii* (Thom et Church), a fungal pathogen of Caribbean Sea fan corals. *The International Journal of Aquatic Sciences*, 460: 105-111.
- Amheim N, White T, Rainey WE 1990. Application of PCR: Organismal and population biology. *Bioscience*, 40(3):174-182.
- Azevedo JL, Maccheroni Jr W, Pereira JO, Araújo WL 2000. Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3(1):40-65.
- Carbone I, Kohn L 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3):553-556.
- De Capriles CH, Middelveen M, Mata S 1989. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia*, 106:73-79.
- Doyle JJ, Doyle JL 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19:11-15.
- Fabio A, Barros P, Rodrigues E, 2005. Four spiroquinazoline alkaloids from *Eupenicillium* sp. isolated as an endophytic fungus from leaves of *Murraya peniculata* (Rutaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 33:257-268.
- Harper JK, Arif AM, Ford EJ, Strobel G, Porco Jr JA, Tomer DP, Oneill KL, Heider EM, Grant DM 2003. Pestacin: a 1,3-dihydroisobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. *Tetrahedron Letters*, 59:2471-6.

- Intaraudom C, Boonyuen N, Suvannakad R, Rachtawee P, Pittayakhajonwut P 2013. Penicolinates A-E from endophytic *Penicillium* sp. BCC16054. *Tetrahedron Letters*, 54:744-748.
- Iwatsuki M, Takada S, Ishiyama A, Namatame M, Tukashima-Nishihara A, Nonaka K, Masuma R, Mori M, Shiomi K, Otaguro K, Omura S 2010. *In vitro* and *in vivo* antimalarial activities of puberulic acid and its new analogs, viticolins A-C, produced by *Penicillium* sp. FKI-4410. *The Journal of Antibiotics*, 64:183-188.
- Kuan CS, Yew SM, Toh YF, Chan CL, Lim SK, Lee KW, Na SL, Hoh CC, Yee WY, Ng KP 2015. Identification and characterization of a rare fungus, *Quambalaria cyanescens*, isolated from the peritoneal fluid of a patient after nocturnal intermittent peritoneal dialysis. *Plos One*, 10(12):0145932.
- Lee JC, Lobkovsky E, Pliam NB, Strobel G, Clardy J 1995. Subglutinols A and B: immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans*. *The Journal of Organic Chemistry*, 60:7076-7077.
- Ljungström I, Perlmann H, Schlichterle M, Scherf A, Wahlgren, M 2004. *Methods in malaria research*. 4th ed. MR4/ATCC, Manassas, Virginia.
- Manniche S, Sprogøe K, Dalsgaard PW, Christophersen C, Larsen, TO 2004. Karnatakafurans A and B: Two dibenzofurans isolated from the fungus *Aspergillus karnatakaensis*. *Journal of Natural Products*, 67:2111.
- Nilanonta C, Isaka M, Kittakoop P, Palittapongarnpim P, Kamchonwongpaisan S, Pittayakhajonwut D, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y 2000. Antimycobacterial and antiplasmodial cyclodepsipeptides from the insect pathogenic fungus *Paecilomyces tenuipes* BCC 1614. *Planta Médica*, 66:756-758.
- Petrini O, Sieber TN, Toti L, Viret O 1992. Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins*, 1:185-196.
- Puri SC, Nazir A, Chawla R, Arora R, Riyaz-ul-Hasan S, Amna T, Ahmed B, Verma V, Singh S, Sagar R, Sharma A, Kumar R, Sharma RK, Qazi GN 2006. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related tetralin lignans. *Journal of Biotechnology*, 122(4):494-510.
- Reino JL, Guerrero RF, Hernández-Galán R, Collado IG 2008 Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, 7:89-123.
- Simpson JA 2000. *Quambalaria*, a new genus of eucalypt pathogens. *The Australasian Mycologist Society*, 19(2):57-62.
- Souza AQL, Souza ADL, Filho SA, Pinheiro MLB, Sarquis MIM, Pereira JO 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta amazônica*, 34:185-195
- Specian V, Orlandelli RC, Felber AC, Azevedo JL, Pamphilea JA 2014. Metabólitos secundários de interesse farmacêutico produzidos por fungos. *Journal of Health Sciences*, 16(4):345-51
- Strobel G, Daisy B 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4):491-502.
- Trager W, Jensen JB 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science Magazine*, 193:673-675.

## ***Streptomyces* sp. isolados da Amazônia como agentes de biocontrole de fungos aflatoxigênicos**

Sara Freitas de Sousa<sup>1</sup>, Talita Cunha de Faria Liberal<sup>1</sup>, José Jeosafá Vieira de Sousa Júnior<sup>1</sup>, Brenna Victoria Laurido dos Santos<sup>1</sup>, Monnik Zanella Fabian<sup>1</sup>, Raphael Carlos Ferrer de Santana<sup>2</sup>, Janete Magali de Araújo<sup>2</sup>, Siu Mui Tsai<sup>3</sup>, Sílvia Katrine Rabelo da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Oeste do Pará (sara\_freitas\_stm@hotmail.com, lytacunha@hotmail.com, josejeosatajrstm@hotmail.com, victorialaurido07@gmail.com, monnik\_zanella123@hotmail.com, katrinerabelo@gmail.com)

<sup>2</sup> Departamento de antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (raphaelferrerbti@gmail.com, janetemagali@yahoo.com.br)

<sup>3</sup> Universidade Federal de São Paulo (tsaicena@gmail.com)

### **Resumo**

A utilização de microrganismos no controle de fitopatógenos têm despertado interesse industrial, visto a facilidade de manipulação microbiana e a obtenção de seus metabólitos secundários. As actinobactérias são um grupo de bactérias consideradas uma fonte inesgotável de compostos bioativos como enzimas que interferem no ciclo celular que ocasionam fortes danos à agricultura e, diante disto, neste estudo foi avaliado o potencial antagonico de actinobactérias da rizosfera de *Aniba parviflora* Syn Fragans (macacaporanga) frente a espécies de *Aspergillus*. O isolamento bacteriano em meio Ágar Asparagina levedura, a partir de uma suspensão microbiana de 10 g de solo rizosférico, durante 21 dias à 37°C. Após análise morfológica e molecular a partir do RNAr 16S e determinada a atividade antagonica das actinobactérias isoladas contra os fitopatógenos *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus niger* através do método de culturas pareadas. Foram isoladas 11 actinobactérias do gênero *Streptomyces* sp., todas ativas contra os fitopatógenos, com destaque para *Streptomyces* sp. MPO3, apresentando halos de inibição de 29,08 mm e 37,75 mm contra *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus niger*, correspondendo a um potencial inibitório de 83,53% e 86,31%, respectivamente. Estes dados qualificam estas actinobactérias como possíveis agentes microbianos de biocontrole de *Aspergillus*, sendo portanto, uma fonte promissora de moléculas ativas.

**Palavras-chave:** Actinobactérias, aflatoxigênicos, controle biológico.

### **Introdução**

Fungos fitopatogênicos são responsáveis pela decomposição de substratos celulósicos, acarretando desde o tombamento e mortalidade de plantas, podridão de sementes, estacas e do colo da planta, canchros, podridões de raízes, estagnação de crescimento, murchas, manchas a queimas e mofo (Michereff *et al.*, 2005). Além disto, algumas espécies produzem micotoxinas, como ocorre nos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (Sweeney e Dobson, 1999).

O consumo de alimentos contaminados com micotoxinas, tornou-se uma questão de saúde pública de proporção mundial, sendo que a contaminação destes alimentos pode ocorrer nos mais variados ambientes e em diferentes condições, desde o plantio, a colheita e o armazenamento do produto (Rudrew *et al.*, 2013).

A utilização de fungos e bactérias no controle biológico de fitopatógenos têm despertado o interesse industrial, visto a sua facilidade de manipulação microbiana e a obtenção de seus metabólitos secundários, que não sofrem interferência de sazonalidade como ocorre nos metabólitos produzidos por plantas. Assim, a prospecção de microrganismos promissores capazes de resolver a problemática do setor ambiental, agrônômico e florestal se apresenta como estratégia importante para a descoberta de novas moléculas efetivas, principalmente contra microrganismos que apresentam resistência aos fungicidas sintéticos comerciais (Bettiol e Morandi, 2009; Bettiol *et al.*, 2012; Vasconcelos, 2008).

Nesse contexto, o grupo das actinobactérias, bactérias filamentosas Gram-positivas, recebem destaque, por serem consideradas uma fonte inesgotável de compostos bioativos oriundos do seu metabolismo

secundário, produzindo moléculas de extrema diversidade química e ação biológica, como antibióticos, antitumorais, anti-inflamatórios, antivirais, antiparasitários, imunossupressores, além da produção de vitaminas, e enzimas, as quais interferem no ciclo celular dos fitopatógenos (Yarborough *et al.*, 1993; Jesus, 2013; Minotto, 2014).

As actinobactérias, quando associadas ao seu hospedeiro, podem conferir efeitos benéficos, tais como maior resistência a condições de estresse, alterações nas condições fisiológicas, suprimento de nitrogênio, produção de reguladores de crescimento vegetal e outros componentes como enzimas e fármacos. São capazes de colonizar nichos ecológicos também ocupados por fitopatógenos, sendo, portanto, possíveis de exercer o controle dos mesmos (Melo *et al.*, 2006; Jesus, 2013).

Com isso, objetivou-se prospectar actinobactérias da rizosfera de Macacaporanga (*Aniba parviflora*), assim como avaliar seu potencial antagonico frente a espécies de *Aspergillus*.

## Material e Métodos

O isolamento bacteriano foi realizado a partir da suspensão microbiana de 10 g de solo rizosférico preparada em tampão fosfato (pH 7,0), e cultivo em meio Agar Asparagina levedura durante 21 dias à 37°C. A seleção de actinobactérias foi realizada com base em análise morfológica das colônias em cultivo nos meios *International Streptomyces Project* (ISP) (Pridham *et al.*, 1956), e posteriormente análise micromorfológica por microscopia óptica de luz comum e microscopia eletrônica de varredura (LEO 5410LV) para caracterização da cadeia de esporos.

O DNA bacteriano foi extraído conforme descrito por Stirling (2003) a partir da suspensão celular (OD600 > 1.8) obtida em cultivo em meio líquido ISP2 a 30°C durante 72h. A reação de amplificação foi realizada utilizando a enzima Platinum®.Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen 11304-011) seguindo as recomendações do fabricante, feitas em termociclador Bioneer MyGenie 96 Thermal block (Global Genomics Partner) sob as seguintes condições: para o par de oligonucleotídeos Eub338F/Act1159R 95°C por 3'; 35 ciclos de 94°C (30''), 68°C (30''), 72°C (90''); extensão de 72°C (7') (FIERER *et al.*, 2005), e para o par fD1/rD1 95°C por 3'; 30 ciclos de 94°C (1'), 55°C (30''), 72°C (2'); extensão de 72°C (7'). O produto da PCR foi purificado utilizando o kit GFX (GE Healthcare 28-9034-70) e subclonado no vetor pCR™2.1-TOPO® utilizando o kit TOPO TA Cloning (ThermoFisher Scientific 451641). O plasmídeo clonado foi propagado em *E. coli* DH5-alpha e purificado utilizando o kit (Fermentas K0503). O sequenciamento Sanger foi realizado em sequenciador ABI PRISM 3730 DNA ANALYZER, Applied Biosystems/Hitashi, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores M13F (GTAAAACGACGGCCAGT) e M13R (AACAGCTATGACCATG) para todos os fragmentos subclonados no vetor pCR™2.1-TOPO®. Para o completo sequenciamento do 16S rRNA foi utilizado os oligonucleotídeos (LANE, 1991) 341-357F (CCTACGGGAGGCAGCAGCAG), 685-704f (GTAGSGGTGAAATACGTAGA) e 1099114f (GCAACGAGCGCAACCC). As seqüências obtidas foram analisadas no programa CLC Main Workbench versão 7.0. Os contigs foram comparados contra o banco de dados BLAST para confirmação do gênero.

O antagonismo foi verificado por meio do teste de culturas pareadas (MORETTO; GIMENES-FERNANDES; SANTOS, 2001), em que inicialmente, os isolados de actinobactérias foram repicados em uma extremidade (1 cm da borda) em placas contendo o meio de cultura sabouraud dextrose ágar (SDA), após 96 horas de inoculação, discos fúngicos de *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus niger*, com 5 dias de crescimento, cultivados em ágar sabouraud dextrose (SDA) a 28°C, foram colocados em outra extremidade (a 1 cm da borda) das placas SDA, opostas à actinobactéria. Placas sem o isolado de teste serviram como controle. Os microrganismos foram incubados a 30 ± 2°C por 4 dias. Após a incubação, a zona de inibição (em mm) foi medida e a inibição do crescimento da colônia (%) foi calculada usando a fórmula:  $PI = (CT) / C \times 100$ , onde PI é a porcentagem de inibição, C é o crescimento da colônia do controle e T é o crescimento de colônias do patógeno em cultura dupla. Todos os isolados foram testados em triplicata.

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os dados avaliados quanto a variância (ANOVA) e a significância estatística determinada pelo Teste de Tukey (p < 0,05), utilizando o software Assistat Versão 7.6 beta (Silva, 2008).

## Resultados e Discussão

Foram isoladas cinco actinobactérias, as quais apresentaram colônias bacterianas de aspecto velutino e pulverulento, com bom desenvolvimento do micélio aéreo nos meios ISP com coloração variando entre branco e cinza, sendo que, apenas o isolado MPO11 produz pigmento vermelho em meio ISP2. A morfologia da cadeia de esporos bacterianos observada variou entre cadeias retas longas, flexuosas ramificadas e *Retinaculum apertum*, e a análise das sequências de RNAr 16S obtidas apresentam similaridade entre 96 e 99% com o gênero *Streptomyces* sp.

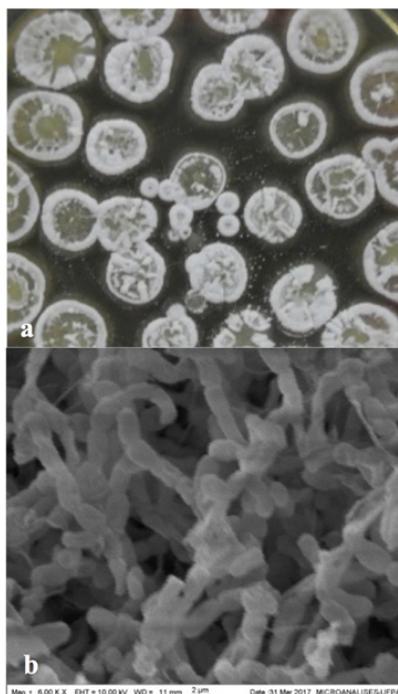
As cepas de *Streptomyces* sp. foram ativas contra os fitopatógenos, com destaque para *Streptomyces* sp. MPO3 (Figura 1), apresentando halos de inibição de até 29.1 mm e 37.7 mm contra os fungos *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus niger*, o que representa um potencial inibitório de 83,53% e 86,31%, respectivamente (Tabela 1).

A análise estatística indicou maior atividade antifúngica contra o microrganismo-teste *Aspergillus niger*, o qual não foi inibido apenas por *Streptomyces* sp. MPO10. Os dados diferem estatisticamente aos do teste com o fungo *Aspergillus parasiticus*, com halo de inibição de 27,90 mm.

**Tabela 1.** Atividade antifúngica de actinobactérias isoladas da rizosfera de *Aniba parviflora*.

Isolado	<i>Aspergillus parasiticus</i>		<i>Aspergillus niger</i>	
	Zona de inibição (mm)	PI (%)	Zona de inibição (mm)	PI (%)
MPO3	29,08 <sup>Aa</sup>	83,53 <sup>Aa</sup>	37,75 <sup>Aa</sup>	86,31 <sup>Aa</sup>
MPO7	27,73 <sup>Aa</sup>	80,36 <sup>Aa</sup>	33,97 <sup>Aa</sup>	78,42 <sup>Aa</sup>
MPO8	27,97 <sup>Aa</sup>	80,95 <sup>Aa</sup>	36,83 <sup>Aa</sup>	84,39 <sup>Aa</sup>
MPO10	27,90 <sup>Aa</sup>	80,75 <sup>Aa</sup>	0,00 <sup>Bb</sup>	0,00 <sup>Bb</sup>
MPO11	20,53 <sup>Bb</sup>	63,29 <sup>Bb</sup>	34,90 <sup>Aa</sup>	80,35 <sup>Aa</sup>

Obs.: Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna ou maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott. PI = Percentual inibitório ( $p < 0.05$ ).



**Figura 1.** Aspecto morfológico de *Streptomyces* sp. MPO3. A. Micélio aéreo no meio ISP-2. B. Microscopia de varredura da MPO3.

Quando submetidos ao tratamento com *Streptomyces* sp. MPO11, foi constatada maior atividade contra *Aspergillus niger*, diferindo estatisticamente de *A. parasiticus*, sendo registradas zonas de inibição de 34,90 mm e 20,53 mm, respectivamente. As zonas de inibição encontradas neste trabalho foram superiores quando comparadas com Vasconcelos (2008) que ao avaliar o efeito de espécies de actinobactérias sobre fitopatógenos, por meio do teste de contato direto, verificou que após 10 dias de contato, cinco das seis melhores actinobactérias selecionadas mantiveram a inibição contra *Fusarium* sp. isolado de sementes de milho com halos de inibição de aproximadamente 4 mm. Li *et al.* (2011) também pôde constatar uma inibição pronunciada de *Streptomyces* sp. Contra o patógeno *M. oryzae*, sendo descrita com uma zona de inibição de até 35 mm.

## Conclusão

Os dados revelam o potencial do gênero *Streptomyces* como fonte alternativa de moléculas antifúngicas efetivas no controle de fungos aflatoxigênicos do gênero *Aspergillus*, sendo um forte aliado à agricultura sustentável, podendo auxiliar na diminuição do uso de produtos químicos que ainda constituem uma das principais práticas utilizadas em plantas cultivadas.

## Referências

- Bettiol W, Morandi MAB 2009. Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas. Controle Biológico de Plantas no Brasil. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Meio Ambiente*, 1:300-334.
- Bettiol W, Morandi MAB, Pinto Z, Paula Júnior TJ, Corrêa EB, Moura AB, Lucin CMM, Costa JCB, Bezerra JL 2012. Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas/ Wagner Bettiol... [et. al.]. – Jaguariúna, SP: *Embrapa Meio Ambiente*, 88 (I): 155.
- Jesus JA 2013. *Potencial biotecnológico de actinobactérias e bactérias diazotróficas endofíticas para o crescimento de plantas*. 2013. Campos dos Goytacazes – RJ. (M. Sc Dissertação. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro). 88f.
- Li QJY, Ning P, Zheng L, Huang J 2011. Suppression of *Magnaporthe oryzae* by culture filtrates of *Streptomyces globisporus* JK-1. *Biol. Control* 58 (I):139-148.
- Melo FMP, Melo IS, Teodoro MG, Scramim S 2006. *Diversidade de Actinobactérias da Rizosfera de Milho (Zea mays L.) e Potencial de Controle Biológico de Fusarium moniliforme e Pythium aphanidermatum*. Memórias da Jornada Acadêmica da Embrapa Meio Ambiente 2006: Jaguariúna). Anais da Jornada Acadêmica da Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, SP. 127 p.
- Michereff SJ, Andrade DEGT, Menezes M 2005. *Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais* / eds. Sami J. Michereff, Domingos E. G. T. Andrade, Maria Menezes. – Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. 398 p
- Moretto KCK, Gimenes-Fernandes N, Santos JM 2001. Influence of *Trichoderma* spp. on *Colletotrichum acutatum* mycelial growth and morphology and on infection of ‘Tahiti’ lime detached flowers. *Summa Phytopathologica*, 27(IV): 357-364.
- Pridham T, Hesseltine C, Benedict R 1958. A guide for the classification of streptomycetes according to selected groups. Placement of strains in morphological sections. *Applied Microbiology*, 6 (I): 52.
- Rudrew S, Craft J, Aidoo K 2013. Occurrence of toxigenic *Aspergillus* spp. and aflatoxins in selected food commodities of Asian origin in the west of Scotland. *Food and Chemical Toxicology*, 55 (I): 653-658.
- Shirling ET, Gottlieb D 1966. Method for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst.* <https://doi.org/10.1099/00207713-16-3-313>
- Silva FAS 2008. Sistema de Assistência Estatística–ASSISTAT versão 7 .6 beta (em linha). Departamento de Engenharia Agrícola [DEAG], CTRN, Universidade Federal de Campina Grande [UFCG], Paraíba, Brasil, Campina Grande. Disponível em < <http://www.assistat.com> > (Acesso em: 25 ago. 2017).
- Stirling D. 2003. DNA extraction from fungi, yeast, and bacteria. *Methods Mol Biol*, 226 (I): 53-54.
- Sweeney MJ, Dobson ADW 1999. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 175(I): 49-163.
- Vasconcelos RLF 2008. *Actinobactérias da rizosfera de Araucaria angustifolia com potencial biotecnológico*. Piracicaba, Brasil. (Dr. Tese. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”). 72 f.
- Yarbrough GG, Taylor DP, Rowlands RT, Crawford MS, Lasure LL 1993. Screening microbial metabolites for new drugs: theoretical and practical issues. *The Journal of Antibiotics* 46(I):535-544.

## Contagem de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva em carne moída comercializada em Manaus, AM.

Rodiney Medeiros dos Reis<sup>1\*</sup>, Érika Tavares Pimentel<sup>1</sup>, Joziane Souza da Silva<sup>2</sup>, Bianca Cristina Rocha de Oliveira<sup>2</sup>, Luciene Almeida Siqueira de Vasconcelos<sup>1</sup>, Felipe Faccini dos Santos<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCAN), Faculdade de Ciências Agrárias (FCA), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas, Brasil

<sup>2</sup> Instituto Federal do Amazonas (IFAM), Campus Manaus Zona Leste (CMZL), Manaus, Amazonas, Brasil

\*Emails: rodiney\_reis@hotmail.com; felipe.santos@ifam.edu.br.

### Resumo

A carne moída destaca-se dentre os produtos cárneos populares e pode oferecer um elevado risco de contaminação. Por ter uma maior superfície de contato e sofrer maior manipulação, pode se tornar um importante veiculador de microrganismos patogênicos, que comprometem a segurança do produto, além da contaminação por microrganismos deteriorantes que prejudicam sua qualidade. O objetivo desse trabalho foi avaliar a contagem de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva na carne moída comercializada na cidade de Manaus, Amazonas. Foram analisadas duas redes de mercados com seis coletas em cada e cinco coletas em açougues. De cada estabelecimento, foram adquiridas duas embalagens, sendo uma proveniente de carne previamente moída e outra da carne moída no momento da aquisição, totalizando 34 amostras entre janeiro e maio de 2018. As análises seguiram a metodologia preconizada pela IN n. 62 de 2003 do MAPA. Não houve diferença significativa na contagem de *Staphylococcus aureus* quando comparadas a carne moída na aquisição e a carne previamente moída. Somente duas amostras (5,88%), de carne previamente moída, apresentaram bactérias coagulase positivas, sendo uma do Supermercado B e outra de açougue. Estas contagens estavam acima do permitido pela legislação, possivelmente devido a falhas durante o processamento e manipulação, associados à forma de exposição do produto. É imprescindível a adoção de corretas práticas de higiene, manipulação e acondicionamento, visando minimizar possíveis riscos à saúde do consumidor.

**Palavras chaves:** higiene, toxina, segurança dos alimentos.

### Introdução

A carne bovina é um alimento essencial à alimentação humana, fundamental à manutenção das taxas de nutrientes e provisão de proteínas, ácidos graxos, vitaminas e minerais para o bom funcionamento do organismo. Devido o menor poder aquisitivo, a sociedade prefere carnes que também possuem bons parâmetros nutricionais, mas com menor valor de mercado, como a carne de frango e peixes.

Portanto, uma forma alternativa e econômica de ter acesso aos benefícios da carne bovina é através da carne moída, que se destaca dentre os produtos cárneos mais populares pelo seu preço reduzido, praticidade no preparo e disponibilidade nos mais variados estabelecimentos de comercialização de carnes (Motta *et al.*, 2000).

Seu processo produtivo consiste na moagem dos tecidos cárneos, o que torna o produto mais exposto e passível à contaminação. Por ter uma maior superfície de contato e sofrer maior manipulação, pode se tornar num importante veiculador de microrganismos patogênicos, que comprometem a segurança do produto e pode ser contaminado por microrganismos deteriorantes que prejudicam sua qualidade.

O Código Sanitário de Manaus descreve que nos estabelecimentos que comercializam carnes será facultada a venda de carne fresca moída, sendo feita essa operação obrigatoriamente na presença do comprador, ficando, porém, proibido mantê-la estocada nesse estado (Manaus, 1997). Entretanto, é comum encontrarmos a carne moída exposta nas vitrines dos balcões frigorificados de açougues e supermercados

em Manaus, contrariando a legislação vigente. Aliado à temperatura e acondicionamento inadequados, maus hábitos de higiene dos manipuladores ou ainda limpeza e sanitização deficiente de equipamentos e utensílios, pode se tornar um risco iminente à saúde do consumidor.

Dentre as doenças transmitidas por alimentos, há destaque aos surtos ocasionados por *Staphylococcus aureus*. A presença desse microrganismo no alimento é decorrente de práticas inadequadas de higiene e manipulação, uma vez que o mesmo está presente na pele e mucosas do ser humano, bem como sanitização de equipamentos. Conforme Hennekinne *et al.* (2012), a intoxicação alimentar por estafilococos resulta da ingestão de enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas em alimentos por cepas enterotoxigênicas de *Staphylococcus*, em especial as cepas coagulase positivas.

Essas enterotoxinas são resistentes ao calor e a ação das enzimas intestinais (Brooks *et al.*, 2000) e contagens próximas a  $10^5$  UFC/g indicam risco epidemiológico, porque esse é o número compatível com o início da produção de enterotoxina, uma vez que a linhagem em questão seja capaz de produzi-la (ICMSF, 2000). Esse estudo teve como objetivo avaliar a contagem de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva na carne moída comercializada na cidade de Manaus, Amazonas.

## Material e Métodos

Foram analisadas duas redes de mercados com seis coletas em cada e cinco coletas em açougues, contemplando as diferentes regiões da cidade para uma melhor distribuição da amostragem. De cada estabelecimento, foram adquiridas duas embalagens, sendo uma proveniente de carne previamente moída e outra da carne moída no momento da aquisição, totalizando 34 amostras analisadas entre janeiro e maio de 2018.

As amostras foram acondicionadas na sua embalagem original em caixa isotérmica com gelo reciclável em temperatura não superior a  $8^{\circ}\text{C}$ , e enviadas imediatamente ao laboratório para processamento. As análises foram realizadas no Laboratório de Ciências Biológicas e da Saúde do Campus Manaus Zona Leste do Instituto Federal do Amazonas (IFAM).

Inicialmente, foram pesadas asepticamente 25g da amostra de carne moída e colocada em Erlenmeyer contendo 225mL de solução salina peptonada 1% tamponada. A homogeneização da amostra foi feita com agitação manual durante um minuto. Em seguida foram realizadas diluições subsequentes de  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$ , em solução salina peptonada 0,1 %.

Foram inoculados 0,1mL das diluições selecionadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ) em placas contendo meio Ágar Baird-Parker (BPA), suplementado com emulsão de gema de ovo 5% e telurito de potássio 0,01%, e espalhado sob a superfície do meio com auxílio de alça de Drigalski. As placas (Figura 1) que continham entre 20 e 200 colônias foram selecionadas para contagem, verificando a presença de colônias típicas (negras brilhantes com anel opaco, rodeadas por um halo claro, transparente e destacado sobre a opacidade do meio) e colônias atípicas (acinzentadas ou negras brilhantes, sem halo ou com apenas um dos halos) (Brasil, 2003).

Foram selecionadas cinco colônias, confirmadas pela técnica de Gram como cocos Gram positivos (Figura 2), para semeadura em tubos contendo Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI), para a multiplicação das bactérias com incubação de  $36^{\circ}\text{C}$  por até 24 horas e realização dos testes confirmatórios de catalase e coagulase (Brasil, 2003).

A prova de catalase (Figura 3) foi realizada com a utilização de uma alíquota de peróxido de hidrogênio a 3% adicionado com alíquota de igual quantidade da amostra, como prova confirmativa para *Staphylococcus aureus*. Para verificar a produção de coagulase (Figura 4), foram adicionados 0,3 mL da cultura em tubos estéreis com 0,3 mL de plasma de coelho e incubado a  $35$  ou  $37^{\circ}\text{C}$ , por 4 a 6 horas. Os tubos foram inclinados, sendo considerados positivos os testes em que o coágulo ocupava mais da metade do volume original (Brasil, 2003).

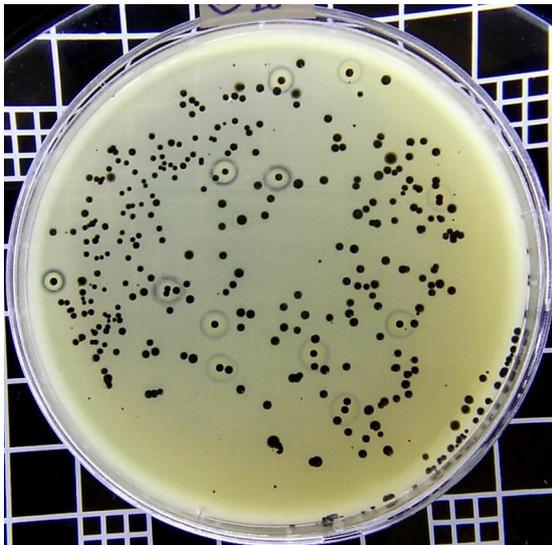


Figura 1. Placa de BPA com colônias típicas e atípicas de *Staphylococcus aureus*.

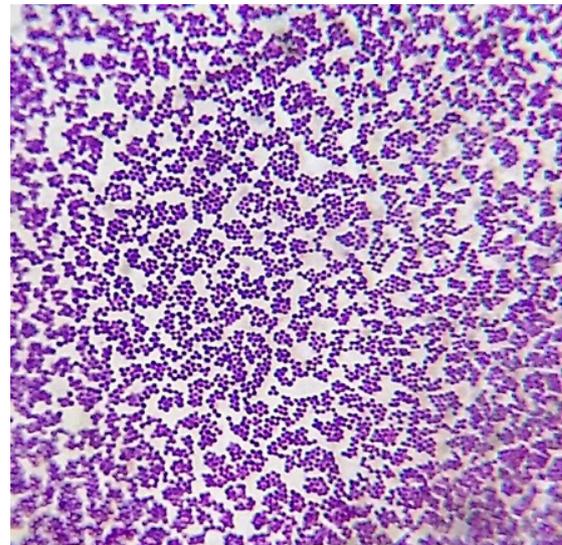


Figura 2. Identificação morfotintorial (cocos agrupados em cachos de uva, Gram +)

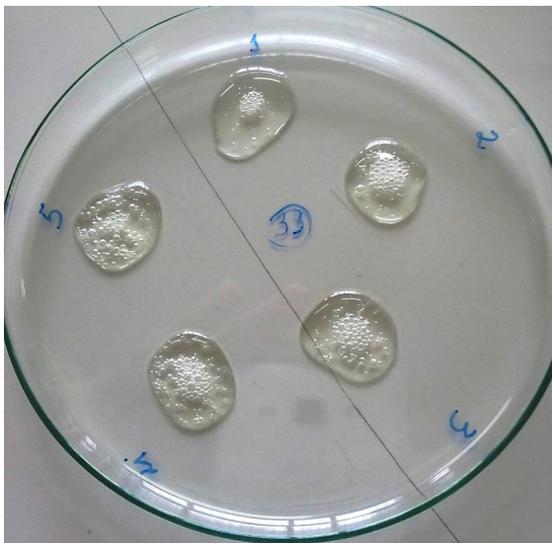


Figura 3. Prova de catalase



Figura 4. Prova de coagulase

Para a análise das contagens foi utilizada Análise de Variância (ANOVA) seguida do Teste de Tukey para comparação entre os tratamentos. As análises estatísticas foram realizadas com a utilização do Software InStat 3.1 (Graphpad), todos a um nível de significância de 5%.

## Resultados e Discussão

Os valores médios em números absolutos da contagem de *Staphylococcus aureus* foram elevados tanto para a carne moída na aquisição quanto para a carne previamente moída. Todavia não houve diferença significativa entre as duas formas de comercialização (Tabela 1). A legislação brasileira não estabelece limite máximo aceitável de *Staphylococcus aureus* para carne moída, contudo define para produtos cárneos crus, refrigerados ou congelados como hambúrgueres, almôndegas, quibe e similares, que levam carne moída como ingrediente principal, o valor de  $5,0 \times 10^3$  UFC/g para *S. aureus* coagulase positiva (Brasil, 2001).

Apesar de estarem presentes em números elevados, a maior parte dos isolados não produzia coagulase e, portanto, apresentam baixo risco para produção de toxinas (Hennekinne *et al.*, 2012). Esses dados evidenciaram uma baixa qualidade microbiológica nos dois processos. Independente da forma de comercialização, é fundamental que sejam cumpridos os procedimentos de boas práticas de higiene e manipulação.

Dentre as amostras analisadas, somente duas de carne previamente moída apresentaram-se como sendo coagulase positivas, sendo uma amostra do Supermercado B ( $7 \times 10^3$  UFC/g) e uma amostra de açougue ( $1,2 \times 10^5$  UFC/g), representando 5,88% do total de amostras. Estas contagens estavam acima do permitido pela legislação (Brasil, 2001), possivelmente devido a falhas durante o processamento e manipulação associados à forma de exposição do produto, o que constitui risco à saúde do consumidor. Conforme descreveram Germano e Germano (2008), a presença em níveis elevados nos alimentos de bactérias do gênero *Staphylococcus* sugere contaminação durante o processamento, por falta de higiene dos manipuladores. Almeida *et al.* (2010) afirmam que *S. aureus* coagulase positiva está geralmente relacionada a cepas patogênicas, além da possibilidade de apresentarem resistência a antibióticos.

Quando comparados os resultados do Supermercado A com B para *Staphylococcus aureus*, não houve diferença significativa (Tabela 2). Todavia ambos diferiram significativamente dos açougues, indicando falhas no processamento da carne comercializada nesses estabelecimentos. Isso ocorre devido o descumprimento dos requisitos básicos de higiene e manipulação, além da ausência de infra-estrutura compatível com as atividades, levando a contaminação cruzada durante as diferentes etapas do processamento do alimento.

**Tabela 1.** Valores médios  $\pm$  desvio padrão (DP) da contagem de *Staphylococcus aureus*, obtidos das amostras de carne moída na aquisição e carne previamente moída.

Forma de comercialização	n	<i>Staphylococcus aureus</i>	
		$\log_{10}$ UFC/g $\pm$ DP	UFC/g
Moída na aquisição	17	5,59a $\pm$ 0,66	$3,9 \times 10^5$
Previamente moída	17	5,77a $\pm$ 0,66	$5,9 \times 10^5$

Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente entre si (ANOVA/Tukey,  $p < 0,05$ ).

**Tabela 2.** Valores médios  $\pm$  desvio padrão (DP) da contagem de *Staphylococcus aureus*, obtidos das amostras de carne moída de duas redes de mercados e açougues.

Estabelecimento	n	<i>Staphylococcus aureus</i>	
		$\log_{10}$ UFC/g $\pm$ DP	UFC/g
Supermercado A	12	5,58b $\pm$ 0,76	$3,8 \times 10^5$
Supermercado B	12	5,38b $\pm$ 0,53	$2,4 \times 10^5$
Açougues	10	5,96a $\pm$ 0,42	$9,1 \times 10^5$

Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente entre si (ANOVA/Tukey,  $p < 0,05$ ).

## Conclusões

Os resultados indicaram que 5,88% das amostras de carne moída comercializada em Manaus encontravam-se fora do padrão aceitável para *Staphylococcus aureus* coagulase positiva e apresentaram contagens acima de  $10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> para *Staphylococcus aureus*.

É imprescindível a adoção de corretas práticas de higiene, manipulação e acondicionamento, bem como, investimentos em programas de capacitação para manipuladores de alimentos, visando minimizar possíveis riscos à saúde do consumidor.

## Agradecimentos

Os autores agradecem pelo auxílio financeiro de custeio e bolsa de estudos da terceira e do último autor ao PAD CIT-IFAM, Edital 002/2017/PPGI/IFAM, Projeto No 002, e à CAPES pela bolsa de estudos da segunda autora.

## Referências

- Almeida CA, Souza M R, Pinho L, Sobrinho ME, Silva MCB 2010. *Determinação de perigos microbiológicos em carnes bovinas resfriadas provenientes de abates clandestinos e comércio ilegal*. *Acta Veterinaria Brasilica*, Mossoró, 4(4):278-285.
- ANVISA Brasil 2001. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos*. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 10 de janeiro de 2001.
- Brasil 2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento / Secretaria de Defesa Agropecuária. *Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água*. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003.
- Brooks GF, Butel JS, Morse SA 2000. *Microbiologia Médica*. 21a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 612 p.
- Germano PML, Germano MIS 2008. *Higiene e vigilância sanitária de alimentos*. Manole, S. Paulo, 986 p.
- Hennekinne JA, Buyser ML, Dragacci S 2012. *Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation*. *FEMS Microbiology*. 36(4):815-836.
- ICMSF 2000. *International Committee on Microbiological Specification for Food Microorganisms in food. Their significance and methods of enumeration*. 2ed. Toronto: University Press, 439p.
- Manaus 1997. *Código Sanitário do Município de Manaus*. Constituição (1997). Lei nº 392/97, de 27 de junho de 1997 e Decreto 3.910 de 27 de agosto de 1997.
- Motta MRA, Belmonte MA, Panetta JC 2000. *Avaliação microbiológica de amostras de carne moída comercializada em supermercados da região Oeste de São Paulo*. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, 14(78/79):59-62.

## Análise microbiológica de granola e sementes oleaginosas comercializadas em Manaus – Amazonas

Débora de Oliveira Tinoco<sup>1</sup>, Pamela Epifânio Mattos<sup>1</sup>, Rainara Viana da Silva<sup>1</sup>,  
Cinthia Miluska Espinoza<sup>1</sup>, Raiane Áila Teixeira de Souza<sup>1</sup>, Raimundo Felipe da Cruz  
Filho<sup>2</sup>, Maria Francisca Simas Teixeira<sup>3</sup>, Salomão Rocha Martim<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Discentes do curso de Farmácia da Faculdade Estácio do Amazonas

<sup>2</sup> Pesquisador, Universidade Federal do Amazonas

<sup>3</sup> Professora Titular, Universidade Federal do Amazonas

<sup>4</sup> Professor, Faculdade Estácio do Amazonas

Emails: tin.debora08@gmail.com, pamelaepifanio20@gmail.com, nanaiviana4@gmail.com, cinthiamlle@hotmail.com, aila.raiane@gmail.com, rfilho@ufam.edu.br, mteixeira@ufam.edu.br, salomao.martim@gmail.com

### Resumo

A busca por uma alimentação mais saudável tem levado os consumidores a adquirirem produtos com elevado valor nutricional, como a granola e sementes oleaginosas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de granola, chia, castanha-do-Brasil e linhaça marrom comercializados em empórios da zona Centro-Sul da cidade de Manaus. Foram avaliadas as presenças de bactérias e fungos em amostras de granola e sementes oleaginosas. Para a contagem de coliformes a 45°C foi utilizada a Técnica do Número Mais Provável (NMP). Dos tubos considerados positivos na contagem de coliformes foi retirada uma alçada e inoculada em Caldo EC (*Escherichia coli*) para verificar a presença de *E. coli*. A presença de *Salmonella* sp. foi avaliada por plaqueamento seletivo diferencial. Em todas as amostras foi verificada contaminação por bactérias ou fungos. Houve prevalência de coliformes termotolerantes e fungos em todas as amostras, com contagens variando de 3 a 11 NMP/g e  $1 \times 10$  a  $2,5 \times 10^2$  UFC/g, respectivamente. Em nenhuma amostra foi evidenciada contaminação por *Salmonella* sp. e *Escherichia coli*. Todas as amostras estavam em conformidade com a legislação vigente. Contudo, os resultados demonstram a necessidade de melhoria nas etapas de produção e armazenamento dos produtos para manutenção da saúde do consumidor.

**Palavras-chave:** Alimentos, Castanha-do-Brasil, Coliformes, Fungos, Microbiologia.

### Introdução

A busca pela melhoria da qualidade de vida tem levado os consumidores a comprarem alimentos mais saudáveis. Neste sentido, houve incremento do consumo de alimentos que, além de fornecerem nutrientes básicos, ainda contém compostos bioativos que auxiliam na prevenção de doenças degenerativas (Porfírio *et al.*, 2014; Dias, 2016).

A utilização de alimentos à base de cereais na dieta humana promove o aumento da ingestão de fibra dietética, vitaminas e compostos antioxidantes (Padmashree *et al.*, 2012). A granola tem se destacado como um produto alimentício, elaborado com cereais, que possui elevado valor nutricional (Mendoza *et al.*, 2016).

Estudos demonstram aumento do consumo de sementes oleaginosas como as castanhas, a chia, a linhaça e o amendoim, que são fontes de carboidratos, proteínas, fibras e sais minerais. Compostos com atividade biológica como a vitamina E, ômega 3 e 6, também encontrados nestas oleaginosas, são importantes para a prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes mellitus e diversos tipos de câncer (Grilo *et al.*, 2013; Eckert e Almeida, 2014).

No Brasil, o consumo de granola e sementes oleaginosas tem crescido a cada ano. Contudo, o armazenamento e a manipulação inadequada de produtos alimentícios pelos consumidores contribuem para a contaminação destes alimentos por fungos e bactérias que além de causar deterioração, reduzem o valor nutricional, alteram as qualidades organolépticas e podem causar doenças graves em humanos (Stelato *et al.*, 2010).

As doenças transmitidas por alimentos (DTAS) constituem um dos problemas de saúde pública mais relevante da atualidade. As DTAS são causadas por bactérias e vírus, que infectam o organismo humano devido a ingestão de água ou alimentos contaminados (Oliveira *et al.*, 2010). Outros organismos associados às DTAS são os fungos produtores de micotoxinas que causam intoxicações, imunossupressão, teratogênese, mutagênese, além de estarem relacionadas com o desenvolvimento de diversos tipos de câncer (Chen *et al.*, 2015; Moreira, 2016).

Considerando que produtos alimentícios tais como a granola e as sementes oleaginosas podem ser contaminadas por microrganismos e o consumo desses produtos alimentícios tem crescido nos últimos anos, o objetivo deste projeto foi avaliar a qualidade microbiológica de granola e sementes oleaginosas comercializadas em empórios da Zona Centro Sul Cidade de Manaus - AM.

## Material e Métodos

Amostras de Castanhas-do-Brasil, chia, granola e linhaça marrom foram adquiridas em empórios, denominados A, B, C e D, localizados na Zona Centro Sul da cidade de Manaus. De cada estabelecimento comercial, foram adquiridas quatro amostras dos produtos alimentícios supracitados, constituindo um total de 16 amostras. Após aquisição, os produtos alimentícios foram conduzidos ao laboratório de Microbiologia da Faculdade Estácio do Amazonas.

Para realizar a contagem de coliformes a 45 °C e *Escherichia coli* foi utilizada a Técnica do Número mais provável (NMP). Para a contagem presuntiva de coliformes totais, 25 g de cada formulação do molho foram homogeneizados em 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v), correspondendo à diluição  $10^{-1}$ . Diluições decimais  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  foram preparadas com o mesmo diluente. Alíquotas de 1 mL de cada diluição foram inoculadas em três tubos com Caldo Lauril Sulfato contendo tubos de Durhan invertidos que foram incubados a 35 °C por 24 a 48 horas. Após este período, dos tubos com indicação de contaminação (turvos e com produção de gás) foi transferida uma alçada para tubos contendo caldo EC incubado a 44,5° C, por 24 horas. Os tubos considerados positivos foram comparados com a Tabela do Número Mais Provável (NMP).

Para avaliação da presença de *Salmonella* sp. foi realizado o pré-enriquecimento, homogeneizando-se 25 g de amostra com 225 mL de caldo de pré-enriquecimento que foi incubado a 35 °C por 24 horas. Em seguida, foi realizado o enriquecimento em caldos seletivos, inoculando-se 1 mL do pré-enriquecimento em tubos com 10 mL dos caldos Selenito - Cistina e 0,1 mL no caldo Rappaport, incubados a 35 °C (24 horas) e 42 °C (24 horas), respectivamente, em banho-maria. Após incubação, foi realizado o plaqueamento seletivo diferencial em placas contendo ágar Hektoen-Enteric (HE), ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), ágar Bismuto Sulfito (BS), incubados a 35 °C por 24 horas.

Para a contagem de fungos filamentosos e unicelulares foi utilizada a técnica por espalhamento em superfície, em que foram pesados assepticamente 25g da amostra e diluído em 225ml de água peptonada a 0,1% (p/v) e homogeneizada. Em seguida foram realizadas as diluições seriadas ( $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ). Posteriormente, foi retirado 0,1 ml de cada diluição e inoculado em placas contendo Ágar Dicloran Glicerol 18%, com o auxílio da alça de Drigalski. As placas foram incubadas entre 22-25°C por 5 dias sem inverter. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama.

## Resultados e Discussão

Os resultados da qualidade microbiológica da granola, castanha-do-Brasil e linhaça marrom comercializadas nos empórios da zona Centro-Sul da cidade de Manaus foram comparados com RDC N° 12 de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 2001). A semente de chia, de acordo com o Guia para Comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes, é classificada como um produto alimentício sem histórico de uso e, portanto, sem parâmetros microbiológicos específicos disponíveis na legislação Brasileira. Neste sentido, a análise microbiológica deste alimento foi comparada com os padrões microbiológicos preconizados na legislação argentina, conforme citado por Coelho e Salas-Mellado (2014).

Na análise microbiológica das amostras de granola foi observada a presença de fungos com contagens variando de 10 a 20 UFC/g. Neste produto alimentício também foi observada contaminação por coliformes termotolerantes (3 a 11 NMP/g). Não houve crescimento de *E. coli* e nem de *Salmonella* sp (Tabela 1). De acordo com a legislação brasileira, todas as amostras de granola estão dentro dos padrões sanitários vigentes. Vecchia e Castilhos-Fortes (2007) também evidenciaram contaminação por fungos em amostras de granola comercializadas em Porto Alegre. Santos *et al.* (2013) relataram que amostras de granola vendidas em Teresina-PI apresentaram 80% de contaminação por fungos.

Nas amostras de castanha-do-Brasil analisadas foi evidenciada a contaminação por coliformes termotolerantes e fungos em 50 % e 25% dos produtos alimentícios. Não foi observado crescimento de *E. coli* e nem de *Salmonella* sp (Tabela 2).

Martins e Martins (2011) evidenciaram a presença de coliformes termotolerantes (< 3 a 240 NMP/g) em amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil comercializadas em Rio Branco-AC. Eglezos *et al.* (2008) não observaram crescimento de *E. coli* em castanha-do-Brasil. Midorikawa *et al.* (2008) e Costa *et al.* (2016) também constataram a presença de fungos em amostras de castanha-do-Brasil. As contagens tanto de fungos como de bactérias estão em acordo com a Legislação Brasileira que preconiza valores de  $10^3$  para coliformes a 45°C e não reporta valores para contagem de fungos.

No presente estudo, 50% das amostras de chia demonstraram contaminação tanto por fungos como para coliformes termotolerantes (Tabela 3). Na literatura científica há poucos dados em relação à qualidade microbiológica de sementes de chia. Wanderley e Oliveira (2014) relataram contaminação por fungos em 35% das amostras de chia comercializadas em Recife-PE.

**Tabela 1.** Análise microbiológica de granola comercializada em empórios da zona centro sul de Manaus.

Empórios	Fungos (UFC/g)	Coliformes a 45 °C (NMP/g)	<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	<i>Salmonella</i> sp. (UFC/g)
A	Ausência	< 3	Ausência	Ausência
B	Ausência	11	Ausência	Ausência
C	20	< 3	Ausência	Ausência
D	10	3	Ausência	Ausência
Legislação	Sem padrão	500	Sem padrão	Ausência

**Tabela 2.** Análise microbiológica de Castanha-do-Brasil comercializada em empórios da zona centro sul de Manaus.

Empórios	Fungos (UFC/g)	Coliformes a 45 °C (NMP/g)	<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	<i>Salmonella</i> sp. (UFC/g)
A	Ausência	11	Ausência	Ausência
B	Ausência	<3	Ausência	Ausência
C	40	<3	Ausência	Ausência
D	Ausência	3	Ausência	Ausência
Legislação	Sem padrão	1000	Sem padrão	Ausência

**Tabela 3.** Análise microbiológica de chia comercializada em empórios da Zona Centro Sul de Manaus.

Empórios	Fungos (UFC/g)	Coliformes a 45 °C (NMP/g)	<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	<i>Salmonella</i> sp. (UFC/g)
A	50	3	Ausência	Ausência
B	Ausência	11	Ausência	Ausência
C	20	<3	Ausência	Ausência
D	Ausência	<3	Ausência	Ausência
Legislação	Sem padrão	Sem padrão	Sem padrão	Sem padrão

As amostras de linhaça apresentaram contagens de fungos variando de 10 a 250 UFC/g, enquanto que o quantitativo de coliformes termotolerantes foi 3 NMP/g. Não foi evidenciado crescimento de *Salmonella* sp. (Tabela 4).

Borges e Bonnas (2011) verificaram contagens de  $<0,3$  a  $1,1 \times 10^3$  NMP/g de coliformes termotolerantes e quantitativos de  $10^3$  a  $8 \times 10^3$  para fungos filamentosos. Neste estudo também não foi verificada a presença de *Salmonella* sp. em amostras de linhaça marrom. Vinicius *et al.* (2014) relataram que 59,27 % de amostras de linhaça comercializadas em Montes Claros-MG estavam com contagens de fungos acima de  $1 \times 10^3$  UFC/g. Moura *et al.* (2013) verificaram a contaminação em amostras de linhaça comercializadas em Natal-RN.

No presente estudo, todas as amostras estavam de acordo com os padrões exigidos pela legislação vigente. Dados ausentes. Na literatura científica é descrito que fungos e bactérias produzem e excretam compostos bioativos com propriedades toxigênicas. Neste sentido, são citadas as micotoxinas que são metabólitos secundários sintetizados por fungos durante sua proliferação, na época da colheita, durante o processamento ou armazenamento. Estas toxinas quando ingeridas em altas concentrações podem causar doenças ou morte de humanos e animais (Abbas *et al.*, 2017).

A proliferação de microrganismos pode causar mudanças na cor, textura, sabor e odor em alimentos. Os fatores mais importantes que afetam o crescimento microbiano em alimentos são divididos em: (a) fatores intrínsecos, que incluem o conteúdo de nutrientes, atividade de água, valor de pH, potencial redox, presença de substâncias antimicrobianas e barreiras mecânicas; (b) fatores extrínsecos, como a temperatura de armazenamento, a composição de gases e umidade relativa do ar na atmosfera que envolve os alimentos; (c) fatores de processamento, que incluem tratamentos como aquecimento, resfriamento e secagem que afetam a composição do alimento e também afetam os tipos e números de micro-organismos que permanecem nos alimentos após o tratamento tecnológico (Qadri *et al.*, 2015).

**Tabela 4.** Análise microbiológica de linhaça marrom comercializada em empórios da zona centro sul de Manaus.

Empórios	Fungos (UFC/g)	Coliformes a 45 °C NMP/g	<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	<i>Salmonella</i> sp. (UFC/g)
A	Ausência	3	Negativo	Ausência
B	Ausência	3	Negativo	Ausência
C	250	<3	Negativo	Ausência
D	10	3	Negativo	Ausência
Legislação	Sem padrão	100	Sem padrão	Ausência

## Conclusões

Nas amostras de granola, chia, castanha-do-Brasil e linhaça marrom predomina a contaminação por fungos e coliformes termotolerantes, mas não há presença de *Salmonella* sp e de *Escherichia coli*.

Os resultados demonstraram que todas as mostras estão de acordo com os padrões estabelecidos pela legislação brasileira.

A presença de coliformes termotolerantes indicam que há necessidade de melhoria nos processos de produção e armazenamento destes produtos alimentícios.

## Referências

- Abass AB, Awoyale W, Sulyok M, Alamu EO 2017. Occurrence of regulated mycotoxins and other microbial metabolites in dried cassava products from Nigeria. *Toxins*, 9(207):1-15.
- Borges CBF, Bonnas DS 2011. qualidade microbiológica da linhaça (*Linum usitatissimum* L.) in natura comercializada no município de Uberlândia-MG. *Enciclopédia Biosfera*, 7(12): 1-8.
- ANVISA Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Resolução RDC n.12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001.

- Chen AJ, Jiao X, Hu Y, Lu X, Gao W 2015. Mycobiota and mycotoxins in traditional medicinal seeds from China. *Toxins*, 7:3858-3875.
- Coelho MS, Salas-Mellado MM 2014. Composição química, propriedades funcionais e aplicações tecnológicas da semente de chia (*Salvia hispanica* L) em alimentos. *Brazilian Journal of Food Technology*, 17(4):259-268.
- Costa DA, Álvares VS, Nogueira RM, Kusdra JF, Maciel VT, Miqueloni DP 2016. Quality of Brazil nuts stored in forced aeration silos. *Revista Ceres*, 63(3):305-314.
- Dias BF, Santana GS, Pinto EG, Oliveira CFD 2016. Caracterização físico-química e análise microbiológica de cookie de farinha de aveia. *Revista de Agricultura Neotropical*, 3(3):10-14.
- Eckert RG, Almeida PGO. 2014. Análise centesimal e dosagem de ômega 3 em semente de chia (*Salvia hispanica*) e semente de linhaça (*Linum usitatissimum*), *Revista Varia Scientia Agrárias*, 4(1):49-64.
- Eglezos S, Huang B, Stuttard E 2008. A survey of the bacteriological quality of pre-roasted peanut, almond, cashew, hazelnut, and Brazil nut kernels received into three Australian nut-processing facilities over a period of 3 years. *Journal of Food Protection*, 71(2):402-404.
- Grilo EC, Costa PN, Lima MSR, Ribeiro PPC, Beserra AFL, Dimenstein R 2013. Determinação de vitamina E na castanha de caju e sua relação com a recomendação nutricional em humanos. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 72(1):41-46.
- Martins LMO, Martins WMO 2011. Parâmetros de qualidade de amêndoas de castanha do Brasil comercializadas em Rio Branco-Acre. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, 5(2):542-549.
- Mendoza VS, Santos LL, Sanjinez-Argadoña EJ 2016. Elaboração de granola com adição de polpa e castanha de bacuri para consumo com iogurte. *Evidência*, 16(2):83-100.
- Midorikawa GEO, Pinheiro MRR, Vidigal, BS, Arruda MC, Costa FF, Pappas Jr GJ, Ribeiro SG, Freire F, Miller RNG 2008. Characterization of *Aspergillus flavus* strains from Brazilian Brazil nuts and cashew by RAPD and ribosomal DNA analysis. *Letters in Applied Microbiology*, 47:12-18.
- Moreira MF, Oliveira TR, Vieira IGP, Freire FCO, Silva SC, Ribeiro LM, Guedes MIF 2016. Occurrence of fungi and aflatoxins B in nuts and products marketed the Brazilian northeastern regions. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 75:1698.
- Moura EF, Rosa MS, Nascimento IC, Souza MAS 2013. Estabilidade físico-química e microbiológica de linhaça durante estocagem. *Revista UNI-RN*, 12(1):55-71.
- Oliveira ABA, Paula CMD, Capalonga R, Cardoso MRI, Tondo EC 2010. Doenças Transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. *Revista HCPA*, 30(3):279-285.
- Padmashree A, Sharma GK, Srihari KA, Bawa AS 2012. Development of shelf stable protein rich composite cereal bar. *Journal of Food Science and Technology*, 49(3):335-341.
- Porfírio E, Henrique VSM, Reis MJA 2014. Elaboração de farofa de grãos, sementes oleaginosas e castanha de caju: composição de fibras, ácidos graxos e aceitação. *Brazilian Journal of Food Technology*, 17(3):185-191.
- Qadri OS, Yousuf B, Srivastava AK, Yildiz F 2015. Fresh-cut fruits and vegetables: Critical factors influencing microbiology and novel approaches to prevent microbial risks-A review. *Cogent Food & Agriculture*, 1(1):1-11.
- Santos MRR, Cardoso Filho FC, Lima VBS, Sousa AWB, Caldas ML, Muratori MCS 2013. Pesquisa de fungos produtores de ocratoxina A em granola comercializada. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 72(3):206-10.
- Stelato MM, Concon MM, Shimada D, Srebernick SM 2010. Contaminação fúngica em barras de cereais comercializadas. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 69(3):285-90.
- Vecchia AD, Castilhos-Fortes R 2007. Contaminação fúngica em granola comercial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(2):324-327.
- Vinicius J, Prince PMA, Gonçalves MR, Carvalho PM 2014. Análise fúngica e pesquisa de aflatoxina na linhaça comercializada no município de Montes Claros-MG. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*, 8(3):39-43.
- Wanderley K, Oliveira I 2014. Determinação da Presença de Micotoxinas em Sementes de Chia (*Salvia Hispanica*) e Quinoa (*Chenopodium Quinoa*) Comercializadas no Município de Recife-Pe. In: Anais do 12º Congresso Latinoamericano de Microbiologia e Higiene de Alimentos - MICROAL 2014 [Blucher Food Science Proceedings, 1(1)]. São Paulo: Editora Blucher.

## Colonização radicular por fungos micorrízicos arbusculares em frutíferas componentes de Sistemas Agroflorestais de duas propriedades rurais do Amazonas

Ingrid Cândido de Oliveira Barbosa<sup>1</sup>, Francisco Wesen Moreira<sup>2</sup>, Luiz Antonio de Oliveira<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Bolsista INPA

<sup>2</sup> Pesquisadores do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Emails: ingridcandido.bio@gmail.com, wesen@inpa.gov.br; luiz.oliveira@inpa.gov.br

### Resumo

Relações entre microrganismos do solo e raízes de plantas superiores são importantes, devido aos benefícios/danos que proporcionam às plantas dependendo da natureza mutualística ou patogênica dos hospedeiros. Em Sistemas Agroflorestais (SAFs), essas relações são complexas, estimulando o crescimento vegetal, por meio de interações mutualísticas com microrganismos. Entender essas interações é importante, pois elas são afetadas por condições endoclimáticas. O trabalho teve como objetivo, avaliar a ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) nas raízes de frutíferas pertencentes a dois Sistemas Agroflorestais. As coletas das raízes foram realizadas nos meses de agosto/2012 (estação seca) e março/2013 (estação chuvosa). No SAF 1, localizado na Comunidade Rural do Brasileirinho, Manaus, coletou-se raízes de maracujá, cupuaçu, banana, açaí e laranja. No SAF 2, localizado em uma propriedade rural no município de Presidente Figueiredo, açaí, banana, cupuaçu, rambutan e goiaba. As colonizações radiculares foram avaliadas em 50 segmentos de raiz (1 cm) por planta e analisadas com auxílio de microscópio. Na época seca, a colonização radicular com hifas de FMAs nas espécies do SAF 1 variou de 1,9 a 20,8%, e 0,6 a 15,2% com vesículas. Houve pouca presença de arbúsculos. Todas as espécies de frutíferas apresentaram raízes colonizadas com fungos micorrízicos arbusculares nos dois Sistemas Agroflorestais avaliados. Houve uma predominância de colonização radicular na época chuvosa, quando comparada com a época seca. A espécie com maiores percentuais de raízes colonizadas foi a bananeira. As espécies com menores colonizações radiculares por FMAs no SAF 1 foram o cupuaçuzeiro, açazeiro e a laranjeira. No SAF 2, as espécies com menores colonizações radiculares por FMAs foram as goiabeiras na época seca e os açazeiros e rambutanzeiros na época de chuvas. Pelas quantidades de raízes com hifas, as associações plantas-fungos micorrízicos arbusculares nesses dois Sistemas Agroflorestais devem estar contribuindo para a nutrição e absorção de água pelas plantas.

**Palavras-chave:** Ecologia microbiana, colonização radicular.

### Introdução

Os sistemas agroflorestais (SAFs) representam uma das alternativas de uso da terra mais adequadas às características edafoclimáticas da Amazônia e muito utilizado entre os agricultores da região, onde cultivam espécies frutíferas, agrícolas e florestais, estabelecendo assim, um policultivo, trazendo diversos benefícios, tanto econômicos quanto ambientais, pois na Amazônia, predominam solos de baixa fertilidade e elevada acidez, limitando seus usos na agricultura (Nicholaidis *et al.*, 1983). O uso desses solos com SAFs é uma alternativa econômica e sustentável para a região, pois esses sistemas limitam, de certa forma, a floresta primária, mas com a vantagem de serem mais ricos em espécies importantes para o homem (Oliveira, 1991). Por sua vez, os sistemas agroflorestais estão sendo reconhecidos como uma importante alternativa de uso da terra em áreas alteradas e abandonadas, que pode desempenhar um papel fundamental nos planos de desenvolvimento das regiões tropicais úmidas, principalmente, na Amazônia brasileira. A integração entre espécies arbóreas e culturas agrícolas não visa somente à produção, mas também à melhoria na qualidade dos recursos ambientais, graças às interações ecológicas e econômicas que acontecem nesse processo, uma vez que a presença de árvores favorece a ciclagem de nutrientes, confere proteção ao solo contra erosão e melhora o microclima local.

Para que possam se beneficiar dos nutrientes dos solos, esses sistemas necessitam apresentar associações benéficas com microrganismos dos solos, tendo em vista a dificuldade dos produtores da Amazônia em adquirirem insumos agrícolas.

As relações entre microrganismos do solo e as raízes das plantas superiores são muito importantes do ponto de vista ecológico e econômico. Em Sistemas Agroflorestais (SAFs), essas interações são mais complexas, uma vez que os sistemas radiculares das espécies podem se entrelaçar e se influenciarem mutuamente (Oliveira, 1991).

As plantas estabelecem diversas relações com organismos em seus respectivos habitats. Destacam-se as relações mutualísticas com microrganismos, como os fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio. Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) fazem parte de um grupo de fungos benéficos denominados de endofíticos, principalmente pelos benefícios que estes proporcionam às plantas, como promoção de crescimento vegetal, no controle biológico de doenças, entre outras aplicações (Stone *et al.*, 2014). Eles se constituem em substitutos parciais ou totais de produtos químicos, favorecendo, desta maneira, a preservação do ambiente.

Diversas pesquisas foram realizadas com FMAs na Amazônia (Oliveira *et al.*, 1999, 2003; Oliveira e Oliveira, 2003, 2004, 2005, 2010 a, b), sendo esse estudo, mais um no avanço do conhecimento dessas associações plantas-fungos na região, tendo em vista sua importância econômica e ecológica.

## Material e Métodos

O trabalho consistiu em avaliar as colonizações radiculares por Fungos Micorrízicos Arbusculares de algumas frutíferas encontradas em dois Sistemas Agroflorestais em propriedades rurais do Estado do Amazonas. As coletas foram realizadas em dois Sistemas Agroflorestais: o SAF 1 localizado no ramal do Brasileirinho (Manaus) e o SAF 2, no município de Presidente Figueiredo. São dois SAFs bem diferentes um do outro, com espécies diferentes, que espelham a realidade encontrada nas comunidades rurais da Amazônia. Por serem diferentes, não foram feitas comparações entre eles, mas apenas a variação sazonal que pode ocorrer em cada um. Para isso, foram feitas duas coletas de raízes, sendo uma no mês de agosto de 2012 (época seca) e outra no mês de março de 2013 (época de chuva). No SAF 1 foram coletadas as seguintes espécies: maracujá (*Passiflora edulis*), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), banana (*Musa sp*), açaí (*Euterpe precatoria*) e laranja (*Citrus sp*). No SAF 2 as espécies coletadas foram: açaí, banana, cupuaçu, rambutan (*Nephelium lappaceum*) e goiaba (*Psidium guajava*). Foram coletadas amostras de raízes e transportadas até o laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos da Amazônia (LEBMAM), no INPA do V-8 para posterior análise.

Os fungos micorrízicos arbusculares foram avaliados pelo método de Kormanick *et al.* (1980) e Schenck (1982). Essas metodologias consistem no clareamento (KOH 10%) e coloração das raízes (azul de tripano). As colonizações radiculares foram avaliadas utilizando-se o método da lâmina, dispondo-se de 50 segmentos de raiz por planta, cada um com aproximadamente 1 cm de comprimento e analisadas em microscópio.

## Resultados e Discussão

A colonização radicular por fungos micorrízicos arbusculares (Tabela 1) das plantas componentes do SAF 1 variou de 2,6 a 46,4% na época seca (agosto) e 4,8 a 78,0% na época chuvosa (março). De um modo geral, a colonização por fungos micorrízicos foi mais elevada na estação chuvosa, indicando que neste período houve maior produção de raízes novas e finas e maior absorção de nutrientes pelas plantas. Houve poucos esporos aderidos às raízes, encontrados apenas na época chuvosa nas raízes de maracujá, laranja e banana. Os arbúsculos também pouco estavam presentes, sendo mais observados na época chuvosa. As bananeiras foram as que mais apresentaram hifas, vesículas e arbúsculos de todas as espécies estudadas neste SAF. Pela quantidade de raízes com hifas e arbúsculos, é a espécie que aparentemente mais está sendo favorecida pela simbiose com os fungos micorrízicos arbusculares. Isso porque são as hifas que exploram áreas distantes das raízes e auxiliam as plantas em absorverem água e nutrientes do solo. E é através dos arbúsculos que esses nutrientes e água chegam dentro das células vegetais (Siqueira *et al.*, 2010). Tendo em vista as porcentagens de raízes colonizadas por hifas e arbúsculos, as laranjeiras,

açazeiros e cupuaçuzeiros pouca contribuição estão tendo da simbiose com os FMA presentes no solo, enquanto que os maracujazeiros ficaram numa posição intermediária. As vesículas, por outro lado, têm como função principal, o armazenamento de energia para os fungos.

**Tabela 1.** Colonização por fungos micorrízicos arbusculares nas plantas coletadas no Sistema Agroflorestal do ramal do Brasileirinho, Manaus (SAF1).

SAF 1 (período seco) - % colonização					
Planta	Hifas	Vesículas	Arbúsculos	Esporos	Col. total
	----- % -----				
Período seco – agosto 2012					
Maracujá	9,0	2,5	1,0	0,0	12,5
Laranja	4,2	2,3	0,0	0,0	6,5
Banana	20,8	15,2	10,5	0,0	46,5
Açaí	1,9	3,6	0,0	0,0	5,5
Cupuaçu	2,0	0,6	0,0	0,0	2,6
Médias	7,6	4,8	2,3	0,0	13,7
Período chuvoso – março 2013					
Maracujá	11,2	0,0	0,0	1,2	12,4
Laranja	2,8	1,6	2,0	0,4	6,8
Banana	32,4	21,6	22,8	1,2	78,0
Açaí	6,4	8,8	0,8	0,0	16,0
Cupuaçu	2,4	1,2	1,2	0,0	4,8
Médias	11,0	6,6	5,4	0,6	23,6

No SAF 2, a bananeira e o açaí mostraram os maiores percentuais de raízes colonizadas com FMAs na época seca (Tabela 2), mas na época de chuvas, as raízes das bananeiras infectadas com esses fungos quase triplicaram, enquanto que as de açazeiros reduziram para menos da metade. As raízes das goiabeiras foram as menos colonizadas na época seca, enquanto que na chuvosa, os açazeiros e os rambutanzeiros foram os menos infectados.

Do mesmo modo que no SAF 1 (Tabela 1), a presença de hifas e arbúsculos são indicativos de que essa simbiose está ativa e contribuindo para uma melhor nutrição das plantas, principalmente quando os percentuais de raízes com hifas são superiores a 10%, conforme observados por outros trabalhos realizados na Amazônia, como os de Oliveira *et al.* (1999, 2003), Oliveira e Oliveira (2003, 2004, 2005). Apesar da presença de hifas ter sido semelhante nas duas épocas no SAF 2, a quantidade de raízes com arbúsculos foi maior na época chuvosa, sugerindo uma simbiose mais eficiente na transferência dos nutrientes e água para as células vegetais.

**Tabela 2.** Colonização por fungos micorrízicos arbusculares nas espécies coletadas no Sistema Agroflorestal em Presidente Figueiredo (SAF2).

SAF 1 (período seco) - % colonização					
Planta	Hifas	Vesículas	Arbúsculos	Esporos	Col. total
	----- % -----				
Período seco – agosto 2012					
Açaí	19,2	10,0	0,0	0,0	29,2
Banana	12,2	7,8	3,0	0,0	23,0
Cupuaçu	9,3	4,2	0,0	0,0	13,5
Rambutan	11,4	2,3	0,0	0,0	13,7
Goiaba	3,6	2,0	0,0	0,0	5,6
Médias	11,1	5,3	0,6	0,0	17,0

**Tabela 2.** Continuação

SAF 1 (período seco) - % colonização					
Planta	Hifas	Vesículas	Arbúsculos	Esporos	Col. total
----- % -----					
Período chuvoso – março 2013					
Açaí	3,6	1,6	4,0	3,2	12,4
Banana	28,8	4,4	18,0	9,2	60,4
Cupuaçu	14,0	4,2	3,6	2,8	24,8
Rambutan	8,8	1,6	4,4	2,0	16,8
Goiaba	4,8	2,4	9,6	6,0	22,8
Médias	12,0	2,8	7,9	4,6	27,4

## Conclusões

Todas as espécies de frutíferas apresentaram raízes colonizadas com fungos micorrízicos arbusculares nos dois Sistemas Agroflorestais avaliados.

Houve uma predominância de colonização radicular na época chuvosa, quando comparada com a época seca.

A planta com maiores percentuais de raízes colonizadas foi a bananeira.

As espécies com menores colonizações radiculares por FMAs no SAF 1 foram o cupuaçuzeiro, açaízeiro e a laranjeira.

No SAF 2, as plantas com menores colonizações radiculares por FMAs foram as goiabeiras na época seca e os açaízeiros e rambutanzeiros na época de chuvas.

Pelas quantidades de raízes com hifas, as associações plantas-fungos micorrízicos arbusculares nesses dois Sistemas Agroflorestais devem estar contribuindo para a nutrição e absorção de água pelas plantas.

## Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa de PIBIC para a primeira autora e auxílio financeiro e, FAPEAM pelo auxílio financeiro para a realização dessa pesquisa.

## Referências

- Araújo WL, Saridakis HO, Barroso PAV, Aguilar-Vildoso CI, Azevedo JL 2001. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal of Microbiology* 47: 229-236.
- Assumpção LC, Lacava PT, Dias ACF, Azevedo JL, Menten JOM 2009. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 44(5):503-510.
- Cardoso EJB, Tsai SM, Neves MCP 1992. *Microbiologia do solo*. Sociedade brasileira de ciência do solo. Campinas. 360 p.
- Carneiro MAC, Siqueira JO, Moreira FMS, Carvalho D, Botelho, S, Saggin Júnior JO 1998. Micorriza arbuscular em espécies arbóreas e arbustivas nativas de ocorrência no sudeste do Brasil. *Cerne*, 4:129-145.
- Kormanik PP, Bryan WC, Schultz RC 1980. Procedures and equipment for staining large numbers of plant root samples for endomycorrhizal assay. *Can. J. Microbiol.* 26: 536-538.
- Oliveira NA, Oliveira LA 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 NA, Oliveira LA 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 NA, Oliveira LA 2005. 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 AN, Oliveira L A 2010 a. Influence of Edapho-Climatic Factors on the Sporulation and Colonization of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Two Amazonian Native Fruit Species. *Brazilian Archives of Biology and Technology* (Impresso). 53:653 – 661.
- Oliveira, NA, Oliveira, LA 2010 b. Micorrizas arbusculares no bioma Amazônia *In: Siqueira, JO.; Souza, FA.; Cardoso, EJBN.; Tsai, SM (ed.). Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil. 1 ed., UFLA, Lavras, v.1, p. 251-277.*
- Oliveira NA, Oliveira LA, Figueiredo AF 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 LA. 1991. *Ocupação racional da Amazônia: o caminho para preservar. In: Val A.L, Figliuolo R, Feldberg E. (eds). Bases Científicas para Estratégias de Preservação e Desenvolvimento da Amazônia: Fatos e Perspectivas. Vol. 1. p. 47-52.*
- Oliveira LA, Guitton LT, Moreira FW 1999. Relações entre as colonizações por fungos micorrízicos arbusculares e teores de nutrientes foliares em oito espécies florestais da Amazônia. *Acta Amazonica*, 29:183-193.
- Peixoto Neto PAS, Azevedo JL, Caetano LC. 2004. *Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. BLACPMA*, 3: 69-72.
- Schenck NC. 1982. *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. The Amer. Phytopat. Soc. Publ., St. Paul, MN, USA. 224 p.
- Siqueira JO, Souza FA, Cardoso EJBN, Tsai SM. 2010. *Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil. 1 ed., UFLA, Lavras, 716p*
- Stone JK, Polishook JD, White Jr. JF. 2014. *Endophytic fungi. In: Torres MS, White Jr. JF (ed.) Encyclopedia of Science & Technology. McGraw-Hill Education. p. 241-270. DOI: 10.13140/2.1.3835.2169.*

# Aspectos nutricionais e ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares em frutíferas de propriedades rurais do Amazonas

Kethleen Maciel Carvalho<sup>1</sup>, Francisco Wesen Moreira<sup>2</sup>, Luiz Antonio de Oliveira<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Bolsista PIBIC/CNPq/INPA

<sup>2</sup> Pesquisadores do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Emails: wesen@inpa.gov.br, luiz.oliveira@inpa.gov.br

## Resumo

As associações micorrízicas arbusculares são uma alternativa de grande importância para minimizar o uso de fertilizantes em sistemas produtivos e pequenas propriedades rurais, por ajudarem as plantas a explorarem melhor o solo. São componentes importantes dos ecossistemas e desempenham papel crucial para sua funcionalidade e sustentabilidade. Os benefícios da simbiose para o hospedeiro resultam de melhorias no estado nutricional da planta, melhor utilização e conservação de nutrientes no sistema, redução de perdas por estresses de natureza biótica ou abiótica. Este estudo teve como objetivo, obter mais informações sobre as micorrizas em cultivos de espécies de importância econômica em propriedades rurais do Amazonas, para que se compreenda melhor o funcionamento destas associações. O trabalho foi realizado em Sistemas Agroflorestais de duas propriedades localizadas no km 6 e km 10 pertencentes à Comunidade do Brasileirinho, na periferia do município de Manaus, e em duas do município de Presidente Figueiredo, uma no km 23 do Ramal da Morena e outra no km 48 da estrada da Balbina. As espécies estudadas foram o açaizeiro, cupuaçuzeiro e bananeira. Os solos de Presidente Figueiredo apresentaram-se mais férteis do que os da Comunidade do Brasileirinho. A colonização radicular por fungos micorrízicos arbusculares apresentou índices baixos, que variaram de 5,4% a 10,2%, sendo os dois maiores resultados observados na bananeira (10,2%) da propriedade da Morena, seguido de 9,7% da propriedade localizada no km 6 na comunidade do Brasileirinho. As hifas exibiram níveis de 0,3% a 8,8% e as vesículas 1,7% a 9,2%. Esses dados sugerem que a contribuição dessa simbiose para a nutrição das plantas é baixa. As plantas coletadas em Presidente Figueiredo apresentaram maiores teores de Ca, Zn, Mn e Fe em relação às coletadas no Brasileirinho. Houve diferenças apenas nos teores de Ca, Mg e K nas folhas das três espécies de plantas.

**Palavras-chave:** Associações radiculares, Nutrição de plantas

## Introdução

Cerca de 90% dos solos da Amazônia são muito ácidos e de baixa fertilidade e deficientes em nitrogênio e fósforo, limitando seu uso na agricultura regional (Nicholaidis *et al.*, 1983; Embrapa, 1990). Considerando-se o alto custo dos adubos e outros insumos, além das dificuldades de transporte pelos agricultores regionais, métodos alternativos de fertilização devem ser buscados, visando um manejo mais racional e econômico dos recursos naturais. O aproveitamento das potencialidades das associações micorrízicas é uma alternativa de grande importância para aumentar a disponibilidade de nutrientes e sua absorção pelas plantas a custo zero. Essas associações poderão trazer um aumento no potencial produtivo das plantas nestes sistemas de produção, com baixos insumos, tornando-os bem-sucedidos na região, demonstrando a importância destes microrganismos.

As associações micorrízicas do tipo arbuscular, constituem uma alternativa de grande importância para minimizar o uso de fertilizantes, por ajudarem as plantas a explorarem melhor o solo (Oliveira, 1991; Siqueira *et al.*, 2002; Oliveira e Oliveira, 2003, 2004, 2005, 2010). Elas são componentes importantes dos ecossistemas e desempenham papel crucial para sua funcionalidade e sustentabilidade. Os benefícios da simbiose para o hospedeiro resultam de melhorias no estado nutricional da planta, melhor utilização e conservação de nutrientes no sistema, redução de perdas por estresses de natureza biótica ou abiótica (Siqueira *et al.*, 2010).

Deste modo, este estudo teve como objetivo, obter mais informações sobre as micorrizas em cultivos de espécies de importância econômica em propriedades rurais do Amazonas, para que se compreenda melhor o funcionamento destas associações, permitindo que sejam eficazes e auxiliem na viabilidade ecológica e econômica de sistemas agroflorestais nas áreas já desmatadas e auxiliando na preservação desta vasta região.

## Material e Métodos

O trabalho foi realizado em Sistemas Agroflorestais de duas propriedades localizadas no km 6 e km 10 pertencentes à Comunidade do Brasileirinho, na periferia do município de Manaus, e em duas do município de Presidente Figueiredo, uma no km 23 do Ramal da Morena e outra no km 48 da estrada da Balbina. As espécies estudadas foram o açaizeiro, cupuaçuzeiro e bananeira.

Foi realizada uma coleta de folhas, raízes e solos, no mês de outubro de 2009. Utilizaram-se cinco plantas de cada espécie por propriedade como repetições. As folhas foram retiradas segundo Van Den Driessche (1974) e separadas em três classes: das extremidades dos ramos (novas), intermediárias ou medianas (médias) e basais (velhas), conforme Dall'orto *et al.* (1976). As amostras de solos foram retiradas da rizosfera de cada planta, à profundidade de 0-10 cm.

Os fungos micorrízicos arbusculares foram avaliados pelo método de Kormanick *et al.* (1980) e pelas metodologias descritas em Schenck (1982). Essas metodologias consistem no clareamento (KOH 10%) e coloração das raízes (azul de tripano). As colonizações radiculares foram avaliadas utilizando-se o método da lâmina, dispondo-se de 50 segmentos de raiz por planta, cada um com aproximadamente 1 cm de comprimento e analisadas em microscópio. As amostras de solos foram submetidas a análises químicas descritas em Silva (2009) e EMBRAPA (2011) no laboratório do INPA. A análise química consistiu das seguintes metodologias: pH (H<sub>2</sub>O, KCl), Ca, Mg e Al (KCl 1N), P (extração pelo Mehlich e leitura por colorimetria), K, Mn, Zn e Fe (Mehlich 1, absorção atômica) e carbono pelo método de Walkley-Black. As folhas foram analisadas quimicamente quanto aos teores de macro e micronutrientes, usando-se a metodologia descrita em Silva (2009).

Para a contagem de esporos dos fungos micorrízicos arbusculares nos solos foi empregada a técnica de peneiramento úmida descrita por Gerdemann e Nicolson (1963) e Schenck (1982). A técnica consistiu na utilização de peneiras de 0,205, 0,105 e 0,04 mm de abertura, nesta ordem consecutiva. Para a contagem de esporos utilizou-se uma lupa, com aumento de 4,5X.

Para a análise estatística adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, empregaram-se o teste F e o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (Gomez e Gomez, 1948).

## Resultados e Discussão

Os solos, tanto do Brasileirinho quanto de Balbina (Tabela 1) demonstraram ser altamente ácidos. A maioria apresentou níveis de K médio e apenas os solos de Balbina, segundo Cochrane *et al.* (1985) foram considerados altos. Os níveis de P e Fe em todos os solos foram altos, indicando que foram fertilizados com algum adubo rico nesses nutrientes.

Quanto ao Zn, os solos da comunidade do Brasileirinho exibiram valores satisfatórios e baixos e nos de Balbina foram todos satisfatórios. O Mg apresentou quantidades baixas nos solos da comunidade do Brasileirinho e em Presidente Figueiredo demonstraram valores satisfatório e baixo. Os teores de K exibiram diferenças nos solos de P. Figueiredo, com valores médios e altos e os da comunidade do Brasileirinho apenas quantidades médias.

A colonização radicular por fungos micorrízicos arbusculares apresentou índices baixos, que variaram de 5,4% a 10,2%, sendo os dois maiores resultados observados na bananeira (10,2%) da propriedade da Morena, seguido de 9,7% da propriedade localizada no km 6 na comunidade do Brasileirinho (Tabela 2). As hifas exibiram níveis de 0,3% a 8,8% e as vesículas 1,7% a 9,2%. Os dados demonstram ausência de dominância das hifas sobre as vesículas. Isso aconteceu devido à coleta ter ocorrido em outubro, mês de transição do período chuvoso para o seco, quando a formação de raízes novas e finas, mais propícias à colonização pelos fungos micorrízicos arbusculares, ainda é baixa (Oliveira e Oliveira, 2003).

Os índices baixos, principalmente de hifas, sugerem que as micorrizas estão contribuindo muito pouco para a nutrição das plantas. Os FMA's beneficiam o crescimento das plantas, tendo efeito significativo com relação aos nutrientes de baixa mobilidade no solo, que se movem preferencialmente por difusão, processo extremamente lento (Cardoso *et al.*, 1992). Dentre estes nutrientes, destacam-se o fósforo (P) e o zinco e cobre, mas Oliveira *et al.* (1999, 2003), Oliveira e Oliveira (2003, 2004, 2005) encontraram correlações das colonizações micorrízicas também com outros macros e micronutrientes em plantas cultivadas em solos de terra firme da Amazônia. Os números de esporos de fungos micorrízicos arbusculares encontrados nas amostras de solos foram bem elevados, variando de 380 a 590 para cada 35 g de solo.

Ao se analisar os teores foliares das plantas (Tabela 3), comparando-se as duas localidades, observa-se que houve diferenças estatísticas para os teores de Ca, Zn, Mn e Fe, com os solos de Presidente Figueiredo proporcionando plantas com maiores teores desses elementos.

Uma análise desses teores por espécie de planta (Tabela 4) indicou que houve diferenças entre elas apenas para os macronutrientes Ca, Mg e K, com os dos micronutrientes sendo todos iguais estatisticamente. O açaizeiro apresentou os maiores teores de Ca, enquanto que o cupuaçuzeiro e a bananeira os maiores de Mg, com o K sendo maior apenas na banana.

**Tabela 1.** Teores de nutrientes dos solos amostrados do Brasileirinho e Presidente Figueiredo.

Local	pH	P	Fe	Zn	Mn	K
	H <sub>2</sub> O					
Brasileirinho	4,07 B	20,4 A	235 A	3,4 S	4,1 B	0,16 M
	4,42 B	21,6 A	135 A	1,4 B	4,7 B	0,12 M
P. Figueiredo	4,33 B	10,4 A	161 A	2,9 S	10,6 S	0,27 M
	4,30 B	8,1 A	98 A	4,4 S	2,7 B	0,06 A

Classificação dos valores segundo Cochran *et al.* (1985) A= alto; B= baixo; M= médio; S=(satisfatório).

**Tabela 2.** Colonização por fungos micorrízicos arbusculares nas espécies coletadas no Brasileirinho e Balbina.

Culturas	Hifas	Vesículas	Colonização Total	Propriedades
	%			
<b>Brasileirinho</b>				
Açaí	6,6	6,2	9,3	1 (km 6)
Cupuaçu	7,0	7,0	9,0	
Banana	8,2	8,2	9,7	
Açaí	6,3	6,8	7,7	2 (km 10)
Cupuaçu	6,6	9,2	9,7	
Banana	7,2	5,1	8,3	
Médias	7,0	7,1	8,9	
<b>Presidente Figueiredo</b>				
Açaí	5,6	7,6	8,2	Morena (km 23)
Cupuaçu	8,8	5,1	10,2	
Banana	1,2	4,0	4,8	
Açaí	0,3	2,8	2,3	José (km 48)
Cupuaçu	6,8	4,6	8,7	
Banana	4,9	1,7	5,4	
Médias	4,6	4,3	6,6	

**Tabela 3.** Teores de nutrientes foliares de açaizeiro, cupuaçuzeiro e bananeira em propriedades rurais do Brasileirinho e de Presidente Figueiredo.

	Locais	
	Brasileirinho	Presidente Figueiredo
Ca	4,9 b	5,6 a
Mg	2,3 a	2,0 a
K	8,6 a	11,3 a
Zn	13,9 b	19,6 a
Mn	134,0 b	196,6 a
Fe	82,0 b	180,6 a

Médias seguidas da mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

**Tabela 4.** Média dos teores de nutrientes foliares determinado em folhas de açaizeiro, cupuaçuzeiro e bananeira para os dois locais.

Nutrientes	Espécies		
	Açaizeiro	Cupuaçuzeiro	Bananeira
Ca	7,0 a	4,1 b	4,6 b
Mg	1,6 b	2,6 a	2,3 a
K	6,4 b	8,3 b	15,1 a
Zn	14,5 a	17,5 a	18,2 a
Mn	158,9 a	178,3 a	158,6 a
Fe	142,9 a	100,4 a	150,6 a

Médias seguidas da mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

## Conclusões

Os solos de Presidente Figueiredo apresentaram-se mais férteis do que os da Comunidade do Brasileirinho.

Os níveis de colonização radicular por fungos micorrízicos arbusculares foram baixos em todas as plantas e propriedades, não chegando a 10% de colonização por hifas e/ou vesículas, sugerindo que a contribuição dessa simbiose para a nutrição das plantas é baixa.

As plantas coletadas em Presidente Figueiredo apresentaram maiores teores de Ca, Zn, Mn e Fe em relação às coletadas no Brasileirinho.

Houve diferenças apenas nos teores de Ca, Mg e K nas folhas do açaí, cupuaçu e banana

## Referências

- Cardoso EJBN, Tsai SM, Neves MCP 1992. *Microbiologia do solo*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 360p.
- Cochrane TT, Sánchez LG, Azevedo LG, Porra, JA, Garver CL 1985. Land in Tropical América. A teoria na América Tropical. Centro Internacional de Agricultura (CIAT), Cali. Colômbia (EMBRAPA -CPCA). Planicultura D.F. BRASIL 444 p.
- Dall'orto FAC, Garlipp RCD, Brauner LJ, Miranda MT 1976. Concentrações de alguns macros e micronutrientes em essências florestais do parque da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, *Anais da E. S. A. "Luiz de Queiroz"*, 33:233-242.
- EMBRAPA. 1990. A questão agrícola da Amazônia – aptidão das terras. Embrapa – CPATU. Belém, (Embrapa – CPATU. Microcenários – Amazônia 2010), 135 p.
- EMBRAPA 2011. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de Métodos de Análise de Solo. 2.ed. 230 p.
- Gerdemann JW, Nicolson TH 1963. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by Wet sieving and decating. *Transactions of the British Mycological Society*, :235-244.
- Gomez KA, Gomez AA 1984. *Statistical procedures for agricultural research*. 2nd ed. John Wiley & Sons, New York, 680p.
- Kormanik PP, Bryan WC, Schultz R C 1980. Procedures and equipment for staining large numbers of plant root samples for endomycorrhizal assay. *Canadian Journal of Microbiology*, 26:536-538.
- Nicholaides JJ, Sanchez PA, Bandy DE, Villachica JH, Coutu AJ, Valverde CS 1983. Crop production systems in the Amazon Basin. In: Moran, E. (ed.) The dilemma of Amazonia Development, *Westview*, p. 101-153.
- Noda SN, Pereira HS, Branco FMC, Noda H 1997. O trabalho nos sistemas de produção de agriculturas familiares na várzea do Estado do Amazonas. Completar
- Oliveira LA 1991a. Phosphorus related to plant growth and plant-microorganism associations in amazonian soils. In: Tiessen H, López-Hernandez D, Salcedo IH eds. Phosphorus Cycles in Terrestrial and Aquatic Ecosystems. regional. Workshop 3: South and Central America, Maracay, Venezuela, p.186-195.
- Oliveira LA 1991b Ocupação racional da Amazônia: o caminho para preservar. In: Val LA, Figliuolo R, Feldberg E (eds). Bases Científicas para Estratégias de Preservação e Desenvolvimento da Amazônia: Fatos e Perspectivas. Vol. I. p.47-52.
- Oliveira AN, Oliveira LA 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 AN, Oliveira LA 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 AN, Oliveira LA 2005. 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 AN, Oliveira LA 2010. Micorrizas arbusculares no bioma Amazônia In: Siqueira, J.O.; Souza, F.A.; Cardoso, E.J.B.N.; Tsai, S.M. (ed.). Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil. 1 ed. Lavras: UFLA, v.1, p. 251-277.

- Oliveira AN, Oliveira LA, Figueiredo AF 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 LA, Guitton LT, Moreira FW 1999. Relações entre as colonizações por fungos micorrízicos arbusculares e teores de nutrientes foliares em oito espécies florestais da Amazônia. *Acta Amazonica*, 29:183-193.
- Schenck NC 1982. *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. The American Phytopathology Society Publication, St. Paul, MN, USA. 224 p.
- Silva FC 2009. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes, 2. ed. rev. ampl. - Brasília, DF, Embrapa Informação Tecnológica. 627 p.
- Siqueira JO, Souza FA, Cardoso EJBN, Tsai SM 2010. *Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil*. 1 ed. Lavras: UFLA, 716p.
- SUDAM 1984. Atlas Climatológico da Amazônia Brasileira. Projeto de Hidrologia e Climatologia da Amazônia. Superintendência de Desenvolvimento da Amazônia, (Public. n0 39), Belém, 125p. Tucci, CAF. 1991. Disponibilidade de fósforo em solos da Amazônia. Viçosa: UFV 142p. (Tese de Doutorado).
- Van Den Driessche HK 1974. Prediction of mineral nutrient status of trees by foliar analysis. *The Botanical Review*, 40(3):347-394.

## Macrofungos (Basidiomycota) da Floresta Nacional do Tapajós, PA, Brasil

Douglas de Moraes Couceiro<sup>1</sup>, Marcos Diones Ferreira Santana<sup>2</sup>,  
Sheyla Regina Marques Couceiro<sup>3</sup>

<sup>1</sup> PPG Biodiversidade, Universidade Federal do Oeste do Pará

<sup>2</sup> PPG Biodiversidade e Biotecnologia, Universidade Federal do Oeste do Pará

<sup>3</sup> Professor, Universidade Federal do Oeste do Pará

Emails: douglasmcouceiro@gmail.com, santana.mdf@gmail.com, sheylacouceiro@yahoo.com.br

### Resumo

Em 2017 foi estimada a existência de aproximadamente 3,8 milhões de espécies de fungos, dessas 144 mil foram descritas para o mundo até o presente. No Brasil, embora a diversidade estimada seja de aproximadamente 15 mil, se conhece apenas 5.719 espécies. Essa carência de estudos em diversidade de fungos, somada à rápida degradação ambiental, sobretudo na Amazônia, é preocupante e requer estudos intensivos. Assim, com o intuito de ampliar os estudos sobre a riqueza dos fungos basidiomicetos, foram realizadas coletas entre setembro de 2016 e setembro de 2017 com amostragem aleatória e registros fotográficos em uma parcela de 5 × 1 Km do Programa de Pesquisa em Biodiversidade (PPBio), na Floresta Nacional do Tapajós (FLONA do Tapajós), Km 67, cidade de Belterra, Oeste do Pará. Foram registradas 72 espécies, das quais *Geastrum*, *Marasmius* e *Polyporus* foram os gêneros de maior diversidade. Com um esforço amostral menor, a diversidade de basidiomicetos observados na FLONA do Tapajós foi semelhante à de outras Unidades de Conservação na Amazônia, sugerindo uma elevada micodiversidade, além de chamar atenção para intensificar os estudos nessa região da Amazônia.

**Palavras-chave:** Amazônia, Guia de campo, micodiversidade, taxonomia, Unidade de Conservação.

### Introdução

O mundo dos fungos é de uma diversidade aparentemente infinita (Kowalchuk *et al.*, 2006), os quais seus integrantes desempenham importantes funções ecológicas na decomposição e ciclagem de nutrientes e o controle de populações vegetais e animais por meio de relações patológicas e mutualísticas (Alexopoulos *et al.*, 1996; Kendrick, 2001).

Diversas estimativas sobre a riqueza de fungos foram propostas (e.g. Hawksworth, 2001; Mueller e Schmit, 2007; Blackwell, 2011; Hawksworth, 2012). No entanto, a possibilidade de existirem 1,5 milhão de espécies ainda é a mais aceita (Hawksworth, 2001), mesmo diante de estimativa recentes de existirem em torno de 3,8 milhões de espécies (Hawksworth *et al.*, 2017). Desproporcionalmente, se conhece entre 80 a 120 mil espécies (Webster e Weber, 2007; Hawksworth *et al.*, 2017).

Ascomycota e Basidiomycota são os filos mais diversos em número de espécies conhecidas (Webster e Weber, 2007). Ascomycota possui 64.143 espécies descritas, enquanto Basidiomycota possui cerca de 31.515 espécies (Kirk *et al.*, 2008). Para a América Central e América do Sul são estimadas 20.000 espécies de basidiomicetos (Mueller *et al.*, 2007), sendo que no Brasil, o Catálogo Brasileiro de Plantas e Fungos do Brasil (2010) estima que existam cerca de 15.000 espécies de fungos, dessas apenas 5.719 espécies foram documentadas com 1.050 ocorrendo na Amazônia (Maia *et al.*, 2015).

Os fungos Basidiomicetos (Agaricomycotina) também são conhecidos como cogumelos por formarem corpo de frutificação e apresentarem características exclusivas como a presença do grampo de conexão em suas hifas e, principalmente, basídios e basidiósporos (estruturas reprodutivas) (Ferreira, 2005; Evert e Eichhorn, 2013). São fungos comuns em ambiente de floresta e a diversidade pode ser muito maior em regiões tropicais, como na Amazônia (Hawksworth 2001; Maia *et al.*, 2015). No entanto, o reduzido número de estudos, associado a escassez de taxonomistas do grupo, desaceleram o conhecimento e o entendimento da biodiversidade e todos os processos que a envolve (Maia *et al.*, 2015).

Assim, é extremamente importante ressaltar que a carência de estudos sobre a diversidade de fungos, somada à rápida degradação da Amazônia, sinalizam a necessidade de estudos intensivos e mais específicos, tendo como objetivo incrementar o conhecimento sobre sua biodiversidade, padrões de distribuição, relação com outras espécies como subsídio ao manejo, conservação e uso de fungos em processos biotecnológicos (Agerer *et al.*, 2000). Este estudo tem como objetivo apresentar a diversidade de fungos basidiomicetos para a Floresta Nacional do Tapajós e disponibilizar um guia de campo para auxiliar futuras pesquisas em micodiversidade na região.

## Material e Métodos

A Floresta Nacional do Tapajós (FLONA do Tapajós) é uma Unidade de Conservação (UC), localizada no Oeste paraense, bioma Amazônico. A mesma possui ~545.000 ha de floresta ombrófila densa, caracterizando-se pela dominância de indivíduos arbóreos de grande porte e pela abundância de lianas lenhosas, palmeiras e epífitas (Veloso *et al.*, 1991). O clima é tropical úmido, classificado como Ami no sistema Köppen, com temperatura média anual de 25,9 °C e variação térmica anual inferior a 5 °C, com concentração de chuvas ocorrendo entre janeiro e maio, resultando em uma precipitação média anual de 2200 mm (Alvares *et al.*, 2013).

A área de estudo compreende uma parcela de 5 × 1Km do Programa de Pesquisas em Biodiversidade (PPBio) (2°50'10.99"S, 54°54'50.15"O, 2°50'46.35"S, 54°57'32.38"O), localizada no Km 67 do centro da Cidade de Santarém. Em expedições realizadas no período de setembro de 2016 a setembro de 2017, foram realizados registros fotográficos de forma aleatória e sempre que possível, amostras dos basidiomas eram coletadas.

A coleta dos basidiomas seguiu os métodos de documentação e preservação proposta por Fidalgo e Bononi (1989) e Lodge *et al.* (2004). As análises das microestruturas foram realizadas a partir de pequenos cortes do contexto à superfície himenial dos basidiomas, foram colocados entre lâminas e lamínulas, com solução de hidróxido de potássio 3% e reagente de Melzer (Teixeira, 1995, Ryvarden, 2004) e observados em microscópio óptico NOVA 107-T. Para a identificação e/ou confirmação das espécies, foi utilizada literatura especializada, tais como: Ryvarden e Johansen (1980), Miller e Miller (1988), Sunhede (1989), Calonge (1998), Sarasini (2005) e Sousa *et al.* (2014). O material testemunho foi depositado no Herbário HSTM da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA).

## Resultados e Discussão

Foram identificadas 72 espécies, 47 gêneros e 21 famílias das ordens Agaricales (Agaricaceae, Clavariaceae, Entomomataceae, Marasmiaceae, Omphalotaceae, Pleurotaceae, Psathyrellaceae, Tricholomataceae, Pterulaceae, Schizophyllaceae), Geastrales (Geastraceae), Auriculariales (Auriculariaceae), Dacrymycetales (Dacrymycetaceae), Hymenochaetales (Hymenochaetaceae, Rickenellaceae), Phallales (Phallaceae), Polyporales (Ganodermataceae, Grammotheleaceae, Meripilaceae, Phanerochaetaceae, Polyporaceae). A Tabela 1 consta a lista das espécies de macrofungos registradas na Floresta Nacional do Tapajós.

Todas as espécies representam o primeiro registro para a FLONA Tapajós. Agaricales foi a ordem de maior diversidade com 28 espécies e *Polyporaceae* a família com maior representatividade com 12 gêneros e 20 espécies. *Geastrum* foi o gênero com o maior número de espécies (7), seguido por *Marasmius* e *Polyporus* (5).

A maior riqueza de *Polyporaceae* registrada era o esperado por ser a família mais diversas de fungos (Ryvarden 2004), assim como a ordem Agaricales que abriga em torno de 4.000 espécies mundialmente, e na Amazônia são registradas 133 espécies (Flora do Brasil 2018), dados que enfatizam a importância de realizar mais excursões micológicas para ampliar o conhecimento da diversidade de fungos na região.

A riqueza observada para a FLONA do Tapajós é uma das maiores registradas em floresta ombrófila densa na Amazônia. Para a FLONA de Caxiuanã, também localizada no estado do Pará, 87 espécies foram registradas em 2009 (Sotão *et al.*, 2009), sendo que em 2013, Gibertoni *et al.*, (2013) registrou 96 e Medeiros *et al.*, (2013) encontraram 76 espécies e em 2014, 97 espécies foram amostradas para a FLONA do Amapá (Soares *et al.*, 2014).

**Tabela 1.** Diversidade de macrofungos (Basidiomycota) da Floresta Nacional do Tapajós, região oeste do Pará.

Ordem	Família	Espécie
Agaricales Underw.	Agaricaceae Chevall	<i>Calvatia cf. cyathiformis</i> (Bosc) Morgan
		<i>Chlorophyllum cf. molybdites</i> (G. Mey.) Massee
		<i>Cyathus</i> sp.
		<i>Leucocoprinus cf. brunneoluteus</i> Capelari & Gimenes
		<i>Lycoperdon</i> sp. 1
		<i>Lycoperdon</i> sp. 2
		<i>Macrolepiota</i> sp.
		<i>Morganella</i> sp. 1
		<i>Morganella</i> sp. 2
		Clavariaceae Chevall.
	<i>Clavulinopsis aurantiocinnabarina</i> (Schwein.) Corner	
	Entolomataceae Kotl. & Pouzar	<i>Entoloma cf. panniculus</i>
	Marasmiaceae Roze ex Kühner	<i>Marasmius cf. griseoradiatus</i> Desjardin & Ovrebo
		<i>M. haematocephalus</i> (Mont.) Fr.,
		<i>M. cf. helvoloides</i> Singer
		<i>M. cf. rhabarbarinus</i> Berk
		<i>M. rotuloides</i> Dennis
		<i>Trogia cantharelloides</i> (Mont.) Pat.
	Omphalotaceae Bresinsky	<i>Gymnopus montagnei</i> (Berk.) Redhead
	Pleurotaceae Kühner	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.
	Psathyrellaceae Vilgalys	<i>Coprinellus disseminatus</i> (Pers.) J.E. Lange
		<i>Oudemansiella</i> sp.
	Tricholomataceae R. Heim ex Pouzar	<i>Hygrocybe</i> sp.
	Pterulaceae Corner	<i>Deflexula sprucei</i> (Mont.) Maas Geest.
		<i>Deflexula subsimplex</i> (Henn.) Corner
		<i>Pterula brunneosetosa</i> Corner
		<i>Pterula stipata</i> Corner
Schizophyllaceae	<i>Schizophyllum commune</i> Fr.	
Geastrales K. Hosaka & Castellano	Geastraceae Corda	<i>Geastrum entomophilum</i> Fazolino, Calonge & Baseia,
		<i>Geastrum lloydianum</i> Rick
		<i>Geastrum schweinitzii</i> (Berk. & M.A. Curtis) Zeller
		<i>Geastrum subiculosum</i> Lloyd
		<i>Geastrum triplex</i> Jungh.
		<i>Geastrum</i> sp. 1
		<i>Geastrum</i> sp. 2
Auriculariales J. Schröt.	Auriculariaceae Fr. ex Lindau	<i>Auricularia delicata</i> (Mont.) Henn.
Dacrymycetales Lindau	Dacrymycetaceae Bref.	<i>Dacryopinax spathularia</i> (Schwein.) G.W. Martin
Hymenochaetales Oberw.	Hymenochaetaceae Imazeki & Toki	<i>Coltricia</i> sp.
	Rickenellaceae Vizzini	<i>Cotylidia aurantiaca</i> (Pat.) A.L. Welden
Phallales E. Fisch.	Phallaceae Corda	<i>Clathrus</i> sp.
		<i>Mutinus caninus</i> (Huds.) Fr.
		<i>Phallus indusiatus</i> Vent.
		<i>Xylophallus xylogenus</i> (Mont.) E. Fisch.

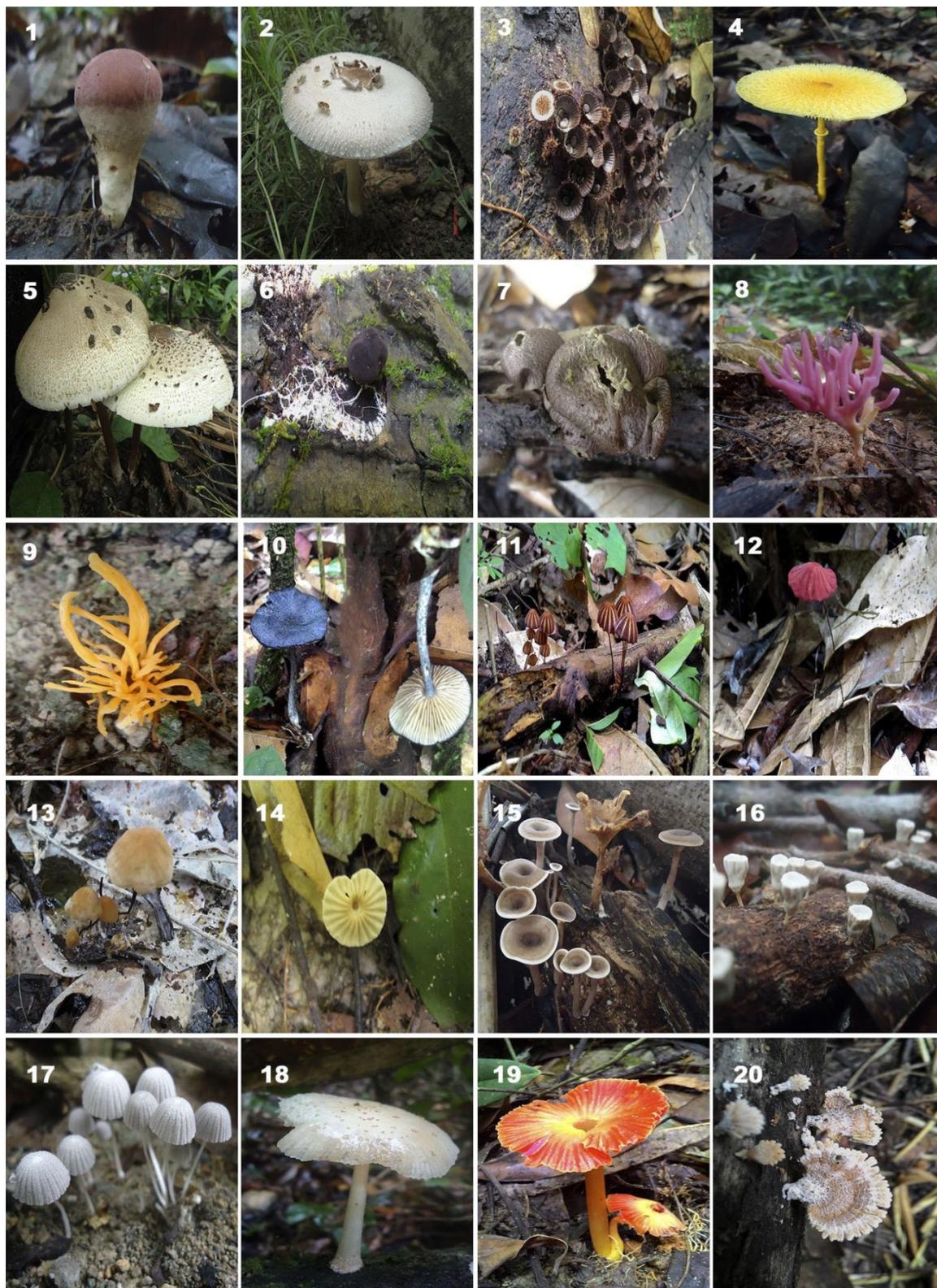
Tabela 1. Continuação

Ordem	Família	Espécie
Polyporales Gäum.	Ganodermataceae (Donk) Donk	<i>Amauroderma sprucei</i> (Pat.) Torrend
		<i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.
		<i>Ganoderma stipitatum</i> (Murrill) Murrill
		<i>Ganoderma tornatum</i> (Pers.) Bres.
	Grammotheleaceae Jülich	<i>Porogramme albocincta</i> (Cooke & Masee) TB Gibertoni
	Meripilaceae Jülich	<i>Rigidoporus lineatus</i> (Pers.) Ryvarden
	Phanerochaetaceae Jülich	<i>Antrodiella liebmannii</i> (Fr.) Ryvarden
		<i>Antrodiella versicutis</i> (Berk. & M.A. Curtis) Gilb. & Ryvarden
		<i>Inflatostereum glabrum</i> (Lév.) D.A. Reid
		<i>Datronia caperata</i> (Berk.) Ryvarden
		<i>Earliella scabrosa</i> (Pers.) Gilb. & Ryvarden
		<i>Favolus tenuiculus</i> P. Beauv.
		<i>Hexagonia hydnoides</i> (Sw.) M. Fidalgo
		<i>Hexagonia variegata</i> Berk.
		<i>Lentinus velutinus</i> Fr.
		<i>Lenzites betulina</i> (L.) Fr.
		<i>Lenzites elegans</i> (Spreng.) Pat.
		<i>Megasporoporia cavernulosa</i> (Berk.) Ryvarden
		Polyporaceae Corda
	<i>Nigroporus</i> sp.	
	<i>Polyporus dictyopus</i> Mont.	
	<i>Polyporus grammocephalus</i> Berk	
	<i>Polyporus guianensis</i> Mont.	
	<i>Polyporus leprieurii</i> Mont.	
	<i>Pycnoporus sanguineus</i> (L.) Murrill	
	<i>Trametes elegans</i> (Spreng.) Fr.	
	<i>Trametes modesta</i> (Kunze ex Fr.) Ryvarden	
<i>Trametes versicolor</i> (L.) Lloyd		
<i>Trametes occidentalis</i> (Klotzsch) Fr.		

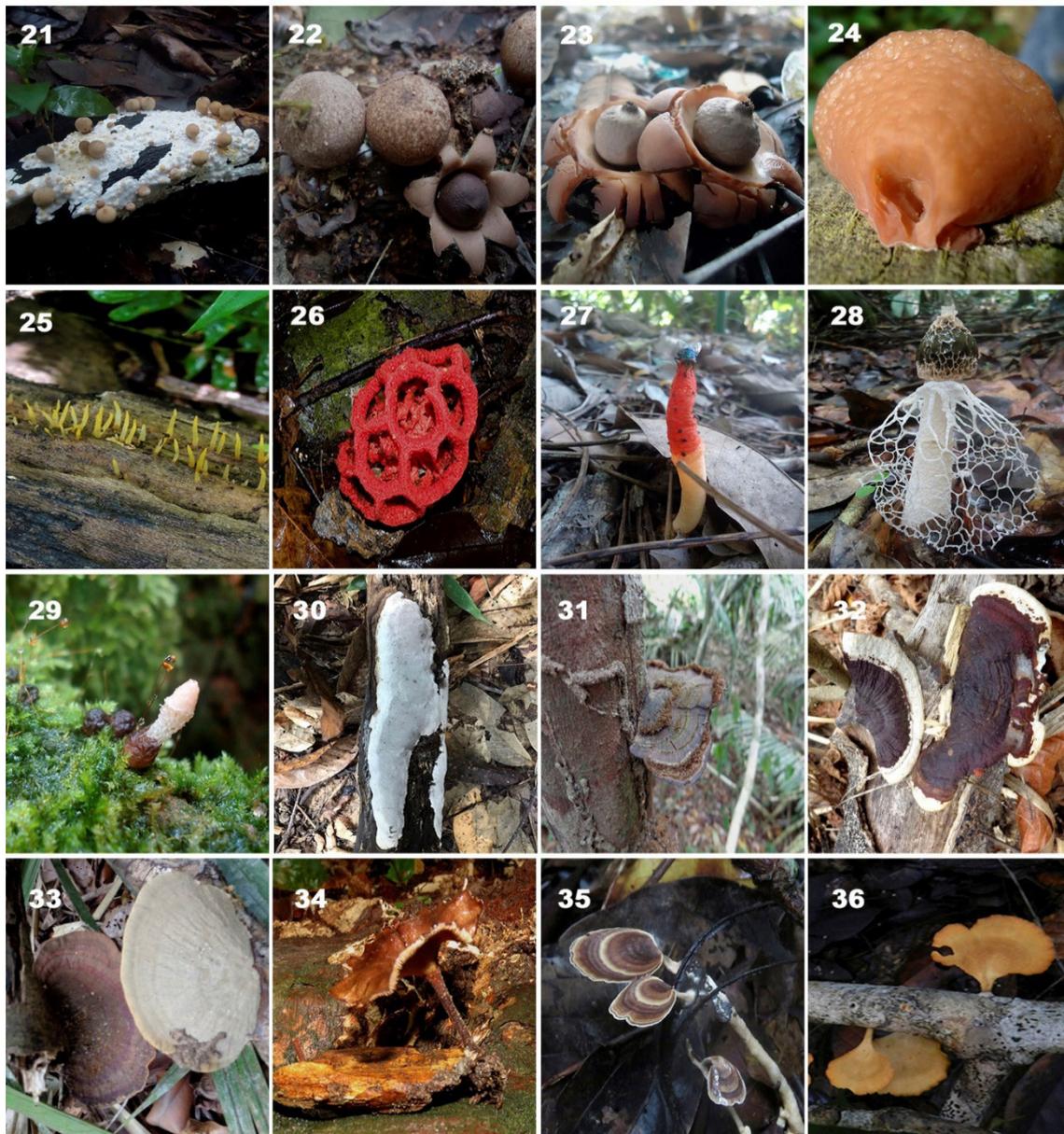
A carência de estudos sobre a diversidade de fungos, somada com a rápida degradação das formações vegetais na Amazônia (Dahlberg e Mueller, 2011), sinalizam a necessidade de estudos intensivos e mais específicos, tendo como objetivo incrementar o conhecimento sobre sua biodiversidade, como subsídio ao manejo, conservação e uso de fungos em processos biotecnológicos (Melo e Azevedo, 2008; Santana *et al.*, 2016). Além disso, a deposição dos espécimes coletados em herbário é imprescindível para permitir o entendimento da biodiversidade e seus padrões de distribuições, relações entre espécies e evolução (Agerer *et al.*, 2000).

## Conclusão

A Floresta Nacional do Tapajós é um reservatório de alta diversidade fúngica, que deve ser intensamente estudada. Soma-se a este o fato a necessidade de estudos ecológicos para o entendimento de padrões de distribuição das espécies e relações ecológicas.



**Figuras 1-20.** Macrofungos da Floresta Nacional do Tapajós. 1) *Calvatia* cf. *cyathiformis*; 2) *Chlorophyllum* cf. *molybdites*; 3) *Cyathus* sp.; 4) *Leucocoprinus* cf. *brunneoluteus*; 5) *Macrolepiota* sp.; 6) *Morganella* sp. 1; 7) *Morganella* sp. 2; 8) *Clavaria zollingeri*; 9) *Clavulinopsis aurantio cinnabarina*; 10) *Entoloma panniculus*; 11) *Marasmius* cf. *griseoradiatus*; 12) *M. haematocephalus*; 13) *M. cf. rhabarbarinus*; 14) *M. rotuloides*; 15) *Trogia cantharelloides*; 16) *Gymnopus montagnei*; 17) *Coprinellus disseminates*; 18) *Oudemansiella* sp.; 19) *Hygrocybe* sp.; 20) *Schizophyllum commune*.



**Figuras 21-36.** Macrofungos da Floresta Nacional do Tapajós. **21)** *G. schweinitzii*; **22)** *G. subiculosum*; **23)** *G. triplex*; **24)** *Auricularia delicata*; **25)** *Dacryopinax spathularia*; **26)** *Clathrus* sp.; **27)** *Mutinus caninus*; **28)** *Phallus indusiatus*; **29)** *Xylophallus xylogenus*; **30)** *Porogramme albocincta*; **31)** *Datronia caperata*; **32)** *Earliella scabrosa*; **33)** *Hexagonia variegata*; **34)** *Lentinus velutinus*; **35)** *Microporellus obovatus*; **36)** *Polyporus grammacephalus*.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Herbário HSTM da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), Santarém, Brasil.

## Referências

- Agerer R, Ammirati J, Blanz P, Courtecuisse R, Desjardin DE, Gams W, *et al.* 2000. Open letter to the scientific community of mycologists. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique*, 78: 981-983.
- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M 1996. *Introductory mycology*. New York: John Wiley & Sons, Inc. 865 p.
- Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Moraes G, Leonardo J, Sparovek G 2013. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, 22: 711-728.

- Blackwell M 2011. The fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98: 426-438.
- Calonge FD 1998. *Gasteromycetes. I. Lycoperdales, Nidulariales, Phallales, Sclerodermatales, Tulostomatales. Flora Mycologica Iberica*. Madrid: CSIC - J. Cramer.
- Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil 2010. Volume 1 [organização Rafaela Campostrini Forzza...*et al.*]. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2 v.
- Dahlberg A, Mueller GM 2011. Applying IUCN red-listing criteria for assessing and reporting on the conservation status of fungal species. *Fungal ecology*, 4: 147-162.
- Evert RF, Eichhorn SE 2013. *Raven Biology of Plants*. 8th. ed. Worth Publishers, New York, 2013, 880 p.
- Ferreira AVB. 2005. Fungos - Os primórdios do sexo. *Ciência Hoje*, 37: 34-41.
- Fidalgo O, Bononi VLR 1989. *Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico*. Secretaria do Meio Ambiente. (Série Documentos) São Paulo. 62p.
- Gibertoni, TB, Ryvardeen L, Bernicchia A, Savino E 2013. *Poroid fungi (Agaricomycetes, Basidiomycota) in the National Caxiuanã Forest*. In Caxiuanã: Paraíso Ainda Preservado. Org. Pedro Luiz Braga Lisboa. Belém, Ed. Museu Paraense Emílio Goeldi. 397-409.
- Hawksworth DL, Lücking R 2017. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiology spectrum*, 5: 1-17.
- Hawksworth DL 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, 95: 641-655.
- Hawksworth DL 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105:1422-1432.
- Kendrick B 2001. *The Fifth Kingdom*. 3 ed. Newburyport, MA: Focus Publishing, 369p.
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers J 2008. Dictionary of the Fungi. 10th. ed. CAB International. Wallingford. 771, Kowalchuk GA, Hol WHG, Van-Veen JA. 2006. Rhizosphere fungal communities are influenced by Senecio jacobaea pyrrolizidine alkaloid content and composition. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 2852-2859.
- Lewinsohn TM, Prado PI 2005. Quantas espécies há no Brasil? *Megadiversidade*, 1:36-42.
- Lodge DJ, Ammirati JF, O'Dell TE, Mueller GM 2004. *Collecting and describing macrofungi*. In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS 2004. *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press, Oxford, UK. 777 p.
- Medeiros PS, Sotão HMP, Gibertoni TB, Cattanio JH 2013. Fungos poróides (Agaricomycetes) no sítio do Programa de Biodiversidade da Amazônia (PPBio) em Caxiuanã. In *Caxiuanã: Paraíso Ainda Preservado*. Org. Pedro Luiz Lisboa. Belém, Ed. Museu Paraense Emílio Goeldi. 375-385.
- Melo IS, Azevedo JL 2008. *Microbiologia ambiental*. 2.ed. rev. ampl. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p.647.
- Miller SL, Miller Jr OK 1988. Spore release in hypogeous, gasteroid and agaricoid Russulales. *Transactions of the British Mycological Society*, 90: 513-526.
- Mueller GM, Schmit JP 2007. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodiversity and Conservation*, 16: 1-5.
- Ryvardeen L, Johansen I 1980. *A preliminary Polypore Flora of East Africa*. Fungiflora, Oslo, 636 p.
- Ryvardeen L 2004. Neotropical Polypores Part 1. Introduction, Ganodermataceae & Hymenochaetaceae. *Synopsis Fungorum*, 19: 229 p.
- Santana MDF, Rodrigues LDSI, Amaral TS, Pinheiro YG 2017. Fenoloxidase e biodegradação do corante têxtil Azul Brilhante de Remazol R (RBBR) para três espécies de macrofungos coletadas na Amazônia. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, 11: 53-60.
- Sarasini M 2005. *Gasteromiceti epigei*. Trento: Associazione Micologica Bresadola.
- Soares AMS, Sotão HMP, Medeiros PS, Gibertoni TB 2014. Riqueza de fungos poliporóides (Agaricomycetes, Basidiomycota) em uma floresta ombrófila densa no Amapá, Amazônia brasileira. *Bol. Mus. Biol. Mello Leitão*, 35: 5-18.
- Sotão HMP, Gibertoni TB, Maziero R, Baseia I, Medeiros PS, Martins Júnior A, Capelari M 2009. *Fungos macroscópicos da Floresta nacional de Caxiuanã, Pará, Brasil: Basidiomycota (Agaricomycetes)*. In: Lisboa P. L. B. (Ed). Caxiuanã: Desafios para conservação de uma Floresta Nacional na Amazônia. Museu Paraense Emílio Goeldi. 383-396.

- Sousa JO, Moraes LA, Nascimento YM, Baseia IG 2014. Updates on the geographic distribution of three *Geastrum* species from Brazilian semi-arid region. *Mycosphere*, 5: 467-474.
- Sunhede S 1989. Geastraceae: (Basidiomycotina): Morphology, Ecology, and Systematics with Special Emphasis on the Northern European Species.
- Teixeira AR 1995. *Método para o estudo das hifas do carpóforo de fungos polyporaceae*. Instituto de Botânica, São Paulo, 20 p.
- Veloso HP, Rangel Filho ALR, Lima JCA 1991. *Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal*. IBGE, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 123 p.
- Webster J, Weber RWS 2007. *Introduction to Fungi*. 3th. ed. Cambridge; New York: Cambridge University, 841 p.

## Caracterização morfológica e avaliação da tolerância à acidez de rizóbios oriundos de solo ácidos

Francisco Adilson dos Santos Hara<sup>1\*</sup>, Djalma Jacaúna Neves Pereira Junior<sup>2</sup>,  
Kamila Burlamaqui Alves<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Engenharia Agrícola e Solo/Faculdade de Ciências Agrárias - FCA/Universidade Federal do Amazonas - UFAM

<sup>2</sup> Acadêmicos do curso de Agronomia, FCA/UFAM

\*E-mail: fhara@ufam.edu.br

### Resumo

O papel dos rizóbios no ciclo do nitrogênio nos ecossistemas agrícolas tem sido de vital importância. A seleção de isolados de rizóbios capazes de sobreviverem em condições ácidas é fundamental para o sucesso da fixação biológica do nitrogênio na região amazônica. O trabalho teve como objetivo caracterizar rizóbios com potencial para serem usados como inoculantes em leguminosas nos solos ácidos da Amazônia. Foi realizada a caracterização morfológica dos isolados e a avaliação da capacidade dos mesmos em crescer em duas situações de pH (4,5 e 6,5). No teste de pH os isolados foram classificados de acordo com o tempo de início de crescimento e com o grau de tolerância à acidez. Os isolados apresentaram variações nas características culturais. Todos os isolados apresentaram crescimento máximo no terceiro dia em pH 6,5. Em pH 4,5 o isolado FCAN02c apresentou tolerância média, enquanto que os isolados FCAN01a, FCAN01b, FCAN01c, FCAN02a, FCAN02b apresentaram alta tolerância e crescimento máximo no terceiro dia de avaliação. A estratégia de sobrevivência dos isolados em condições ácidas apresentada neste trabalho foi a produção de exopolissacarídeos.

**Palavras-chave:** fixação simbiótica do nitrogênio, bactérias diazotróficas e tolerância à acidez

### Introdução

Cerca de 90% dos solos amazônicos são deficientes em nitrogênio e fósforo (Nicholaides *et al.*, 1983), dois elementos essenciais para a planta e de difícil aplicação como fertilizantes pelos agricultores regionais, devido ao alto custo e dificuldades de transporte. No entanto, alguns microrganismos do solo, que se associam às raízes das plantas, podem torná-las menos dependentes de adubos químicos permitindo, assim, uma economia desses insumos e uma maior produtividade dos solos. Dentre esses microrganismos estão as bactérias nodulíferas dos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium* (genericamente designados por rizóbia), que fixam o nitrogênio atmosférico tornando-o disponível para as plantas e para o ecossistema (Jaramillo *et al.*, 2013).

A fixação biológica do nitrogênio atmosférico é importante na substituição da adubação nitrogenada (Ogega *et al.*, 2018), principalmente na Amazônia (Hara e Oliveira, 2005). Esse grupo de microrganismos proporcionam benefícios econômicos com a redução nos custos de produção, e melhoria da qualidade ambiental, com menor aporte de nitratos para as águas superficiais e subterrâneas (Oliveira *et al.*, 2012).

Além de fixarem o nitrogênio atmosférico na associação com leguminosas, podem estimular o crescimento de culturas não leguminosas como o arroz (Osorio Filho *et al.*, 2014), o milho, o trigo e a canola (Hahn *et al.*, 2014), devido à produção de substâncias hormonais (Sahasrabudhe, 2011), protegem as plantas contra patógenos (Mishra *et al.*, 2006), contribuem de forma indireta na nutrição de plantas através da solubilização de fosfatos insolúveis (Hara e Oliveira, 2005).

Em condições de terra firme da Amazônia sob floresta ou em áreas não cultivadas com leguminosas, há uma baixa população de rizóbia (Bonetti *et al.*, 1984). O baixo número de rizóbia nos solos regionais com pHs ácidos (Bonetti *et al.*, 1986) pode ser devido à sua baixa capacidade de sobrevivência em ambiente ácido. Isolados de rizóbios com a capacidade de superar tais condições, precisam ser selecionadas para uso em inoculantes (Wani *et al.*, 1995), principalmente aqueles isolados de solos onde o fator estressante predominou (Rossum *et al.*, 1994).

A maior parte dos inoculantes produzidos no Brasil é importada para a cultura da soja (cerca de 99%). Portanto, há a necessidade de se selecionar isolados de rizóbios para leguminosas utilizadas em sistemas de baixos insumos como os característicos da Amazônia, e o primeiro passo desse processo é a caracterização morfológica e fisiológica dos isolados.

A avaliação das características das culturas pode indicar as diferenças morfológicas e fisiológicas importantes entre os isolados de rizóbios (Chagas Jr. *et al.*, 2010). Essas características permitem a identificação de isolados com métodos relativamente rápidos e acessíveis em laboratórios com infraestrutura básica e poucos recursos financeiros, facilitando assim, a seleção inicial de isolados de rizóbios com características desejáveis para os ecossistemas amazônicos, como a tolerância à acidez. O objetivo desse trabalho foi caracterizar isolados de rizóbios quanto a morfologia e tolerância a acidez.

## Material e Métodos

Para a coleta de nódulos foi utilizada a metodologia proposta por Hungria e Araújo (1994). Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de princípios biotivos de origem microbiana (LPBOM/DCFDA/FCA) da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Os nódulos utilizados para isolamento dos rizóbios foram oriundos de sistema radicular de duas plantas de Puerária (*Pueraria phaseoloides*), sendo cada planta oriunda de local distinto. No momento da coleta, foram coletadas amostras de solos rizósfericos para a medição do pH do solo (EMBRAPA, 1999). Foram obtidos três isolados de rizóbios de cada planta, totalizando assim, seis isolados para a avaliação, os quais foram devidamente codificados. Os isolados FCAN01a, FCAN01b e FCAN01c foram coletados de nódulos diferentes de uma planta de puerária oriunda de solo com pH 4,1. Os isolados FCAN02a, FCAN02b e FCAN02c são oriundos de outra planta estabelecida em solo com pH 4,2.

O isolamento dos rizóbios foi realizado conforme Hungria e Araújo (1994) com as etapas de quebra da tensão superficial em álcool (95%), esterilização em solução de hipoclorito de sódio (3%) e lavagem em água destilada estéril. Os nódulos foram esmagados bastão de vidro em frascos esterilizados. Os materiais resultantes do esmagamento dos nódulos foram riscados em meio YMA (Yeast-Manitol-Agar) (pH 6,5) descrito por Hungria e Araújo (1994). Foi adicionado o corante vermelho congo (solução 0,25g/100 mL) na proporção de 10 mL por litro de meio de cultura para identificar os possíveis contaminantes. Após a obtenção das colônias puras, os isolados foram incubados a 28°C.

Após 48 horas de incubação foi realizada a repicagem para meio YMA (pH 6,5) contendo o corante azul de bromotimol na proporção de 5 ml por litro do meio de cultura para análise de alteração do pH. Após 24h foram analisadas as características culturais das colônias de acordo com a metodologia proposta por Hungria e Araújo (1994).

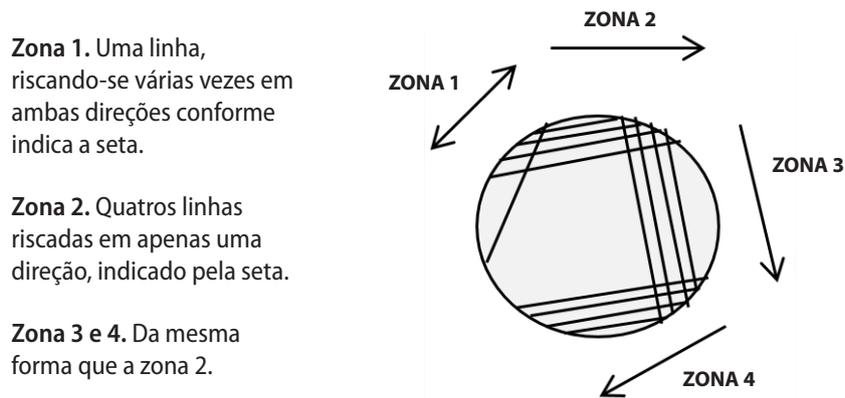
Os isolados também foram repicados para meio YMA com meio pH 4,5 para análise da tolerância à acidez de acordo com a metodologia de Oliveira e Magalhães (1999). Foram usadas triplicatas para cada isolado, sendo uma repetição por placa de Petri. Foi acrescentado o corante indicador bromocresol verde para detectar a alteração do pH do meio.

As avaliações foram realizadas a cada três dias, durante um período de 15 dias. Foram adotados valores de crescimento para cada isolado variando de 1 a 4, ocorrendo valores intermediários entre esses extremos (Figura 1 e 2). Este método permitiu ainda, selecionar isolados de acordo com o grau de tolerância (sensível, mediano e tolerante) (Tabela 1). Foi observada também, a produção de exopolissacarídeos na condição de acidez.

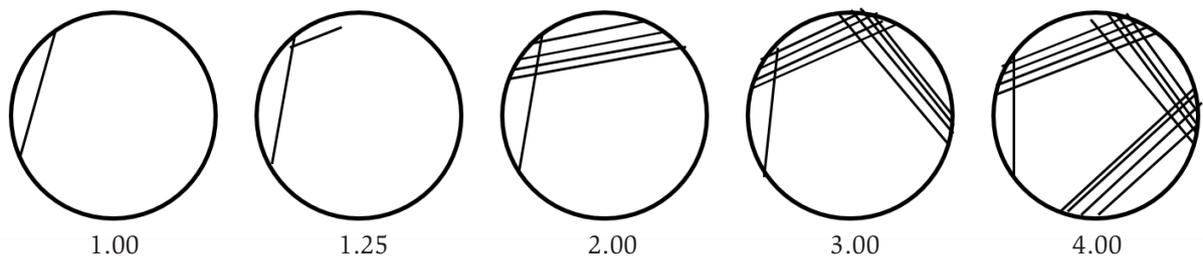
**Tabela 1.** Escala de valores para a avaliação do crescimento de rizóbio nos meios YMA (pH 6,5; pH 4,5) (Oliveira e Magalhães, 1999).

Grav de tolerância	Intervalos de pontuação
Sensível	1,00 - 2,00
Mediano	2,06* - 3,00
Tolerante	3,06** - 4,00

Obs.: \* Três repetições com nota 2,0 e uma com 2,25 - \*\* Três repetições com nota 3,0 e uma com 3,25.



**Figura 1.** Ilustração do método de riscagem proposto por Oliveira e Magalhães (1999). A figura demonstra apenas uma repetição.



**Figura 2.** Valores de crescimento para os isolados de rizóbio nos respectivos tratamentos em placas de Petri com meio YMA (Oliveira e Magalhães, 1999).

## Resultados e Discussão

Algumas diferenças foram detectadas entre as características culturais dos isolados de rizóbios, inclusive entre aqueles obtidos de nódulos da mesma planta. Todos os isolados apresentaram crescimento após 48 incubação, caracterizando-os como rizóbios de crescimento rápido. Em relação ao pH (6,5) apenas o isolado FCAN01a não foi capaz de promover alteração, enquanto os demais isolados acidificaram o meio, cujo fenômeno foi detectado a partir da alteração da cor do meio de cultura de verde azulado para amarelo. Todos os isolados apresentaram forma da colônia circular, borda inteira e superfície lisa, aparência homogênea e sem elasticidade. Os isolados FCAN01a, FCAN01b apresentaram colônias de coloração branca enquanto que as demais apresentaram colônias sem cor definida. Todos os isolados apresentaram produção de exopolissacarídeo com exceção do isolado FCAN01a.

Em relação ao teste de pH, todos os isolados apresentaram crescimento máximo em pH 6,5 no terceiro dia de avaliação (Tabela 2) e foram capazes de acidificar o meio e produzir exopolissacarídeo com exceção do isolado FCAN01a, o mesmo foi observado na caracterização morfológica em pH 6,5.

De acordo com a tabela 2, apenas o isolado FCAN02c apresentou tolerância média à acidez, enquanto que os demais se comportaram como isolados de tolerância alta a este fator estressante presente na maioria dos solos de terra firme do estado do Amazonas. Foi observado que todos os isolados em pH 4,5, com exceção do isolado FCAN02c alteraram a cor do meio para amarelo, indicando diminuição do pH e produziram exopolissacarídeos. Ao analisar a tabela 2, foi identificado que os isolados com tolerância alta à acidez FCAN01b, FCAN01c, FCAN02a e FCAN02b apresentaram crescimento máximo já no terceiro dia, enquanto que para o isolado FCAN01 foi observado a partir do 60 dia de avaliação. O crescimento do único isolado de tolerância média, FCAN02c, se estabilizou a partir do 60 dia de avaliação (Tabela 2).

**Tabela 2.** Crescimento em meio de cultivo com pH 6,5 e pH 4,5 (Oliveira e Magalhães, 1999) de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos.

Isolados	Dia de avaliação									
	3°		6°		9°		12°		15°	
	pH									
	4,5	6,5	4,5	6,5	4,5	6,5	4,5	6,5	4,5	6,5
FCAN01a	2,80	4,00	3,42	4,00	3,50	4,00	3,50	4,00	3,50	4,00
FCAN01b	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
FCAN01c	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
FCAN02a	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
FCAN02b	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
FCAN02c	2,00	4,00	3,00	4,00	3,00	4,00	3,00	4,00	3,00	4,00

As diferenças culturais e na capacidade de tolerar a acidez entre isolados provenientes de nódulos diferentes da mesma planta indica uma possível diferença genética entre os mesmos. No entanto, estudos mais aprofundados necessitam ser desenvolvidos no sentido de corroborar tal hipótese.

A tolerância á acidez apresentada pelos isolados FCAN01a, FCAN01b, FCAN01c, FCAN02a e FCAN02b pode estar relacionada a capacidade desses isolados em produzirem exopolissacarídeos conforme observado em meio de cultura na caracterização morfológica (pH 6,8) e nos testes de pH (4,5 e 6,50). Resultados semelhantes foram observados por Barbieri et al. (2004) e Miguel e Moreira (2001). Além do mais, os exopolissacarídeos podem também neutralizar o efeito do alumínio trocável (Hara e Oliveira, 2005), que é abundante nos solos da Amazônia e é tóxico aos rizóbios nativos.

A acidificação do meio de cultura nas duas situações de pH (4,5 e 6,5) pode ser o indicativo de que esses isolados estejam muito bem adaptados ao hábitat onde essas condições predominam. Essa acidificação é decorrente da liberação de ácidos orgânicos decorrentes do metabolismo microbiano (Mahdi et al., 2011), e pode ser considerado como uma estratégia de sobrevivência. Em condições de solo, essa acidificação pode auxiliar também na solubilização de fosfatos inorgânicos e aumentar a disponibilidade do fósforo para as plantas (Saber et al., 2012).

Além da capacidade de tolerar o pH, o início do crescimento dos isolados é fundamental. O rápido crescimento apresentado pelos isolados é uma característica desejada quando se pretende obter material genético com potencial para ser utilizado como inoculante, e auxiliar no processo de fixação biológica do nitrogênio. Isolados de crescimento rápido podem se estabelecer muito bem na simbiose em condições de campo superando a competição com outros organismos do solo como os fungos, actinomicetos e rizóbios nativos, e ainda superar fatores abióticos como acidez e altas temperaturas do solo (Silva et al., 2002). Esse crescimento rápido é característico dos gêneros *Rhizobium* e *Sinorhizobium*. A literatura tem relatado uma estreita relação da Puerária com o gênero *Bradyrhizobium*, considerado um gênero de crescimento lento. No entanto, estudos indicam a possível simbiose da puerária com outros gêneros de rizóbios (Sarr et al., 2016). O tempo de crescimento pode também ser usado para a seleção, tendo em vista que os isolados que na presença da acidez apresentaram maiores escores de crescimento em menor período de tempo podem ser considerados como mais tolerantes a esse fator estressante do meio.

## Conclusões

Isolados coletados de nódulos diferentes da mesma planta apresentaram variações nas características morfológicas e fisiológicas

Os isolados de rizóbios, FCAN01a, FCAN01b, FCAN01c, FCAN02a e FCAN02b foram os mais tolerantes à acidez do meio de cultivo.

Todos os isolados tolerantes à acidez foram capazes de acidificar o meio e produziram expressiva quantidade de muco em meio de cultura.

## Referências

- Barberi A, Moreira FMS, Florentino LA, Rodrigues MID 2004. Crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe BR 29 em meios de cultivo com diferentes valores de pH inicial. *Ciência e Agrotecnologia*, 28(2):397-405.
- Bonetti R, Oliveira LA, Magalhães FMM 1984. *Rhizobium spp.* populations, and mycorrhizal associations in some plantations of forest tree species. *Pesq. Agrop. Bras.*, 19(1):137-142.
- Chagas Jr. AF, Oliveira LA, Oliveira AN 2010. Caracterização fenotípica de rizóbio nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. *Acta Scientiarum Agronomy*, 32(1):161-169.
- EMBRAPA 1999. *Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes*. Brasília, EMBRAPA/solos. 370 p.
- Hahn L, Sa EL, Machado RG, Silva WR, Oldra S, Damasceno RG, Schönhofen A 2014. Growth promotion in maize with diazotrophic bacteria in succession with ryegrass and white clover. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 14(1):11-16.
- Hara FAS, Oliveira LA 2005. Características fisiológicas e eco-lógicas de isolados de rizóbio de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. *Pesq. Agrop. Bras.*, 40(1):667-672.
- Hungria M, Araújo RS 1994. *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. EMBRAPA, Brasília. 542p.
- Jaramillo PMD, Guimarães AA, Florentino LA, Silva KB, Nóbrega RSA, Moreira FMS 2013. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems in the Western Amazon. *Amazon. Sci Agric.*, 70(1):397-404.
- Khan MS, Zaidi A, Wani PA 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture: a review. *Agron. Sustain. Dev.*, 27(1): 29-43.
- Mahdi SS, Hassan GI, Hussain A, Rasool F 2011. Phosphorus availability issue- its fixation and role of phosphate solubilizing bacteria in phosphate solubilization. *Research Journal of Agricultural Sciences*, 2(1): 174-179.
- Miguel DL, Moreira FMS 2001. Influência do pH do meio de cultivo e da turfa no comportamento de estirpes de *Bradyrhizobium*. *R. Bras. Ci. Solo*, 25(4): 873-883.
- Mishra RP, Singgh RK, Kumar V, Maurya S 2006. Rhizobium-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). *Current Microbiology*, 52(5): 383-389
- Nicholaides JJI, Sanchez PA, Bandy DE, Villachica JH, Coutu AJ, Valverde CS. 1983. Crop production systems in the Amazon Basin. In: E. Moran (ed.) *The Dilemma of Amazonian Development*. Westview, p. 101-153.
- Ogega JK, Were BA, Nekesa AO Okalebo Jr 2018. Evaluating the effectiveness of different rhizobia strains and their effect on crop yields in acid soils of western Kenya. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 6(2):195 - 198.
- Oliveira LA, Magalhães HP 1999. Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. *Revista de Microbiologia*, 30(1):203-208.
- Osório Filho BD, Gano KA, Binz A, Lima RF, Aguilar LM, Ramirez A, Caballero-Mellado J, Sá ELS, Giongo A 2014 Rhizobia enhance growth in rice plants under flooding conditions. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 14(8):707-718.
- Rossum DV, Muyotcha A, Hoop BM de, Verseveld HWV, Stouthomer AH, Boogerd FC 1994. Soil acidity in relation to groundnut-*Bradyrhizobium* symbiotic performance. *Plant and Soil*, 163(1):165-175.
- Saber WIA, Ghanem KM, El-Hersh MS 2009. Rock phosphate solubilization by two isolates of *Aspergillus niger* and *Penicillium sp.* and their promotion to mung bean plants. *Res. J. Microbiol.*, 4(1):235-250.
- Sahasrabudhe MM. 2011. Screening of rhizobia for Indole acetic acid production. *Annals of Biological Research*, 2(4): 460-468.
- Sarr PS, Araki S, Begoude DA, Yemefack M, Manga GA, Yamakawa T, Less AHS 2016. Phylogeny and nitrogen fixation potential of *Bradyrhizobium* species isolated from the legume cover crop *Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth. in Eastern Cameroon. *Soil Science and Plant Nutrition*, 62(1):13-19.
- Silva AFS, Freitas ADS, Stamford NP 2002. Efeito da inoculação da soja (cv. Tropical) com rizóbios de crescimento rápido e lento em solo ácido submetido à calagem. *Acta Scientiarum*, 24(5):1327-1333.
- Wani SP, Rupela OP, Lee KK 1995. Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen fixation in grain legumes. *Plant and Soil*, 147(1):19-49.

## Isolamento de fungos filamentosos endofíticos de *Panicum maximum* cv. Mombaça (capim-mombaça)

Kelven Wladie dos Santos Almeida Coelho<sup>1</sup>, Pedro Queiroz Costa Neto<sup>1,2</sup>, José Odair Pereira<sup>2</sup>, Érica Inês Almeida de Souza<sup>3</sup>, Meyb Cristny dos Santos Seixas<sup>1</sup>, Expedita Maria de Oliveira Pereira<sup>1,2</sup>, Luciana Souza de Aguiar Souza<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>PPGCAN/UFAM, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Amazonas

<sup>2</sup>FCA/UFAM, Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas

<sup>3</sup>PPGAT/UFAM, Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas.

Emails: kelvenwladie@gmail.com, senaneto16@yahoo.com.br

### Resumo

O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar fungos filamentosos endofíticos de folhas de capim mombaça de duas fazendas localizadas no município de Iranduba/AM. Amostras foram coletadas em quatro áreas de pastagem pelo método do quadrado. Dez folhas de cada fazenda foram coletadas em sacos de papel e transportadas para o Laboratório de Princípios Bioativos de Origem Microbiana/LPBOM da FCA/UFAM. As folhas foram desinfestadas superficialmente e inoculadas em placas de Petri com meio BDA e cloranfenicol para inibir o crescimento de bactérias. As placas foram incubadas a 18 °C em BOD e observadas diariamente até o crescimento micelial de endófitos. Após o crescimento do fungo, inóculos foram transferidos para tubos contendo o mesmo meio de isolamento, inclinado. A identificação foi realizada através da visualização de estruturas reprodutivas coradas com azul de lactofenol sob microscópio de luz. O gênero mais frequente foi *Colletotrichum* apresentando cinco morfotipos, seguido por *Fusarium*, *Xylaria* e *Chaetomium*.

**Palavras-chave:** Bioprospecção, *Colletotrichum*, diversidade.

### Introdução

As gramíneas da espécie *Panicum maximum* estão entre as mais cultivadas no Brasil, principalmente em cadeias de produção de leite a pasto. O cultivar Mombaça foi lançado pela Embrapa em 1993, tendo como principais vantagens de utilização um elevado potencial de produção forrageira, rápido estabelecimento das pastagens, resistência à cigarrinha-das-pastagens e adaptação aos solos de média fertilidade, permitindo elevada produção a pasto desde que receba adubação química, sendo, portanto, boa opção na implementação de pastos de sistemas intensivos (Gomide *et al.*, 2016).

Os microrganismos endofíticos são de modo geral fungos e bactérias que vivem de maneira geral nas folhas e caules das plantas sem causar danos aparentes (Azevedo, 1998).

O estudo que microrganismos endofíticos com gramíneas é de grande importância, pois os fungos ao colonizarem as estruturas plantas, conferem características tais como um maior acúmulo de matéria seca, maior tolerância às variações ambientais (Kleczewski *et al.*, 2012) e produção de alcalóides, protegendo a gramínea do ataque de insetos e consumo por mamíferos (Tanaka *et al.*, 2012).

A microbiota endofítica vem amplamente sendo estudada quanto ao seu potencial biotecnológico, seja ele na agropecuária (Lopes *et al.*, 2017; Assumpção *et al.*, 2009; Mochi, 2009); indústria farmacêutica (Calderani, Orlandelli e Pamphille, 2016; Ferrara, 2006); e biorremediação (Lima *et al.*, 2016; Silva e Rondon, 2013).

São escassos os trabalhos que expõem a comunidade de microrganismos endofíticos associados a gramíneas e pouco se sabe sobre a interferência dos mesmos na palatabilidade, crescimento e qualidade das mesmas. O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar fungos endofíticos filamentosos de folhas de capim mombaça de duas áreas de pastagens localizadas em Iranduba/AM.

## Material e métodos

### *Coleta das amostras*

Foram coletadas 20 folhas de dois piquetes em duas fazendas localizadas em Iranduba/AM. A amostragem foi realizada pelo método do quadrado. O material vegetal coletado foi transportado ao Laboratório de Princípios Bioativos de Origem Microbiana/LPBOM da Faculdade de Ciências Agrárias/FCA/UFAM. As folhas foram lavadas em água corrente, com esponja, para remoção de restos de solo, poeira e dos possíveis microrganismos epifíticos.

### *Desinfestação das folhas*

As folhas foram imersas em álcool 70%, por um minuto, hipoclorito de sódio (2%) durante um minuto, álcool 70% por 30 segundos e em água ultrapura por curto período para remoção do excesso de álcool e hipoclorito (Pereira, Azevedo e Petrini, 1993).

### *Fragmentação e inoculação das amostras em meio de cultura*

Após a desinfestação superficial, as folhas foram secas em papel toalha esterilizado e divididas em três regiões: apical, mediana e basal, depois foram fragmentadas com bisturi em tamanho de 0,5 cm<sup>2</sup>, totalizando 600 fragmentos (200 de cada região) que foram inoculados em 60 placas de Petri contendo o meio de cultura BDA (infusão de 200 g de batata, 10 g de dextrose e 15 g de ágar, q.s.p. 1 litro - pH 6,8 acrescido do antibiótico cloranfenicol 0,05 mg/L para inibir o crescimento de bactérias) e incubadas a 18 °C em estufa com demanda bioquímica de oxigênio (BOD); e observadas diariamente para isolamento após o crescimento micelial. A taxa de colonização para cada :

$$T.C. = \frac{N^{\circ} \text{ de Fragmentos colonizados}}{N^{\circ} \text{ de fragmentos inoculados}} \times 100$$

### *Isolamento e identificação dos fungos endofíticos*

Após o crescimento das colônias, inoculos destas foram repicadas para tubos contendo o meio BDA inclinado. A observação das estruturas microscópicas foi com a coloração azul de lactofenol (Onions *et al.*, 1981) para visualizar as estruturas de reprodução sexual e assexual para identificação dos isolados (Ellis, 1971; Barnett e Hunter, 1972; Arx, 1974). Cada linhagem foi armazenada, em duplicata - a colônia matriz e duas monospóricas, pelo método de Castellani (Araújo *et al.*, 2002) e mantidos em temperatura ambiente.

## Resultados e discussão

Foram analisadas 20 folhas, compreendendo 600 fragmentos, sendo dez por placa de Petri. Em alguns fragmentos não cresceu fungos filamentosos. A taxa de colonização por endófitos foi maior na região basal, apresentando 91,5%, seguida das regiões apical e mediana (Tabela 1).

Foram isolados 241 fungos endofíticos, apenas 92 foram identificados em nível de gênero, listados na (Tabela 2). Dentre os gêneros isolados, *Colletotrichum* spp. foi o mais frequente com 34,85% ocorrendo cinco morfotipos diferentes distribuídos nas três regiões das folhas.

Também foi observado o gênero *Fusarium* sp. com cinco isolados do mesmo morfotipo, sendo quatro da região basal e apenas um da apical. Além destes dois gêneros, foram identificados *Xylaria* sp. com dois isolados da região mediana e um *Chaetomium* sp. isolado da região apical.

Considerando os fungos identificados, a região com maior diversidade foi a apical (Tabela 2). Segundo Souza *et al.* (2004), uma identificação rápida de fungos endofíticos não é fácil pois existe carência de especialistas em identificação taxonômica destes fungos, que dependendo do micro-habitat podem existir espécies desconhecidas.

**Tabela 1.** Taxa de colonização dos fungos endofíticos nas três regiões da folha

Região	Taxa de colonização
Apical	90,5%
Mediana	82,5%
Basal	91,5%

Para cada região das folhas foram inoculados 200 fragmentos

**Tabela 2.** Frequência de fungos endofíticos isolados de folhas de capim mombaça

Taxa	Região			Total	
	Apical	Mediana	Basal	Nº	(%)
<i>Colletotrichum</i> spp.	34	37	13	84	34,85
<i>Fusarium</i> sp.	1	0	4	5	2,07
<i>Xylaria</i> sp.	0	2	0	2	0,83
<i>Chaetomium</i> sp.	1	0	0	1	0,42
Fungo não identificado.	68	59	22	149	61,83
Total	104	98	39	241	100

Nº - Número de indivíduos; (%) - Percentual da frequência observada

Neste trabalho o gênero mais frequente é *Colletotrichum*, que pode ser facilmente isolado de plantas na forma endofítica. Este fungo produz metabólitos de interesse biotecnológico (Gonçalves, Freire e Lima, 2013; Pamphile *et al.*, 2017).

Kleczewski *et al.* (2012) isolaram *Colletotrichum*, *Fusarium* e *Xylaria* como endófitos de *P. virgatum*. Os gêneros *Colletotrichum* e *Fusarium* também foram isolados por Wong e Ride (2001) das gramíneas *Phragmites australis*, *Pennisetum purpureum*, e *Miscanthus floridulus*, porém a metodologia utilizada por eles não pode diferenciar os isolados de endofíticos, epifíticos ou fitopatogênico das gramíneas em questão.

O gênero *Fusarium*, apesar de ter sido isolado das folhas neste trabalho, também pode ser isolado na forma patogênica de sementes de *P. maximum*, dos cultivares Massai, Mombaça e Tanzânia como no estudo realizado por Marchi *et al.* (2010).

Vechiato *et al.* (2010) observaram a ocorrência de *Fusarium* em sementes de *Brachiaria brizantha*, nos cultivares Basilisk, Marandú e Xaraés e em sementes de *P. maximum* nos cultivares Mombaça e Tanzânia. A ocorrência de *Chaetomium* sp. foi apenas no cultivar Basilisk e *Colletotrichum* sp., isolado do cultivar Marandú. Existe a possibilidade de transmissão vertical de endófitos via sementes em gramíneas, pois Hodgson *et al.* (2014) confirmam tal fato em *Centaurea cyanus*, *C. nigra*, *Papaver rhoeas*, *Plantago lanceolata*, *Rumex acetosa* e *Senecio vulgaris*, sugerindo que seja um fenômeno generalizado.

Maia (2015), ao isolar fungos filamentosos endofíticos das gramíneas *P. maximum* e *P. purpureum*, observou que *Sarocladium* sp. foi o mais frequente. Outro trabalho exploratório sobre a comunidade endofítica de gramíneas foi realizado por Gama (2014), que observou grande diversidade de gêneros, com destaque para *Paraconiothyrium* e *Phoma*, isolados de capim brachiária, como os mais frequentes.

A baixa diversidade de fungos endofíticos observados neste trabalho pode ser justificada pelos diversos fatores bióticos e abióticos que podem influenciar na diversidade de fungos e outros microrganismos endofíticos associados à planta em questão (Faeth e Fagan, 2002; Oki *et al.*, 2009).

## Conclusões

Foram isolados fungos endofíticos, sendo apenas quatro gêneros identificados. O gênero mais frequente foi o *Colletotrichum*.

## Referências

- Assumpção LC, Lacava PT, Dias ACF, Azevedo JL, Menten JOM 2009. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes e soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44(5): 503-510.
- Araújo WL, Lima AOS, Azevedo JL, Marcon J, Sobral JK, Lacava PT 2002. *Manual: Isolamento de microrganismos endofíticos*. Departamento de Genética. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo. Piracicaba - São Paulo, 86p.
- Arx JA 1974. *The genera of fungi sporulating in pure culture*. 2ª ed., J. Cramer, Vaduz, 351p.

- Azevedo JL 1998. *Microorganismos endofíticos*. In: Melo I.S., Azevedo J.L. (Ed.), *Ecologia microbiana*. Jaguariúna: Embrapa, p. 117-137.
- Barnett HL, Hunter BB 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3<sup>a</sup> ed., Burgess Publishing Co., Mineapolis, Minnesota, USA, 241p.
- Calderani FA, Orlandelli RC, Pamphile JA 2016. Compostos bioativos com propriedades antitumorais produzidos por fungos endofíticos. *Uningá Review*, 25(2):79-86.
- Ellis BM 1971. Dematiaceous hyphomycetes. Surrey, *Commonwealth Mycological Institute*, Kew, 608p.
- Faeth SH, Fagan WF. 2002. Fungal endophytes: Common host plant symbionts but uncommon mutualists. *Integrative and Comparative Biology*, 42(2): 360-368.
- Ferrara MA 2006. Fungos endofíticos. Potencial para a produção de substâncias bioativas. *Revista Fitos*, 2(1): 73-79.
- Gama DS 2014. *Fungos endofíticos em Brachiaria e Cynodon*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Lavras. Lavras - MG, 90p.
- Gomide CAM, Paciullo DSC, Leite JLB, Resende H 2016. *Panicum maximum* cvs. Tanzânia e Mombaça para uso em pastejo: produção e custo. Embrapa, Juiz de Fora - MG, 7p.
- Gonçalves FJT, Freire FCO, Lima JS 2013. Fungos endofíticos e seu potencial como produtores de compostos bioativos. *Essentia*, 15(1): 71-92.
- Hodgson S, Cates C, Hodgson J, Morley NJ, Sutton BC, Gange AC. 2014. Vertical transmission of fungal endophytes is widespread in forbs. *Ecology and Evolution*, 4(8): 1199-1208.
- Kleczewski NM, Bauer JT, Bever JD, Clay K, Reynolds HL 2012. A survey of endophytic fungi of switchgrass (*Panicum virgatum*) in the Midwest, and their putative roles in plant growth. *Fungal Ecology*, 5(5): 521-529.
- Lima JMS, Pereira JO, Batista IH, Costa Neto PQ, Santos JC, Araújo SP, Pantoja MC, Mota JA, Azevedo JL 2016. Potential biosurfactant producing endophytic and epiphytic fungi, isolated from macrophytes in the Negro River in Manaus, Amazonas, Brazil. *African Journal of Biotechnology*, 15(24): 1217-1223.
- Lopes JC, Chagas Junior AF, Neves ACC, Chapla VM, Batistella CAR. 2017. Fungos endofíticos isolados do capim citronela e seleção de antagonistas a fitopatógenos. *Biota Amazônia*, 7(3): 84-88.
- Maia NC. 2015. *Fungal endophytes of Panicum maximum and Pennisetum purpureum: isolation, identification and antifungal potential*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Lavras. Lavras - MG, 49f.
- Marchi CE, Fernandes CD, Bueno ML, Batista MV, Fabris LR. 2010. Microflora fúngica de sementes comerciais de *Panicum maximum* e *Stylosanthes* spp. *Semina: Ciências Agrárias*, 31(3):575-584
- Mochi DA 2009. *Fungos entomopatogênicos para o controle da mosca-dos-chifres Haematobia irritans em laboratório e campo*. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária). Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal - SP, 93f.
- Oki Y, Soares N, Belmiro MS, Corrêa Junior A, Fernandes GW. 2009. The influence of the endophytic fungi on the herbivores from *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). *Neotropical Biology and Conservation*, 4(2): 83-88.
- Onions AHS., Allsopp D, Eggins HOW. 1981. Smith's introduction to industrial mycology, 7<sup>a</sup> ed., *Edward Arnold*, London, 398p.
- Pamphile JA, Costa AT, Rosseto P, Polonio JC, Pereira JO, Azevedo JL 2017. Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: o caso do *Colletotrichum* sp. *Revista Uningá*, 53(1): 113-119.
- Pereira JO, Azevedo JL, Petrini O. 1993. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report. *Mycologia*, 85(3): 362-364.
- Silva MB, Rondon JN 2013. Utilização de fungo de bambu na biorremediação de solo contaminado. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, 10(10): 2175-2184.

- Souza AQL, Souza ADL, Astolfi Filho S, Pinheiro MLB, Sarquis MIM, Pereira JO 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Bentham. *Acta amazônica*, 34(2): 185-95.
- Tanaka A, Takemoto D, Chujo T, Scott B 2012. Fungal endophytes of grasses. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(4): 462-468.
- Vechiato MH, Aparecido CC, Fernandes CD 2010. *Frequência de fungos em lotes de sementes comercializados de Brachiaria e Panicum*. Instituto Biológico – APTA. Documento técnico 004, p.1-11.
- Wong MKM, Hyde KD 2001. Diversity of fungi on six species of *Gramineae* and one species of *Cyperaceae* in Hong Kong. *Mycological Research*, 105(12): 1485-1491.

## Adubação potássica na incidência e na severidade da antracnose do camu-camu

Kedma da Silva Matos<sup>1</sup>, Lais de Brito Carvalho<sup>1</sup>, Raphael Henrique da Silva Siqueira<sup>2</sup>, Sandra Cátia Pereira Uchôa<sup>1</sup>, Edvan Alves Chagas<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Roraima

<sup>2</sup> Instituto Federal do Amazonas

<sup>3</sup> Embrapa Roraima

Emails: kedma.matos@ufr.br, raphael\_manajosolo@hotmail.com

### Resumo

O camu-camu é uma frutífera originária da região Amazônica, com potencial de comercialização na região Norte do Brasil. Entretanto, a severidade de algumas doenças pode afetar o seu desenvolvimento e produtividade. Assim, objetivou-se avaliar a influência de doses de potássio na incidência e severidade da antracnose no camu-camu. O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Roraima, Boa Vista-RR. Folhas de camu-camu com sintomas de antracnose foram coletadas para isolamento de fitopatógenos. O delineamento foi inteiramente casualizado, com nove repetições. Os tratamentos consistiram de cinco doses de potássio: 0; 20; 40; 80 e 160 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O, empregando cloreto de potássio (KCl) como fonte. Quatro plantas (cada tratamento) foram inoculadas com uma suspensão de 1,0 x 10<sup>6</sup> conídios/mL de *Colletotrichum* sp.. As avaliações foram a cada cinco dias a partir dos primeiros sintomas de antracnose, totalizando 20 dias. Um isolado do complexo *C. gloeosporioides* foi obtido. A incidência da doença foi menor na dose 40 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O e a dose de máximo controle (81,8 kg ha<sup>-1</sup>) reduziu a severidade de 61,75% para 18,9%. A nutrição de plantas de camu-camu com potássio reduz a incidência e severidade da antracnose.

**Palavras-chave:** *Myrciaria dubia*, *Colletotrichum*, Nutrição mineral, Manejo.

### Introdução

A Amazônia brasileira é um dos principais centros de origem e diversidade de espécies frutíferas. No entanto, algumas dessas fruteiras nativas vêm sendo exploradas basicamente de maneira extrativista, necessitando de estudos no que se refere às características agrônomicas e agroindustriais.

Dentre essas espécies frutíferas, destaca-se o camu-camu ou caçari [*Myrciaria dubia* (H. B. K.) McVaugh] com potencial de comercialização para todas as regiões do Brasil. A espécie apresenta porte arbustivo e cresce espontaneamente às margens dos rios e lagos, sendo encontrada na estação chuvosa, parcial ou totalmente submersa (Viégas *et al.*, 2004). Em países como o Peru, estudos com melhoramento genético já se encontram em estado avançado, resultando em produção e industrialização de produtos oriundos da polpa dos frutos que possuem elevado teor de vitamina C (Yuyama, 2002), além de vários compostos fenólicos e atividade antioxidante (Grigio *et al.*, 2017).

A produção de frutos somente em ambientes naturais não garante disponibilidade e qualidade do produto, devido à sazonalidade ocasionada pelos diversos fatores edafoclimáticos. A adaptação de plantas para o cultivo, somada ao manejo adequado e uso de adubações, pode proporcionar maiores condições de desenvolvimento e produção (Abanto *et al.*, 2014). Além de contribuir para o desenvolvimento regional, por agregar valor aos recursos naturais disponíveis na região, constituir fonte de renda das comunidades rurais e favorecer a preservação das espécies nativas (Welter *et al.*, 2011).

Para a implantação de pomares comerciais dessa frutífera são necessárias mudas saudáveis e um manejo adequado para o controle de doenças. Entre essas doenças, uma das mais comuns em frutíferas é a antracnose, inclusive no camu-camu (Perez e Iannacone, 2006). A antracnose é causada por espécies do gênero *Colletotrichum*, considerado como um dos dez fitopatógenos mais relevantes do ponto de vista científico e econômico (Dean *et al.*, 2012).

O manejo nutricional pode ser uma importante ferramenta na melhoria da barreira fisiológica que pode controlar diversas doenças (Tanaka *et al.*, 2008). A nutrição mineral pode influenciar no grau de resistência da planta, por modificar a morfologia ou a histologia, ou ainda alterar a composição química dos tecidos em resposta à infecção por patógenos (Marschner, 1995; Polanco *et al.*, 2012; Pozza *et al.*, 2015).

Dentre os elementos minerais estudados, o potássio (K) contribui para a redução da severidade de doenças em várias culturas, incluindo a antracnose do milho (*Zea mays* L.) (Carvalho *et al.*, 2013), do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) (Lima *et al.*, 2017), do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) (Vieira *et al.*, 2011), no entanto, não há relatos na literatura de trabalhos a respeito da influência desse nutriente no controle da antracnose foliar do camu-camu. Portanto, objetivou-se nesse estudo avaliar a influência de doses de potássio no controle da incidência e da severidade da antracnose em camu-camu.

## Material e Métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na área experimental localizada no Centro de Ciências Agrárias/CCA da Universidade Federal de Roraima/UFRR, Campus Cauamé, no município de Boa Vista - RR (20 52' 20,7" N e 60o 42' 44,2" W e altitude de 90 m). A classificação climática segundo Köppen é do tipo Am (Alvares *et al.*, 2013), com duas estações bem definidas durante o ano, chuvosa de abril a setembro e seca de outubro a março, com temperatura média anual 26,7 °C, precipitação anual média de 1614 mm e umidade relativa do ar de 79% (Araújo *et al.*, 2001).

Antes da implantação do experimento em casa de vegetação foram coletadas folhas de camu-camu com sintomas típicos de antracnose na área experimental do CCA e levadas para o Laboratório de Fitopatologia CCA/UFRR para o isolamento de fitopatógenos. O isolamento foi realizado a partir de desinfestação superficial (etanol 70%, hipoclorito de sódio 2,5% e lavagem em água destilada) dos tecidos que em seguida foram transferidos para o meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) e incubados em BOD a 25 °C. As culturas com morfologia típica de *Colletotrichum* spp. foram transferidas para o meio BDA para obtenção das culturas monospóricas. A caracterização morfológica foi realizada com isolado monospórico, transferido para os meios de cultura BDA e Aveia-ágar, após 7 a 10 dias de incubação a 25 °C com fotoperíodo de 12 h. As medidas das estruturas morfológicas foram realizadas e comparadas com descrições disponíveis na literatura (Weir *et al.*, 2012).

As mudas de camu-camu foram adquiridas da Embrapa Roraima. As mudas surgiram quinze dias após a semeadura e, quando atingiram uma altura de aproximadamente 10 cm, padronizando a altura e o diâmetro do caule, foram transplantadas para sacos de polietileno (15 x 26 cm) contendo substrato padrão na proporção de 3:1, de solo e areia (Chagas *et al.*, 2013). O solo utilizado é classificado como Latossolo Amarelo (Benedetti *et al.*, 2011). As mudas foram mantidas a temperatura de 28 ± 1 °C e com irrigação realizada diariamente para manter a condição de umidade próxima a 60%.

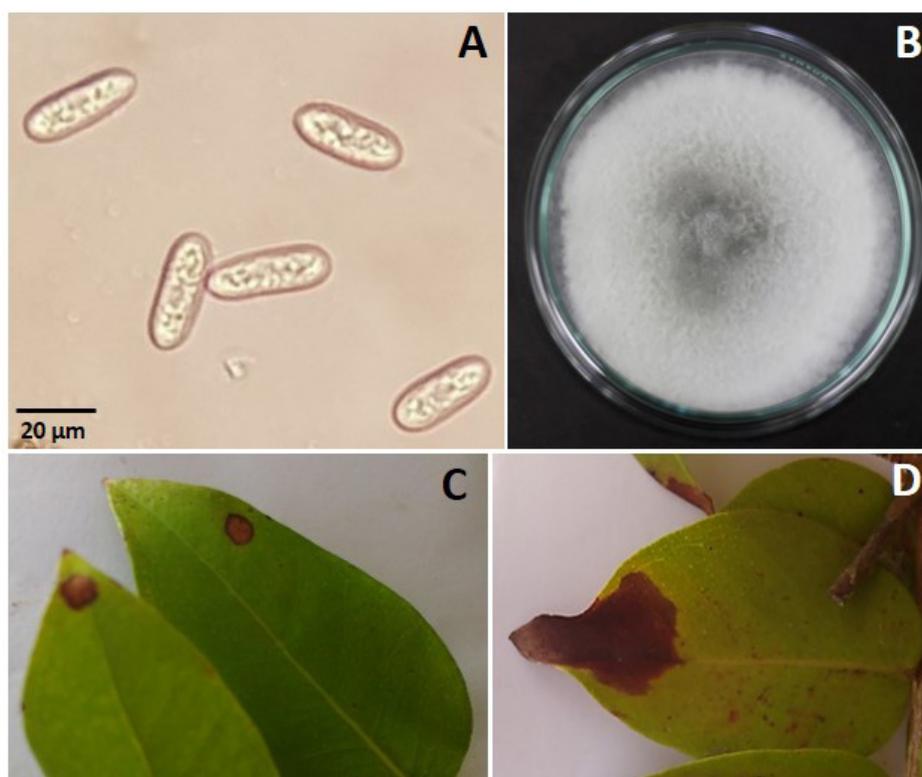
O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 11 repetições. Os tratamentos consistiram de cinco doses de potássio, sendo: 0; 20; 40; 80 e 160 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O, empregando cloreto de potássio (KCl), como fonte. As aplicações das doses de K se deram por incorporação na parcela. Posteriormente, as plantas foram inoculadas com uma suspensão de conídios (1,0 x 10<sup>6</sup> conídios/mL) de *Colletotrichum* sp., sendo 15 mL da solução do inóculo borrifada nas folhas das plantas que foram submetidas à câmara úmida, durante 24 h em casa de vegetação. Foram utilizadas nove plantas inoculadas com o fungo e duas plantas como testemunha inoculadas apenas com água estéril.

As avaliações ocorreram 20 dias após a aplicação das doses de potássio, sendo as plantas avaliadas a cada cinco dias a partir dos primeiros sintomas. A incidência da antracnose foi avaliada pela contagem das plantas com sintomas da doença e a severidade foi mensurada utilizando a escala de notas de acordo com Galli *et al.* (2009), onde: 0 - ausência de manchas de antracnose; 1 - até 25% da área foliar com sintomas; 2 - de 26 - 50% da área foliar com sintomas; 3 - de 51 - 75% da área foliar com sintomas; 4 - de 76 - 100% da área foliar com sintomas de antracnose.

Os dados coletados foram submetidos à análise de variância (p≤0,05) e de regressão, empregando o software SISVAR versão 5.3 (Ferreira, 2010). Os gráficos foram confeccionados com a utilização do software SIGMAPLOT versão 12 (Systat Software, 2011).

## Resultados e Discussão

Um isolado de *Colletotrichum* sp. foi obtido a partir dos sintomas de antracnose e formou colônia variando da cor branca a cinza claro com esporulação na cor laranja. Os conídios foram retos, cilíndricos com as extremidades arredondadas, hialinos, asseptados, medindo ( $n = 20$ ) a média de  $10 \times 3,5 \mu\text{m}$  (Figura 1 A e B). O isolado foi reisolado de plantas inoculadas que apresentaram sintomas de antracnose (Figura 1 C e D), assim como os observados no campo, comprovando ser o patógeno e completando os postulados de Koch. Os sintomas de antracnose apareceram após 7 dias da inoculação do patógeno. Nas plantas não inoculadas não foram observados sintomas da doença.



**Figura 1.** Características morfológicas de *Colletotrichum* sp. e sintomas de antracnose nas folhas de camu-camu. A. Conídios. B. Colônia após 10 dias de crescimento em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA). C e D. Sintomas de antracnose após a inoculação com o patógeno, nas doses de 80 e 160  $\text{kg ha}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{O}$ , respectivamente.

De acordo com as características analisadas o isolado pertence ao complexo de espécies *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (Weir *et al.*, 2012). A espécie *C. gloeosporioides* foi relatada em camu-camu, no Peru (Perez e Iannacone, 2006). A identificação das espécies de *Colletotrichum* é tradicionalmente realizada com base em caracteres morfológicos, no entanto, existe grande diversidade fenotípica e instabilidade desses caracteres em função do ambiente (Cannon *et al.*, 2008). Sendo assim, necessários outros estudos, principalmente com base na filogenia molecular para identificar a nível de espécie.

O aumento das doses de K afetou a incidência e a severidade da antracnose em camu-camu. A incidência da doença foi menor na dose  $40 \text{ kg ha}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{O}$ , sendo observada quatro plantas com sintomas da doença (Figura 2). Nas doses de  $20 \text{ kg ha}^{-1}$  e  $80 \text{ kg ha}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{O}$ , foram observadas cinco e seis plantas com sintomas da doença, respectivamente. Entretanto, nas doses 0 e  $160 \text{ kg ha}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{O}$  a incidência da doença foi semelhante, todas as nove plantas inoculadas com o patógeno apresentaram sintomas da doença, possivelmente em razão de desbalanço do K, embora não tenha sido realizada a análise foliar para essa comprovação. As testemunhas de todos os tratamentos não apresentaram sintomas da doença.

O excesso ou a falta de K podem ser considerados fatores importantes no desenvolvimento dessa doença em camu-camu. May-De-Mio *et al.* (2008), também, observaram que o excesso de K aumentou a podridão parda [*Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey] em ameixeira. De acordo com Pozza *et al.* (2001), o equilíbrio nutricional é fundamental para o controle de doenças. O uso adequado de macro e de micronutrientes exercem funções específicas no metabolismo vegetal, e assim, favorece a resistência das plantas ao ataque de patógenos.

A relação entre severidade da antracnose e doses de K foi descrito por modelo quadrático negativo (Figura 3), constatou-se que o aumento das doses de K reduziu a severidade de 61,75% para 18,9%, na dose de máximo controle (81,8 kg ha<sup>-1</sup>). A partir dessa dose, há uma inversão no controle da doença que alcança 58,7% na dose de 160 kg ha<sup>-1</sup>. Nas doses de 0 e 160 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O foram observadas as maiores notas de área foliar com sintomas de antracnose, variando de 1 a 4. Enquanto na dose de 80 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O foram observadas as menores notas, variando de 1 a 2.

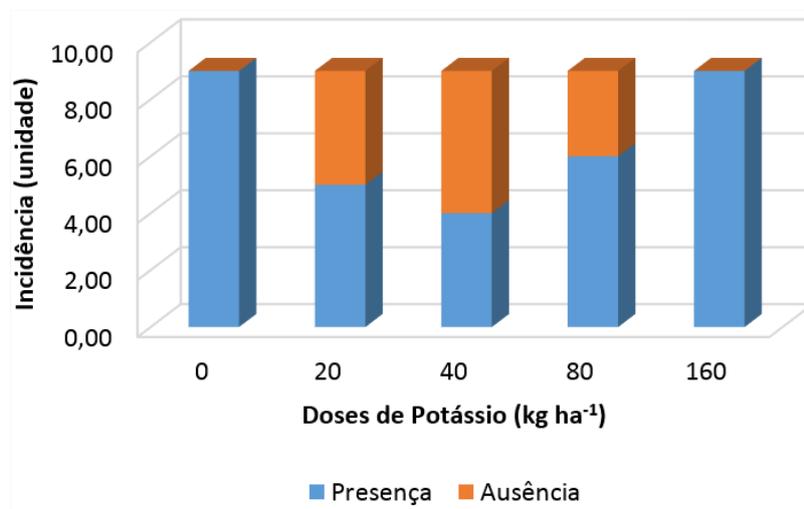


Figura 2. Incidência da antracnose nas nove plantas de camu-camu inoculadas com *Colletotrichum* sp., e em função de doses de potássio.

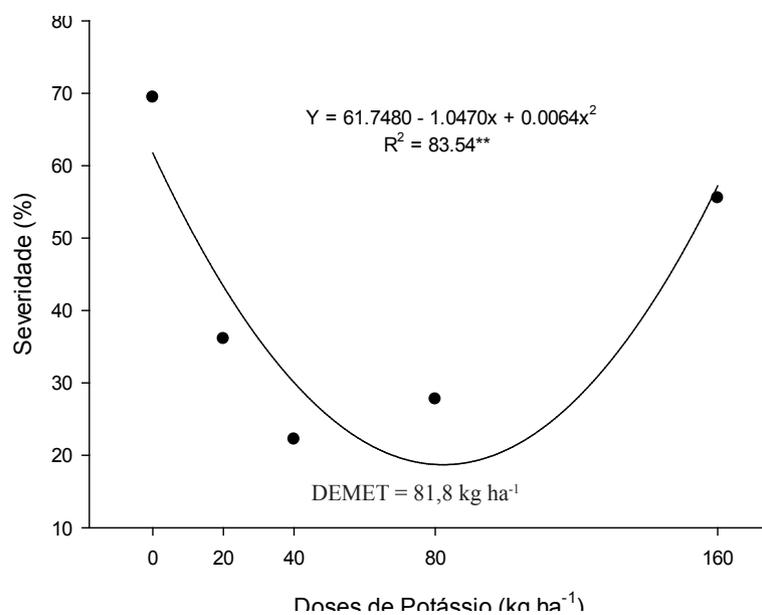


Figura 3. Severidade da antracnose em plantas de camu-camu em função de doses de potássio. DEMET - Dose de Máxima Eficiência Técnica.

No feijoeiro, o aumento da dose de potássio na forma de KCl foi mais eficiente no controle da antracnose, sendo a dose de 180 kg. há<sup>-1</sup> considerada a melhor dose para reduzir a severidade da doença (Lima *et al.*, 2017). Resultado semelhante foi observado no cajueiro, onde o potássio também na forma de KCl reduziu a suscetibilidade das plantas à antracnose (Viana *et al.*, 2011).

O papel do K na proteção de plantas é destacado na literatura. Esse nutriente aumenta a espessura da parede celular em células da epiderme, promove rigidez da estrutura dos tecidos, regula a abertura dos estômatos, além de contribuir para a recuperação de tecidos que sofreram injúrias (Marschener, 1995), diminuindo a incidência e a severidade de doenças.

## Conclusões

O fungo *C. gloeosporioides* é o potencial patógeno associado a antracnose do camu-camu nas condições experimentais do presente estudo.

A nutrição de plantas de camu-camu com potássio reduz a incidência e severidade da antracnose.

A adubação equilibrada com potássio auxilia no controle da antracnose.

## Agradecimentos

A Capes, CNPq e UFRR pelo fomento e estrutura para a realização da pesquisa.

## Referências

- Abanto CR, Chagas EA, Albuquerque TCS, Souza AG, Araújo WF, Chagas PC, Andrade JKC, Souza OM 2014. Crescimento inicial de plantas de camu-camu sob fertirrigação com potássio em condições de terra firme. *Folia Amazonica*, 23(1):7-16.
- Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Gonçalves JLM, Sparovek G 2013. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, 22(6):711-728.
- Araújo WF, Andrade Júnior AS, Medeiros RD, Sampaio RA 2001. Precipitação pluviométrica provável em Boa Vista, Brasil. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 5(3):563-567.
- Benedetti UG, Vale Júnior JF, Schaefer CEGR, Melo VF, Uchôa SCP 2011. Gênese, química e mineralogia de solos derivados de sedimentos plioleustocênicos e de rochas vulcânicas básicas em Roraima, norte amazônico. *Revista brasileira de ciência do solo*, 35(2):299-312.
- Carvalho DO, Pozza EA, Casela CR, Costa RV, Pozza AAA, Carvalho CO 2013. Adubação nitrogenada e potássica na severidade da antracnose em dois cultivares de milho. *Revista Ceres*, 60(3):380-387.
- Cannon PF, Buddie AG, Bridge PD 2008. The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycotaxon*, 104:189-204.
- Chagas EA, Ribeiro MIG, Souza OM, Santos VA, Lozano RMB 2013. Alternatives substrates for production of seedlings camu-camu. *Revista de Ciências Agrárias*, 56(Supl):5-12.
- Dean R, Kan JALV, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Pietro AD, Spanu PD, Rudo JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, Foster GD 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4):414-430.
- Ferreira DF. SISVAR. 2010 *Sistema de análise de variância*. Versão 5.3. Lavras-MG: UFLA.
- Galli JA, Silveira LCP, Michelotto M.D., Martins ALM 2009. Avaliação da incidência de antracnose, do desempenho e estado nutricional de variedades de manga, para cultivo orgânico, na região centro-norte do Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31(3):701-709.
- Grigio ML, Chagas EC, Rathinasabapathi B, Chagas PC, Silva ARV, Sobral STM, Oiveira RR 2017. Qualitative evaluation and biocompounds present in different parts of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit. *African Journal of Food Science*, 11(5):124-129.
- Lima WN, Alves AF, Gonçalves J., Deurimar H, da Silva FF, da Silva A, da Silva WA. 2017. Potassium fertilization influence in anthracnose control in Common bean. *Publications from USDA-ARS / UNL Faculty*, 60:11-12.
- Marschener H. 1995. *Mineral nutrition of higher plant*. 2. ed. New York: Academy Press, 889p.

- May-De-Mio LL, Tutida I., Motta ACV, Dolinski MA, Serrati BM, Montegutti D 2008. Doses de aplicação de nitrogênio e potássio em relação à podridão parda e sarna em ameixeira 'Reubennel' na região de Araucária, Paraná. *Tropical Plant Pathology*, 33(1):35-40.
- Perez D., Iannacone J 2006. Control Químico de la Antracnosis Causado por *Colletotrichum gloeosporioides* en el Cultivo del Camu Camu (*Myrciaria dubia* Myrtaceae) en Ucayali, Perú. *Fitopatología Brasileira*, 31(5):518.
- Polanco LR, Rodrigues FA, Nascimento KJT, Shulman P, Silva LC, Neves FW, Vale FXR. 2012. Biochemical aspects of bean resistance to anthracnose mediated by silicon. *Annals of Applied Biology*, 161(2):140-150.
- Pozza AAA, Martinez HEP, Caixeta SL, Cardoso AA, Zambolim L, Pozza EA 2001. Influência da nutrição mineral na intensidade da mancha-de-olho-pardo em mudas de cafeeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36(1):53-60.
- Pozza EA, Pozza A A A, Botelho DMS 2015. Silicon in plant disease control. *Revista Ceres*, 62(3):323-331.
- SIGMAPLOT 2011. *Sigmaplot for Windows*, version 12. Systat softwar. SOFTWARE.
- Tanaka MAS, Freitas JG, Medina PF 2008. Incidência de doenças fúngicas e sanidade de sementes de trigo sob diferentes doses de nitrogênio e aplicação de fungicida. *Summa Phytopathologica*, 34(4):313-317.
- Viana FMP., Cavalcante RRR., Uchôa CN, Oliveira VH. 2011. Interação irrigação-clone-adubação na antracnose do cajueiro. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento/ Embrapa Agroindústria Tropical*, 19 p.
- Viégas IJM, Thomaz MAA, Silva JF, Conceição HEO, Naiff APM 2004. Efeito da omissão de macronutrientes e boro no crescimento, nos sintomas de deficiências nutricionais e na composição mineral de plantas de camucamuzeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 26(2):315-319.
- Weir BS, Johnston PR, Damm U 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*, 73(1):115-180.
- Welter MK, Melo VF, Bruckner CH, Góes HTP, Chagas EA, Uchôa SCP 2011. Efeito da aplicação de pó de basalto no desenvolvimento inicial de mudas de camu-camu (*Myrciaria dubia*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33:922-931.
- Yuyama K 2002. Caçari: um fruto fantástico como fonte de vitamina C. *Revista Acta Amazonica*, 32(1):169-174.

## Potencial antioxidante dos extratos de fungos endofíticos isolados de *Annona jahnii* (Annonaceae)

Gilmar Prado De Sousa<sup>1</sup>, Gilmar Prado de Sousa<sup>1,2</sup>, Adriana Flach<sup>1,2</sup>, Luiz Antonio Mendonça Alves da Costa<sup>2</sup>, Antonia Queiroz Lima de Souza<sup>3</sup>, Letícia Maciel do Nascimento Odilair<sup>4</sup>, Darlison Feitosa Lima<sup>4</sup>

<sup>1</sup> PG Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima

<sup>2</sup> Departamento de Química da Universidade Federal de Roraima

<sup>3</sup> Universidade Federal do Amazonas

<sup>4</sup> Programa de Iniciação Científica- PIC/UFRR

Emails: aflach@gmail.com, gilmarprado.sousa@gmail.com

### Resumo

Os fungos endofíticos são definidos por sua ocorrência assintomática no interior dos tecidos vegetais. Estes microrganismos podem se hospedar em plantas que crescem em diferentes habitats, sendo isolados principalmente de plantas tropicais, as quais abrigam uma variedade de endófitos, que surgem como alternativa na descoberta de novos produtos naturais. O objetivo principal desse estudo foi estudar os fungos endofíticos isolados de *Annona jahnii* e avaliar o potencial antioxidante de seus extratos. Para a elaboração dos extratos foram selecionados 5 isolados fúngicos. As cepas foram cultivadas em meio líquido BDL, ISP2 e AVEIA, e incubadas nas temperaturas de 18° e 26 °C a 130rpm por 15 dias. Após o período, o líquido fermentado foi extraído com Acetato de etila. O potencial antioxidante dos extratos fúngicos foram avaliados através dos métodos: ação sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e pela auto-oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Após a análise, verificou-se que os isolados produziram mais biomassa quando fermentados a 26°C, sendo os extratos mais promissores o EF407, EF303 e o EF168 respectivamente. Com relação a atividade antioxidante, pelo método DPPH, os extratos EF40726° e o EF40718° exibiram melhor ação antioxidante, com IC50 igual à 0,005 e 0,007 mg/mL. No método  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, os extratos EF30326° (68,17%) e o EF30318° (64,20 %) apresentaram melhor potencial antioxidante. Logo, os dados obtidos nesse estudo demonstraram que os extratos dos fungos endofíticos da espécie vegetal, são promissores e expressam potencial antioxidante.

**Palavras-chave:** Fungos endofíticos, Atividade Antioxidante, Produtos naturais.

### Introdução

Os fungos endofíticos são microrganismos que vivem no interior dos tecidos e órgãos vegetais de forma assintomática. A presença de fungos endofíticos na planta hospedeira, confere vantagens como resistência a condições de estresse, proteção contra pragas e patógenos, promove o crescimento vegetal através da produção de fito-hormônios entre outros (Santos *et al.*, 2013). As plantas podem hospedar diversos microrganismos endofíticos, sendo possível o isolamento de uma grande quantidade de espécies a partir de uma única planta. A natureza dessa interação tem despertado o interesse de pesquisadores na tentativa de conhecer a diversidade de compostos bioativos produzidos por esse grupo de microrganismos e suas aplicações biotecnológicas (Mussi-Dias *et al.*, 2012)

Nesse contexto, os compostos produzidos pelos fungos endofíticos variam de classe e incluem alcaloides (Yunianto *et al.*, 2014), esteroides (Marinho *et al.*, 2009), terpenos, flavonoides (Li *et al.*, 2015), os quais exibem ação antimicrobiana, antioxidante entre outras atividades biológicas. (Wang *et al.*, 2011).

Considerando que os fungos endofíticos, principalmente os presentes em espécies tropicais, representam uma fonte promissora na descoberta de novos produtos naturais, e motivados pela ausência de estudos a respeito da microbiota endofítica de *Annona jahnii*, este trabalho visa estudar os fungos endofíticos associados a *A. jahnii* e avaliar o potencial antioxidante de seus extratos.

## Material e Métodos

Para a elaboração dos extratos microbianos foram selecionadas aleatoriamente 5 colônias fúngicas F303 (*Trichoderma*), F407 (*Aspergillus*), F168 (*Penicillium*), F99 (*Paecilomyces*) e F71 (*Fusarium*), acessadas da Coleção de Microrganismos do Grupo de Pesquisa GBQF da Universidade Federal de Roraima. Os fungos selecionados foram reativados em placas de Petri contendo os meios de isolamento BDA + L preparado com 100g de batata inglesa, 10g de Dextrose, 1g de Extrato de levedura e 7,5g de Ágar. O meio ISP2 foi preparado com 5g de Amido de milho, 2g de Extrato de levedura, 5g de Extrato de malte, 20g de Dextrose e 7,5g de Ágar. E o meio AVEIA preparado com 5g de aveia, 2g de Extrato de levedura, 5g de Extrato de malte, 20g de Dextrose e 7,5g de Ágar. As cepas foram incubadas em agitador do tipo Shaker a 130 rpm, sob temperaturas controladas de 18 °C e 26 °C durante 15 dias. Após o período, o líquido fermentado foi separado do micélio por meio de uma filtração a vácuo, e extraído por meio da técnica de extração líquido-líquido com 25 mL (3x) de acetato de etila. Ao término dos procedimentos de extração, as soluções foram secas com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtradas e evaporadas. Após a evaporação total do solvente, os extratos foram pesados para obtenção da massa resultante e armazenados a 4 °C (Souza *et al.*, 2004; Bucker *et al.*, 2013.). Os fungos que apresentaram maior produção de biomassa após o cultivo em pequena escala, foram selecionados e submetidos a crescimento em larga escala utilizando 250 mL do meio de isolamento durante 15 dias.

O potencial antioxidante dos extratos foi realizado através dos métodos: ação sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) de acordo com o método descrito por Mensor *et al.* (2001) com modificações (Pontis *et al.*, 2014). Inicialmente os extratos foram submetidos a uma análise qualitativa prévia, para investigar a ocorrência de substâncias antioxidantes. Para tanto, aplicou-se 50 µL dos extratos fúngicos (1 mg/mL) em placas cromatográficas. Em seguida, uma solução concentrada do reativo DPPH foi borrifada. O surgimento de manchas amarelas, indicará a presença de compostos antioxidantes nos extratos. Para determinar o potencial antioxidante foram preparadas soluções metanólicas dos extratos a 1 mg/mL. A partir destas, foram retiradas alíquotas crescentes as quais foram misturadas com 1,5 mL de DPPH (0,1 mM). Após 30 minutos de reação ao abrigo da luz, as absorbâncias das soluções foram medidas em espectrofotômetro UV-Visível a 516 nm. As análises foram realizadas em triplicata e os valores de IC50, foram calculados a partir da regressão linear e a fórmula descrita na metodologia. A atividade antioxidante pelo método auto-oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico foi realizada de acordo com a metodologia de Emmons *et al.* (1999), com modificações de Rufino *et al.* (2006). O ensaio foi realizado utilizando 300µL dos extratos a 1 mg/mL, acrescido de 5 mL da emulsão reativa de β-caroteno/ácido linoleico. As absorbâncias das soluções foram obtidas em espectrofotômetro a 470 nm no período de 2 horas em intervalos de 15 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicata e o percentual de atividade foi expresso como percentual de inibição relativa comparada a degradação da emulsão após 120 minutos.

## Resultados e Discussão

As massas dos extratos obtidas após o primeiro cultivo, variaram significativamente entre os meios de cultura e em ambas as temperaturas utilizadas (Tabela 1). De modo geral, podemos observar que os extratos à 26°C forneceram maior massa, quando comparados aos extratos obtidos na temperatura de 18° C. Isso pode estar relacionado ao fato de que cada microrganismo requer diferentes condições de cultivo, o que pode ter influenciado na produção de biomassa dos endófitos.

Quanto aos meios de cultura em que foram cultivados, o BDL pode ser considerado o mais indicado para o cultivo dos fungos selecionados. Por outro lado, o meio ISP2 pode ser adotado como um meio intermediário, e o meio AVEIA o menos indicado para o cultivo desses microrganismos sob essas condições. Com relação aos extratos obtidos na temperatura de 26 °C, constatou-se que o extrato EFASP26° (BDL) forneceu maior massa com valor igual a 0,2167g, seguido do EFPEN26° (BDL) com massa de 0,1336 g, e o EFTRIC26° (ISP2) com 0,099g. Dentre os extratos obtidos a 18° C, os extratos mais promissores foram o EFTRIC18° (0,1128g) e o EFASP18° (0,1738g) cultivados em BDL que forneceram maior massa em relação aos demais. Os resultados obtidos após novo cultivo estão apresentados na tabela 2.

Analisando a tabela 2, pode-se observar que os extratos apresentaram boa quantidade de massa tendo em vista o volume de meio utilizado (250 mL) para o cultivo dos mesmos. Sendo o extrato EFASP o que forneceu maior quantidade de massa nas duas temperaturas estudadas.

Por meio da análise qualitativa, foi possível observar que os extratos fúngicos investigados, exibiram manchas amareladas, características da presença de compostos antioxidantes. Quanto ao potencial antioxidante dos extratos, os resultados obtidos pelos métodos complementares estão listados na tabela 3.

Com relação aos extratos fúngicos, no método DPPH os extratos EFASP<sub>26°</sub> e o EFASP<sub>18°</sub> exibiram melhor ação antioxidante, com IC<sub>50</sub> igual à 0,005 e 0,007 mg/mL respectivamente, quando comparados ao padrão de referência BHT. Com relação ao método β-caroteno/ácido linoleico, os extratos EFTRIC<sub>26°</sub> e o EFTRIC<sub>18°</sub> apresentaram potencial antioxidante de 68,17% e 64,20 %, respectivamente, evidenciando atividade antioxidante significativa. Extratos de fungos endofíticos, têm sido investigados e reportados na literatura como fonte de compostos com potencial antioxidante. Yadav *et al.* (2014) avaliaram por diferentes métodos a atividade antioxidante e o teor de fenólicos totais de extratos de acetato de etila de fungos endofíticos isolados de *Eugenia jambolana*, e atribuíram em termos de percentuais que *Chaetomium sp.* e *Aspergillus sp.* exibiram alto potencial antioxidante de 80% e 72% respectivamente. Dzoyem *et al.* (2017) isolaram quatro compostos do endófito *Epicoccum nigrum*, dentre eles a quinaquina antraquinona a qual exibiu atividade antioxidante pelo método DPPH com IC<sub>50</sub> 0,011 mg/mL.

**Tabela 1.** Massa obtida (g) dos extratos brutos nas temperaturas de 18 °C e 26 °C. Onde EF significa extrato fúngico e a numeração corresponde ao código do fungo seguida da temperatura de cultivo.

Temperatura	Meio de cultura	EFTRIC <sub>18°</sub>	EFPEN <sub>18°</sub>	EFASP <sub>18°</sub>	EFPHA <sub>18°</sub>	EFFUS <sub>18°</sub>
18° C	BDL	0,1128	0,0122	0,1738	0,0033	0,0022
	ISP2	0,0886	0,0099	0,0197	0,0036	0,0023
	AVEIA	0,0025	0,0021	0,0117	0,001	0,0022
Temperatura	Meio de cultura	EFTRIC <sub>18°</sub>	EFPEN <sub>18°</sub>	EFASP <sub>18°</sub>	EFPHA <sub>18°</sub>	EFFUS <sub>18°</sub>
26° C	BDL	0,0683	0,1336	0,2167	0,0085	0,0132
	ISP2	0,099	0,1292	0,1159	0,0073	0,0144
	AVEIA	0,0727	0,1006	0,0947	0,0074	0,0147

**Tabela 2.** Massa obtida (g) dos fungos endofíticos após segundo cultivo.

Extratos fúngicos	Meio de cultura	Massa obtida (g)
EFTRIC <sub>18°</sub>	BDL	0,1332
EFASP <sub>18°</sub>	BDL	0,2141
EFPEN <sub>26°</sub>	BDL	0,1470
EFTRIC <sub>26°</sub>	ISP2	0,1146
EFASP <sub>26°</sub>	BDL	0,2324

**Tabela 3.** Atividade antioxidante dos extratos fúngicos das linhagens dos fungos.

Extratos fúngicos	DPPH IC <sub>50</sub> (mg/mL)	β-caroteno/ácido linoleico (%)
EFTRIC <sub>18°</sub>	0,093	64,20
EFASP <sub>18°</sub>	0,007	48,68
EFPEN <sub>26°</sub>	0,012	45,94
EFTRIC <sub>26°</sub>	0,099	68,17
EFASP <sub>26°</sub>	0,005	24,32
BHT	0,006	89,61
Trolox	0,011	87,01

## Conclusão

Os fungos endofíticos de *Annona jahnii* produziram mais biomassa, quando fermentados a 26°C, sendo os extratos EFASP, EFTRIC e o EFPEN os mais promissores. Entre os meios de cultura, o meio BDL demonstrou ser o mais indicado para o cultivo dos endófitos estudados.

## Referências

- Bücker A, Bücker NC, Souza AQ, Gama AM, Rodrigues-Filho E, Costa FM, Nunez CV, Silva AC, Tadei WP 2013. Larvicidal effects of endophytic and basidiomycete fungus extracts on *Aedes* and *Anopheles* larvae (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46(4):411-419.
- Dzoyem JP, Melong R, Tsamo AT, Maffo T, Kapche DGWF, Ngadjui BT, McGaw LJ, Eloff JN 2017. Cytotoxicity, antioxidant and antibacterial activity of four compounds produced by an endophytic fungus *Epicoccum nigrum* associated with *Entada abyssinica*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(1):251-253.
- Emmos CL, Peterson DM, Paul GL 1999. Antioxidant capacity of Oat (*Avena sativa* L.) Extracts. 2. In Vitro Antioxidants Activity and Contents of Phenolic and Tocol Antioxidants. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v.47, n. 2, p.4894-4898.
- Li YL, Xin XM, Hao GP 2015. The endophytic fungi of *Salvia miltiorrhiza* Bge. f. alba are a potential source of natural antioxidants. *Botanical Studies*, 56(5):1-7.
- Marinho AMR, Marinho PSB, Filho ER 2009. Esteroides produzidos por *Penicillium herquei*, um fungo endofítico isolado dos frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae). *Química Nova*, 32(7):1710-1712.
- Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, dos Santos TC, Leitão SG, Coube CS 2001. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. *Phytotherapy Research*, 15 (2):127-130.
- Mussi-Dias V, Araújo ACO, Silveira SF, Rocabado JMA, Araújo KL 2012. Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 14(2):261-266.
- Pontis JA, Costa LAMA, Silva SJR, Flach A 2014. Color, phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of honey from Roraima, Brazil. *Food Science Technology*, 34(1): 69-73.
- Santos LSA, Rhoden AS, Barros IT, Tonini RCG, Marques RM, Vitor Souza HE, Pamphile, J. A. (2013). Interação harmônica entre fungos e plantas: aspectos da relação endófito/hospedeiro. *Revista Saúde e Biologia*, 8(1):92-101.
- Souza AQL, Souza ADL, Filho AS, Pinheiro MLB, Sarquis MIM, Pereira JO 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnoscogens* bentham. *Acta Amazonica*, 34(2)185-195.
- Wang QX, Li SF, Zhao F Dai HQ, Bao L, Ding R, Gao H, Zhang LX, Wen HA, Liu HW 2011. Chemical constituents from endophytic fungus *Fusarium oxysporum*. *Fitoterapia*, 82(5):777-81.
- Yadav M, Yadav AJP 2014. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(1):256-261.
- Yunianto P, Rusman Y, Saepudin E, Suwarso WP, Sumaryono W 2014. Alkaloid (Meleagrine and Chrysogine) from endophytic fungi *Penicillium* sp. of *Annona squamosa* L. *Pakistan Journal of Biological Science*, 17(5):667-674.

## Identificação de *Trichoderma* spp. isolados de ambientes tropicais através de análises morfológicas e moleculares

Kamila Rangel Primo Fernandes<sup>1</sup>, Antonia Queiroz Lima de Souza<sup>2</sup>,  
Lane Firmino Alencar<sup>3</sup>, Flávio Henrique da Silva<sup>4</sup>, Danilo Elton Evangelista<sup>5</sup>,  
José Odair Pereira<sup>2</sup>, Afonso Duarte Leão de Souza<sup>1</sup>

<sup>1</sup> PG Química, Universidade Federal do Amazonas

<sup>2</sup> Prof. Pesq. FCA, Universidade Federal do Amazonas

<sup>3</sup> Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Universidade do Estado do Amazonas

<sup>4</sup> Prof. Pesq, Universidade Federal de São Carlos

<sup>5</sup> Pesq. Instituto de Física Biomolecular, Universidade Federal de São Carlos

Emails: kamila.rangelprimo@gmail.com, souzadq@gmail.com

### Resumo

Fungos do gênero *Trichoderma* reproduzem-se assexuadamente e sexuadamente (*Hypocrea*), podem estar associados ou não a outros organismos e são encontrados em plantas e solos de regiões de clima temperado e tropical, entre outros ambientes. Muitas dessas espécies são descritas como produtoras de enzimas de interesse biotecnológico. O presente trabalho teve como objetivo agrupar e caracterizar através de análises morfológicas e moleculares isolados de *Trichoderma* spp. de diferentes habitats tropicais, principalmente do estado do Amazonas. Esses fungos foram avaliados quanto as suas características macro e micromorfológicas e por sequenciamento das regiões *Its-1* e *Its-2* do rDNA. As 29 linhagens foram agrupadas em cinco grupos através das características morfológicas e confirmadas pelas análises moleculares como: *T. asperellum* (4), *T. harzianum* (17), *T. viride* (1), *T. koningii* (1) e *T. atroviride* (6). O trabalho realizado aponta para uma razoável diversidade de *Trichoderma* spp. oriundos da Amazônia com destaque para *T. harzianum* que representou 58,62% de todas as cepas estudadas e identificadas.

**Palavras-chave:** Diversidade biológica; Fungos, Amazônia.

### Introdução

Os fungos do gênero *Trichoderma* são anamórficos, pertencentes à classe dos hifomicetos, assexuais ou conidiais e têm como teleomorfo o gênero *Hypocrea* (Alexopoulos *et al.*, 1996; Guarro *et al.*, 1999). Altamente adaptáveis, são saprófitas, vivem no solo, madeiras, cascas e muitos outros substratos, e interação com animais e plantas (Atanasova *et al.*, 2013b; Holzlechner *et al.*, 2016; Kubicek *et al.*, 2011). Algumas espécies de *Trichoderma* têm ampla distribuição, enquanto outras são geograficamente limitadas a ambientes mais frios ou de clima tropical (Mello, 2009).

São fungos de crescimento rápido em meio de cultura, as colônias de espécies de *Trichoderma* podem crescer dispersas e em flocos ou compactadas com tufos; os conídios e conidióforos possuem forma e tamanho variados; seus clamidósporos são intercalares ou terminais. Os conídios formam-se nas extremidades das fiálides e sua pigmentação determina a coloração das colônias que podem ser verdes, amarelas, verde-amarelas ou incolores (Howell, 2003).

Os fungos *Trichoderma* são eficientes na produção de antibióticos e enzimas de interesse biotecnológico (Blumenthal, 2004; Juhász *et al.*, 2004; Silva, 2006; Kóvacs *et al.*, 2009 a, b), porém as dificuldades e complexidades da classificação taxonômica de suas espécies exigem cada vez mais o uso de abordagens moleculares e filogenéticas relacionadas ao DNA ribossômico e outros genes marcadores. O objetivo deste trabalho é realizar análises morfológicas e identificação moleculares de linhagens de *Trichoderma* pertencentes à Coleção do Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia - LABMICRA - UFAM

## Material e Métodos

Para este trabalho foram utilizadas 29 linhagens pertencentes à Coleção do LABMICRA - UFAM, isolados de diversos ambientes tropicais (Tabela 1).

Os meios de cultura, soluções, placas de Petri, vidrarias em geral e todos os materiais utilizados, foram esterilizados em autoclave vertical a 121°C e uma atmosfera de pressão por 15 minutos. Os isolados estavam conservados na coleção em: método Castellani (1939); óleo mineral e glicerol 20%.

As linhagens selecionadas foram reativadas em modo tri pontual em placas de Petri, a 26 ° C contendo meio de cultivo BDA por 2 a 5 dias de crescimento; as colônias viáveis e puras foram repicadas para o centro de novas placas com BDA sob as mesmas condições. Foram preparadas suspensões dos conídios produzidos nestas placas em glicerol 20%, na concentração estimada de  $7,5 \times 10^7$  UFC/mL (5 da escala Mac Farland).

Para a avaliação das características macromorfológicas dos fungos, 10 µL das suspensões de conídios foram re-inoculados no centro de placas com BDA e incubados a 26 °C por oito dias. Após crescimento, as vinte e nove linhagens foram avaliadas e agrupadas de acordo com as similaridades macro morfológicas, observando-as quanto à forma, textura, cor da frente e do verso, tipo de borda e liberação de pigmentação (Souza, 2004).

Para as análises micromorfológicas, utilizou-se a técnica de microcultivo. Inóculos de 0,5 cm<sup>2</sup> de micélio crescido em BDA foram inoculados em placas de Petri com o mesmo meio e sobre eles foram depositadas lamínula esterilizadas, seguindo-se incubação a 26 °C por 24 e 48h. Após o crescimento dos fungos, as lamínulas foram retiradas, depositadas invertidas sobre lâminas contendo corante blue cotton e analisadas em microscópio óptico, nas objetivas de 20x e 40x.

**Tabela 1.** Dados das linhagens de *Trichoderma* depositadas na coleção LABMICRA - UFAM

Linhagem	Especificação da linhagem	Classificação	Origem de isolamento	Local da coleta
19	F80	Endofítico	<i>Strychnos cogens</i>	AM010- AM
28	Ansp. CC2 1.2 Aveia	Endofítico	<i>Rollinia</i> sp.	Campus da UFAM
37	MpRe11 2.3	Endofítico	<i>Murraya paniculata</i>	São Carlos - SP
42	AnspR1 2.1	Endofítico	<i>Rollinia</i> sp.	Campus da UFAM
51	AnspC3 1.2c	Endofítico	<i>Rollinia</i> sp.	Campus da UFAM
54	AnspC3 1.2a BDA	Endofítico	<i>Rollinia</i> sp.	Campus da UFAM
55	AnspC3 1.2b BDA	Endofítico	<i>Rollinia</i> sp.	Campus da UFAM
60	AnspCC2 2.2 Aveia	Endofítico	<i>Rollinia</i> sp.	Campus da UFAM
69	Vrc2 2.2b	Endofítico	<i>Victoria amazonica</i>	Careiro -AM
70	Vrc2 3.2	Endofítico	<i>V. amazonica</i>	Careiro -AM
73	MpCe3 3.1	Endofítico	<i>M. paniculata</i>	São Carlos - SP
88	VrC 2.13. ISP2	Endofítico	<i>V. amazonica</i>	Careiro -AM
136	Trich. 1437	Solo	Terra preta de índio	AM
138	Trich. 1343	Endofítico	Não identificada	AM
140	Trich. 1589 b	Endofítico	Jatobá	AM
145	VrC1 3.3 b	Endofítico	<i>V. amazonica</i>	Careiro -AM
219	Trichoderma 113	Endofítico	Não identificada	AM
220	Trichoderma 114	Endofítico	Não identificada	AM
221	Trichoderma 1349 b	Endofítico	Não identificada	AM
234	Trichoderma 115	Endofítico	Não identificada	AM
261	Trichoderma 1601 b	Endofítico	Não identificada	AM
264	Trichoderma 1341	Endofítico	Não identificada	AM
265	Trichoderma 1598 c	Endofítico	Não identificada	AM
267	Trichoderma 1334	Endofítico	Não identificada	AM
269	Trichoderma 1417-1	Endofítico	Não identificada	AM
364	EjF2 2.1-F2B	Endofítico	<i>Peperomia pellucida</i>	Campus da UFAM
531	Trichoderma. 1439	Endofítico	Não identificada	AM
867 (M59)	Aquat (M59)	Aquático	Pequenas lagoas	Coari - AM
868 (M56)	Aquat (M56)	Aquático	Pequenas lagoas	Coari - AM

Para a avaliação morfométrica (Samuels *et al.*, 1999), 10 µL das suspensões de esporos foram inoculadas a 3 cm da borda da placa de Petri de 8,5 cm de diâmetro, em triplicata para cada fungo. Foi feita a medição do crescimento diário radial em centímetros, até o micélio atingir toda a placa.

Para a extração de DNA, as suspensões de esporos foram cultivadas em meio BDL por 48 h a 26 °C e 120 rpm Souza (2006). O micélio produzido foi separado por filtração e triturado em nitrogênio líquido; 200 mg foram adicionados a microtubo de 2 mL, misturados com 1000 µL de tampão de extração (CTAB), incubados em banho-maria a 65 °C por 30 minutos e resfriados em gelo. Após adicionar 200 µL de clorofil e agitar, a mistura foi centrifugada a 12.000 rpm por 2 minutos.

A fase aquosa foi removida para outro tubo limpo, misturada com 500 µL clorofil, agitada e centrifugada a 12.000 rpm por 3 minutos. Transferiu-se novamente o sobrenadante para outro tubo limpo, misturou-se a 600 µL de etanol (a -20 °C), colocou-se no congelador até o dia seguinte e centrifugou-se a 12.000 rpm por 3 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se ao sedimento 1 mL de etanol 70%. Após 10 minutos centrifugou-se a 12.000 rpm por 3 minutos e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 1 mL de etanol (95%) e após repouso por 3 minutos, centrifugou-se a 12.000 rpm por cinco minutos; descartou-se o sobrenadante e secou-se o sedimento com o tubo invertido sobre um papel autoclavado por aproximadamente 30 min. O sedimento foi dissolvido em 50 µL de tampão TE e conservado em geladeira para posterior quantificação. A estimativa de quantificação foi realizada em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta.

Os *primers* descritos por White *et al.* (1990) para a região *Its-1* e 2 do rDNA, as reações foram usadas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 2,5 minutos, seguida de 40 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 94 °C, 30 segundos de anelamento a 58 °C e 1,5 minutos de extensão a 72 °C, e concluindo-se com 10 minutos de extensão final a 72 °C (Souza, 2006). Os componentes da PCR e suas concentrações são apresentados na tabela 2. O produto da PCR foi conferido por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta. A purificação foi realizada através do kit *Accuprep® PCR Purification Kit* (Bioneer corporation).

As amostras foram sequenciadas utilizando os *primers* das regiões *Its-1* e *Its-2* e seus complementares. Para as reações de sequenciamento (PCR) foram utilizados 2,0 µL do produto da reação, 2,0 µL de *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for Mega BACE* (Amersham Biosystems), e 10 pmol de cada iniciador senso e anti-senso. Os produtos das reações de sequenciamento foram lidos por sequenciador automático nos dois sentidos de leitura. As sequências das fitas complementares foram comparadas entre si e submetidas ao programa BLASTn para comparação com outras depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para identificação das espécies conforme a similaridade genética.

**Tabela 2.** Componentes (PCR), suas concentrações e quantidades.

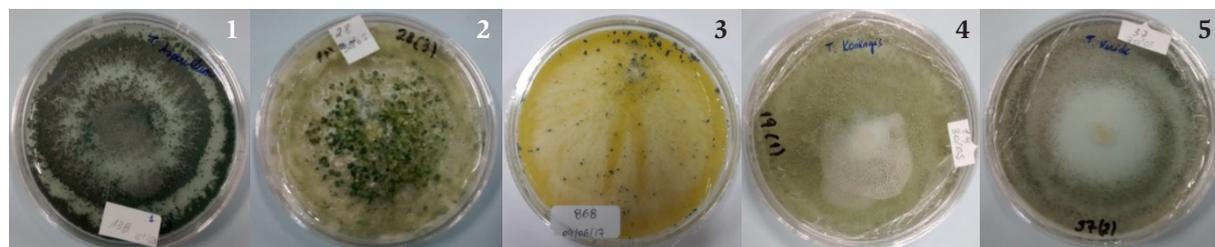
Reagentes	Concentrações	Quantidades µL
Água Mili-Q	-	10,2
Tampão	10x	2,5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3,0
dNTP	1,25 mM	3,0
<i>Primer Its1</i> (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)	10 pMol	2,0
<i>Primer Its4</i> (TCCTCCGCTTATGATATGC)	10 pMol	2,0
Taq polimerase	5,0 U	0,3
DNA	-	2,0
Total	-	25

## Resultados e Discussão

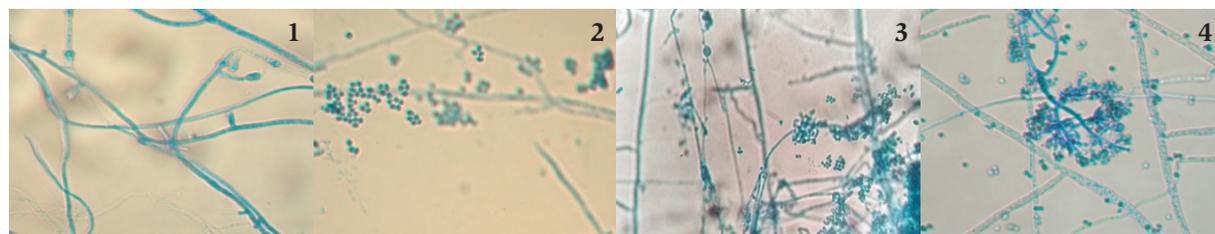
Os fungos agrupados pelas similaridades macro e micromorfológicas constituíram 5 grupos (Tabela 3 e Figuras 1 e 2).

**Tabela 3.** Grupos de linhagens de *Trichoderma* isoladas de ambiente tropical, no Brasil.

Grupo	Nº fungos	Características morfológicas
1	140/136/138/145	Esporos verdes (estriados) dorso branco
2	28/42/51/54/55/60/69/70/73/88/26 1/264/267/269/364/531	Características distintas, dorso marrom, maioria com esporos verdes
3	219/220/221/234/867/868	Cotonoso amarelo ou verde, com esporos verdes centrais, dorso amarelado
4	19	Esporos verdes pequenos e rasteiros, dorso branco
5	37	Esporos verdes rasteiros, dorso branco



**Figuras 1.** Estruturas macromorfológicas dos fungos do grupo 1 - 5 (Tabela 3).



**Figuras 2.** Estruturas micromorfológicas (200x) dos fungos 28, 868, 19 e 138, representantes dos grupos 1-4 (Tabela 3).

As médias diárias de crescimento radial das triplicatas dos fungos e as identificações das espécies de *Trichoderma*, com base nos fragmentos *Its1*, *5,8S* e *Its2* do rDNA, encontram-se na (Tabela 4).

Os resultados dos agrupamentos pela análise macromorfológica foram ratificados pela identificação molecular que confirmou, não apenas o gênero, como também mostrou que cada grupo é constituído por linhagens da mesma espécie. As estruturas micromorfológicas também foram coerentes em relação ao reconhecimento gênero quando comparadas a trabalhos anteriores de *Trichoderma* sobre as estruturas de reprodução de cada espécie (Jaklitch *et al.*, 2015; Samuels *et al.*, 1999; Bisset *et al.*, 2003; Bisset, 1992).

Os resultados da análise morfométrica apontaram para um rápido crescimento das linhagens, de modo que em 24h os micélios atingiram diâmetros médios entre 3,2 e 5,4 cm. Oito isolados atingiram toda a extensão da placa de Petri em 48 h e produziram conídios em 72 h. Em 96 h, as linhagens restantes atingiram à borda da placa e doze culturas iniciaram a produção de pigmentos difusos. Não foi possível distinguir as linhagens com base apenas nas análises morfométricas.

As linhagens identificadas por análise molecular resultaram em 58,62% de *T. harzianum*, 13,79% de *T. asperellum*, 20,68% de *T. atroviride* e 3,44% tanto de *T. viride*, como de *T. koningii*.

**Tabela 4.** Médias diárias de crescimento radial e identificação molecular de linhagens de *Trichoderma*.

Nº registro da cultura	Média/cm 24h	Média/cm 48h	Média/cm 72h	Média/cm 96h	Identificação Molecular*	Grupo Morfológico
19	3,2	7,0	8,5	8,5	<i>T. koningii</i> 99%	4
28	4,6	8,5	8,5	8,5	<i>T. harzianum</i> 99%	2
37	3,5	6,5	8,5	8,5	<i>T. viride</i> 98%	5
42	3,7	7,0	8,5	8,5	<i>T. harzianum</i> 95%	2
51	4,1	8,5	8,5	8,5	<i>T. harzianum</i> 97%	2
54	4,2	8,1	8,5	8,5	<i>T. harzianum</i> 99%	2
55	4,7	8,5	8,5	8,5	<i>T. harzianum</i> 99%	2
60	4,3	8,2	8,5	8,5	<i>T. harzianum</i> 99%	2
69	no	3,4	7,1	8,5	<i>T. harzianum</i> 90%	2
70	no	3,2	6,8	8,5	<i>T. harzianum</i> 97%	2
73	4,5	8,5	8,5	8,5	<i>T. harzianum</i> 98%	2
88	4,2	8,1	8,5	8,5	<i>T. harzianum</i> 99%	2
136	3,7	7,4	8,5	8,5	<i>T. asperellum</i> 99%	1
138	3,5	6,8	7,2	8,5	<i>T. asperellum</i> 92%	1
140	3,7	6,4	8,2	8,5	<i>T. asperellum</i> 95%	1
145	4,0	7,8	8,5	8,5	<i>T. asperellum</i> 97%	1
219	4,1	7,8	8,5	8,5	<i>T. atroviride</i> 99%	3
220	3,9	7,8	8,5	8,5	<i>T. atroviride</i> 99%	3
221	3,7	8,3	8,5	8,5	<i>T. atroviride</i> 99%	3
234	4,2	7,8	8,5	8,5	<i>T. atroviride</i> 99%	3
261	4,9	8,5	8,5	8,5	<i>T. harzianum</i> 99%	2
264	3,7	8,3	8,5	8,5	<i>T. harzianum</i> 99%	2
265	4,8	8,5	8,5	8,5	<i>T. harzianum</i> 99%	2
267	5,3	8,5	8,5	8,5	<i>T. harzianum</i> 99%	2
269	4,1	8,5	8,5	8,5	<i>T. harzianum</i> 99%	2
364	3,8	7,2	8,5	8,5	<i>T. harzianum</i> 99%	2
531	3,7	8,0	8,5	8,5	<i>T. harzianum</i> 99%	2
867	5,3	7,9	8,5	8,5	<i>T. atroviride</i> 99%	3
868	5,4	8,0	8,5	8,5	<i>T. atroviride</i> 99%	3

\*Identificação com base nos fragmentos *Its1*, *5,8S* e *Its2* do rDNA das linhagens. no = não observado.

## Conclusões

Estes resultados confirmam a robustez da análise macromorfológica empregada, agrupando corretamente os vinte e nove isolados de *Trichoderma* em cinco grupos que foram confirmados e identificados como espécies através de análises moleculares, conferindo a importância da complementação das técnicas apresentadas. Destacam-se pela sua representatividade as linhagens de *T. harzianum* com 58,62% de todas as cepas de *Trichoderma* depositadas na Coleção do Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia - LABMICRA-UFAM

## Agradecimentos

Projeto Pró-Amazônia - (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e à Central de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas (UFAM - CAM).

## Referências

- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M 1996. *Introductory Mycology*. 4.ed. New York: John Wiley e Sons, Inc, 869p.
- Atanasova L, Druzhinina IS, Jaklitsch WM 2013a. Two hundred *Trichoderma* species recognized based on molecular phylogeny. In: *Trichoderma: Biology and Applications*. (Eds.), Mukherjee, P.K., Sigh, U.S., Horwitz B.A., Schmol, M., Mukherjee, M., UK: CABI of Nosworthy Way. Wallingford, Oxon.
- Atanasova L, Le Crom S, Gruber S, Couplier F, Seidl-Seiboth V, Kubicek CP, Druzhinina IS 2013b. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma mycoparasitism*. *BMC Genomics*, 14:121.
- Bisset J 1992. *Trichoderma atriviride*. *Can. J. Bot.*, 70:639-641.
- Bisset J, Szakacs G, Nollan CA, Druzhinina I, Grandinger C, Kubicek CP 2003. New species of *Trichoderma* from Asia. *Can. J. Bot.*, 81:570-586.
- Blumenthal CZ 2004. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Reg. Toxicol. and Pharmacol*, 39:214-228.
- Castellani A 1939. A viability of some pathogenic in fungi in distilled water. *J. Trop. Med. Hyg*, 42:225-226.
- Guarro J, Gené J, Stchigel M 1999. Developments in Fungal Taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12:454-500.
- Holzlechner M, Reitschmidt S, Gruber S, Zeilinger S, Marchetti-Deschmann M 2016. Visualizing fungal metabolites during mycoparasitic interaction by MALDI mass spectrometry imaging. *Proteomics*. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.20150051>.
- Howell CR 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Dis*, 87:4-10.
- Jaklitsch WM, Voglmayr H 2015. Biodiversity of *Trichoderma (Hypocreaceae)* in Southern Europe and Macaronesia. *Study in Micology*, 80:1-87.
- Juhász T, Szengyel Z, Szijártó N, Réczey K 2004. Effect of pH on cellulose production of *Trichoderma reesei* RUT C30. *Appl. Biochem. and Biotechnol*, 113(116):201-211.
- Kubicek CP, Herrera-Estrella A, Seidl-Seiboth V, Martinez DA, Druzhinina IS, Thon M, Zeilinger S, Casas-Flores S, Horwitz BA, Mukherjee PK, Mukherjee M Kréddics L, Alcaraz Id, Aerts A, et al 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Bio*, 12:40.
- Kóvacs K, Szakacs G, Zacchi G 2009b. Comparative enzymatic hydrolysis of pretreated spruce by supernatants, whole fermentation broths and washed mycelia of *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride*. *Biores. Technol*, 100:1350-1357.
- Kóvacs K, Macreli S, Szakacs, G, Zacchi G 2009a. Enzymatic hydrolysis of steam- pretreated lignocellulosic materials with *Trichoderma atroviride* enzymes produced in-house. *Biotechnology for Biofuels*, 2(1): 1-14.
- Mello LS 2009. Identificação molecular e produção de enzimas celulolíticas por *Trichoderma* spp. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 47p.
- Samuels GJ, Lieckfeldt E, Nirenberg HI 1999. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *T. viride*. *Sydowia*, 51(1):71-88.
- Silva LAO 2006. Produção, purificação e caracterização das xilanases de *Trichoderma inhamatum*. Tese (doutorado em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo. 130p.
- Souza AQL, Souza AFDL, Astolfi Filho S, Pinheiro MLB, Sarquis MIM, Pereira, JO 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazonica*, 34(2):185-195.
- Souza AQL 2006. *Potencial genético e químico dos endófitos de Murraya paniculata* L. (Jack). Tese (doutorado em Ciências Biológicas), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 143F.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, MA, Gelfand, JJ, Sninsky, TJ, White (Eds.) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, 322p.

## Macrofungos do gênero *Lentinus* Fr. e *Panus* Fr. (*Polyporaceae* Fr.) da Região Amazônica

Jaqueline Ferreira Gomes<sup>1</sup>, Maria Aparecida de Jesus<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Bolsista PIBIC/FAPEAM-AM, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

<sup>2</sup> Pesquisadora, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Emails: gomes27jaqueline@gmail.com, ranna@inpa.gov.br

### Resumo

*Lentinus* Fr. e *Panus* Fr. são gêneros que apresentam características taxonômicas muito semelhantes, sendo somente possível separá-los através de análises microscópicas. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo identificar e separar as espécies depositadas na Coleção de Fungos Lignocelulolíticos - CFL/COTEI/INPA. Foram identificados dezoito espécimes pertencentes aos gêneros *Lentinus* sendo eles: *L. bertierii* (Fr.) Fr.; *L. fasciatus* Berk.; *L. lamelliporus* Har. & Pat.; *L. scleroporus* (Pers.) Fr.; *L. nigro-osseus* Pilát; *L. umbrinus* Reichardt; *L. striatulus* Lév.; *L. stuppeus* Klotzsch; *L. swartzii* Berk. e que *L. bertierii* teve maior ocorrência. Do acervo, seis espécimes pertencem ao gênero *Panus* *P. parvus*; *P. guaraniticus* e *P. tephroleucus*, sendo o último de maior ocorrência. Os espécimes de *Lentinus* têm preferência pelo substrato de galho caído, enquanto que *Panus* em tronco em decomposição. Dessa maneira o presente trabalho contribuiu com o enriquecimento das espécies que pertencentes a *Lentinus* e a *Panus* na região Amazônica.

**Palavras-chaves:** Macrofungo, Taxonomia, Lignocelulolítico.

### Introdução

A família *Polyporaceae* pertence a ordem Polyporales, classe Agaricomycetes e filo Basidiomycota. Os macrofungos são popularmente conhecidos como cogumelos, orelha de pau ou urupê (Kirk *et al.* 2001). Os representantes da família crescem em madeira morta, em solo e folheto, degradando restos animais e vegetais (Donk, 1964). Portanto são de fundamental importância na decomposição e ciclagem da matéria orgânica. Alguns são fitopatogênicos (Stalpers e Loerakker, 1982) e outros ectomicorrizicos. Além da importância biológica, os macrofungos (*Polyporaceae*) têm recebido especial atenção nas duas últimas décadas, devido ao seu potencial de aplicabilidade no tratamento de contaminantes ambientais, agindo como biorremediadores do solo e pela produção de antibióticos (Schmit e Mueller, 2007). Algumas espécies são comestíveis como, por exemplo, *Lentinus strigosus* Fr. (Andrade e Campos, 2011).

Os principais gêneros em *Polyporaceae* são: *Trametes*, *Hexagona*, *Coriolopsis*, *Rigidoporus*, *Polyporus*, *Lentinus* e *Panus*. Os dois últimos se diferenciam dos demais pelos basidiomas agaricóides, isto é, píleos infundibuliformes a ciatiformes, estipitados, com himenóforo lamelar (Souza, 2015). *Lentinus* Fr. é caracterizado por apresentar tramas radiais, descendentes ou intermediárias com hifas esqueleto - ligadoras e hifas “pegs” diferente de *Panus* Fr., com hifas esqueléticas sem a presença de hifas “pegs” (Senthilarasu, 2015). As espécies de ambos os gêneros são degradadoras de lignina, causando a podridão branca na madeira (Corner, 1981).

Atualmente, o cultivo desses macrofungos é considerado atividade de grande importância econômica, pois contém vários compostos ativos como polissacarídeos, glicoproteínas, propriedades antioxidantes e antibióticas, com possíveis aplicações medicinais, como por exemplo, *L. strigosus* Fr. que inibe a enzima tripanotona redutase de *Trypanosoma cruzi*. Também, há relato de isolamento de quatro substâncias: neopanepoxidol, 6,7-epóxi-4(15) -hirsuteno-1,5-diol, hipnofilina e panepoxidona, que apresentaram atividade citotóxica para três linhagens tumorais humanas (Cota, 2007).

Pesquisas relacionadas aos gêneros *Lentinus* e *Panus* na região Amazônica são escassas, no sentido de contribuir com o conhecimento destes gêneros, o projeto teve como objetivo identificar e separar os espécimes depositados na Coleção de Fungos Lignocelulolíticos - CFL/COTEI/INPA e atualizar as informações sobre as culturas dos mesmos depositados na Coleção Microbiológica - INPA.

## Material e Métodos

Os exemplares de *Lentinus* Fr. e *Panus* Fr. depositados na Coleção de Fungos Lignocelulolíticos - CFL/COTEI/INPA, foram provenientes de diferentes áreas da região Amazônica, tais como: Campus do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, Museu da Amazônia-MUSA, Reserva Florestal Adolpho Ducke, Estação Experimental de Silvicultura Tropical ZF2-INPA, Estação Ecológica de Maracá, Estação Ecológica de Uatumã e Parque Nacional do Viruá. Os espécimes depositados na Coleção de Fungos Lignocelulolíticos de *Lentinus* e *Panus* foram coletados em diferentes substratos lignocelulolíticos tais como: galho caído e tronco caído.

Para a análise macromorfológica foram feitas medições com o auxílio de uma fita métrica e anotações quanto a medida do comprimento, largura e espessura do basidioma, além do formato, cor, presença ou ausência de pelo no basidioma. Para a observação microscópica, foram feitos cortes à mão livre das superfícies himenial, do contexto e da superfície himenial com auxílio de estiletos e lâminas de aço e um estereomicroscópio binocular. Em seguida, os cortes foram colocados entre lâmina e lamínula em solução de hidróxido de potássio 3% (Ryvarden e Johansen 1980). As estruturas microscópicas foram observadas com auxílio de um microscópio óptico e suas estruturas foram mensuradas e analisadas, tais como: tipo dos esporos, presença ou ausência de estruturas de ornamentação, tipo de hifas e presença ou ausência de hifas “pegs”. A identificação dos espécimes de *Lentinus* e *Panus* foi feita com base na literatura especializada para cada gênero, Souza (2015), assim como revisões de espécies sul-americanas e brasileiras descritas por Corner (1981); Pegler (1983); Senthilarasu (2015) e Drechsler-Santos *et al.* (2012) e nas informações disponíveis no site <http://www.mycobank.com> e <http://www.indexfungorum.org>.

Todos os dados de coleta do fungo, como nome do coletor, substrato, local e data de coleta foram informatizados de acordo com o programa BRAHMS (Botanical Research and Herbarium Management System) adotado pelo Herbário do INPA.

## Resultados e Discussão

Um total de sessenta e nove espécimes faz parte do acervo de Fungos Lignocelulolíticos COTEI - INPA destes, vinte e quatro espécimes foram analisados e, dezoito pertencem ao gênero *Lentinus* Fr. e seis ao gênero *Panus* Fr.

Apesar das características microscópicas serem muito importantes para separação dos gêneros, a descrição das espécies consta abaixo.

### *Lentinus* Fr. 1825.

É caracterizado por apresentar hifas esqueleto-ligadora, medas e não apresentar gloecistídios.

### *Lentinus bertieri* (Fr.) Fr., Syst. Orb. Veg. (Lundae) 1: 77. 1825.

Basidioma de cor amarelo a amarelo mármore. Píleo infundibuliforme, centro glabro mais escuro que a margem, esta vilosa e involuta (Fig.2. A). Lamela decurrente, denticulada, amarelo mais clara que o píleo, com a presença de lamélulas e anastomose (Fig.2. A'). Estipe central, com pelos na base, menor que o píleo. Contexto hialino em KOH apresentando sistema hifal dimítico com hifas generativas hialina de parede fina, 2-5 µm diam.; e hifas esqueleto-ligadora hialino, 3-5 µm diam. (Tabela 2). Basidiósporos hialino, cilíndrico de parede fina medindo de 3-4 x 6-9 µm (Fig.2. a). É caracterizada por possuir estipe menor que o píleo e lamelas com anastomose. Drechsler-Santos *et al.*, (2012) descreve o primeiro registro da espécie para a região nordeste do Brasil caracterizando a presença de muitas medas. Espécies encontradas em galhos caídos.

**Material examinado:** Brasil. Amazonas: Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas (12112); Autazes-AM, Estrada do Rosarinho (12011); Ramal do Pau Rosa, BR-174 (12185); Campinarana, BR-174 (12433).

**Distribuição geográfica:** Região tropical (Pegler, 1983b). Há registro para Bahia, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina e Cerrado (Drechsler-Santos *et al.*, 2012).

***Lentinus swartzii*** Berk. 1843.

É espécie similar a *L. bertieri* apresentando basidiósporos 3-4,5 x 5-9 µm e hifas esqueleto-ligativa 3-5 µm. No entanto, diferencia-se pela cor do basidioma, tamanho do estipe e a cor das lamelas que geralmente é mais escura (Fig. 2.F, F'), encontrado em galho caído.

**Material examinado:** Brasil. Amazonas: Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas (12115; 12182) e Parque Nacional do Viruá (12108).

***Lentinus nigro-osseus*** Pilát 1936.

É semelhante a *L. bertieri* pois, seu basidioma apresenta cor amarelo a amarelo queimado, estipe com pelos fulvus e píleo involuto. Porém, o que diferencia é o tamanho do basidioma (Fig. 2.D e D'), as hifas esqueleto-ligadora e o tamanho das medas 20-35 x 29-43 µm (Tabela 1). Sendo encontrado em galho caído.

**Material examinado:** Brasil. Amazonas: Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas (12109).

***Lentinus umbrinus*** Reichardt 1866.

Apresenta características similares com as de *L. bertieri* visto que, a cor do basidioma é amarelo a amarelo-vermelho, pouco involuto e o estipe com pelos vilosos. Mas se difere pelo píleo depressor, lamelas separadas e estipe grosso na base. Foi encontrado em tronco em decomposição.

**Material examinado:** Brasil. Amazonas: Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas (12110) e Estação Experimental de Silvicultura Tropical (10999).

***Lentinus lamelliporus*** Har. & Pat. 1902.

O basidioma apresenta características macroscópicas semelhantes aos demais. Contudo, se difere de *L. bertieri* por possuir o píleo depressor margem pouco involuta (Fig. 2 B), lamelas separadas (Fig. 2 B) e basidiósporos (3-4, x 4-7 µm) menores. Encontrado em árvore em decomposição.

**Material examinado:** Brasil. Amazonas: Parque Nacional do Viruá (7097).

***Lentinus scleropus*** (Pers.) Fr. 1836.

Apresenta basidioma com características de *L. bertieri*, diferencia na cor amarelo terra e estipe curto e píleo grande, ciatiforme, velutino, tomentoso; (Fig. 2 C) lamelas separadas mais escuras que o píleo (Fig. 2 C'). encontrado em tronco em decomposição.

**Material examinado:** Brasil. Amazonas: Manaus.

***Lentinus fasciatus*** Berk. 1840.

É similar a *L. bertieri* pois ambos são encontrados em galho caído, apresenta lamelas de cor amarela clara e juntas (Fig. 2 G'). Diferenciam-se de *L. fasciatus* pelo basidioma de cor marrom escuro, píleo e estipe velutinado (Fig. 2 G G'). *L. fasciatus* foi encontrado tanto em galho caído quanto em tronco em decomposição.

**Material examinado:** Brasil. Amazonas: Estação Experimental de Silvicultura Tropical (11104), Museu da Amazônia (1283), Parque Nacional do Viruá (12107).

***Lentinus striatulus*** Lév. 1846.

É semelhante a *L. bertieri* pelo basidioma de cor amarelo a amarelo queimado. Porém se diferencia por apresentar o píleo glabro e involuto; lamelas sem anastomose e estipe curto e grosso. Encontrado em tronco em decomposição.

**Material examinado:** Brasil. Amazonas: Estação Experimental de Silvicultura Tropical (7700).

***Lentinus stuppeus*** Klotzsch 1833.

É semelhante *L. bertieri* por apresentar basidioma com pelos fulvos e o píleo ser pequeno, no entanto, o basidioma é marrom escuro, com esquâmulas amarela; as lamelas da mesma cor do píleo e o estipe curto. Ocorre em galho caído.

**Material examinado:** Brasil. Amazonas: Parque Nacional do Viruá (12105) e Manaus (8318).

***Panus*** Fr. 1838.

É caracterizado por possuir hifas esquelética, cistídios e não possuir medas.

***Panus parvus*** Drechsler-Santos & Wartchow 2012.

É caracterizado por apresentar basidioma de cor creme a amarelo. Píleo com pelos hispido com esquâmulas, margem com poucos pelos, cor amarelo-queimado escurecendo para o centro do píleo, sem anastomose, pouco involuto (Fig. 2 H). Lamelas de cor semelhante à do píleo, decorrentes e onduladas (Fig. 2 H'). Estipe com pelos hispido, central e pouco curvado. Contexto fino e hialino em KOH, sistema hifal dimitico com hifas generativas hialina de parede fina, 2-5 µm diam.; e hifas esquelética hialina, de parede grossa, 3-5 µm diam. (Tabela 2). Basidiósporos hialino, cilíndrico a ovoide de parede fina medindo de 3-4,5 (-5) x 5-7,5 µm. Encontrado em tronco em decomposição.

**Material examinado:** Brasil. Amazonas: Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas (12111).

***Panus guaraniticus*** Berk. 1930.

É muito semelhante a *P. parvus*, ambos ocorrem em tronco em decomposição, apresentam basidioma de cor creme a amarelo; lamelas onduladas, mais claras que o píleo (Fig. 2 I, I') e estipe central, velutino, cor semelhante ao píleo. Porém *P. guaraniticus* se diferencia por apresentar píleo velutino com pequenas esquâmulas e cistídios maiores (9-15 µm). sendo encontrado em tronco em decomposição.

**Material examinado:** Brasil. Amazonas: Manaus (12099; 12101).

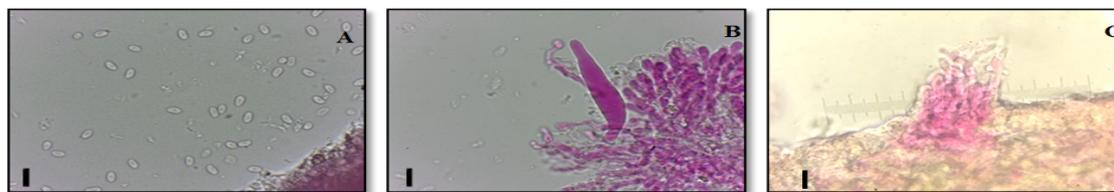
***Panus tephroleucus*** (Mont.) T.W. May & A.E. Wood 1995.

É similar a *P. parvus* por apresentar píleo pequeno e hifas generativas (3-4 µm diam). Porém se diferencia por possuir basidioma de cor marrom escuro; píleo velutino (Fig. 2 J); lamelas escuras; estipe fino e longo (Fig. 2 J'). Basidiósporos maiores (4-5 x 6-9 µm). Ocorre tanto em galho caído quanto em tronco em decomposição.

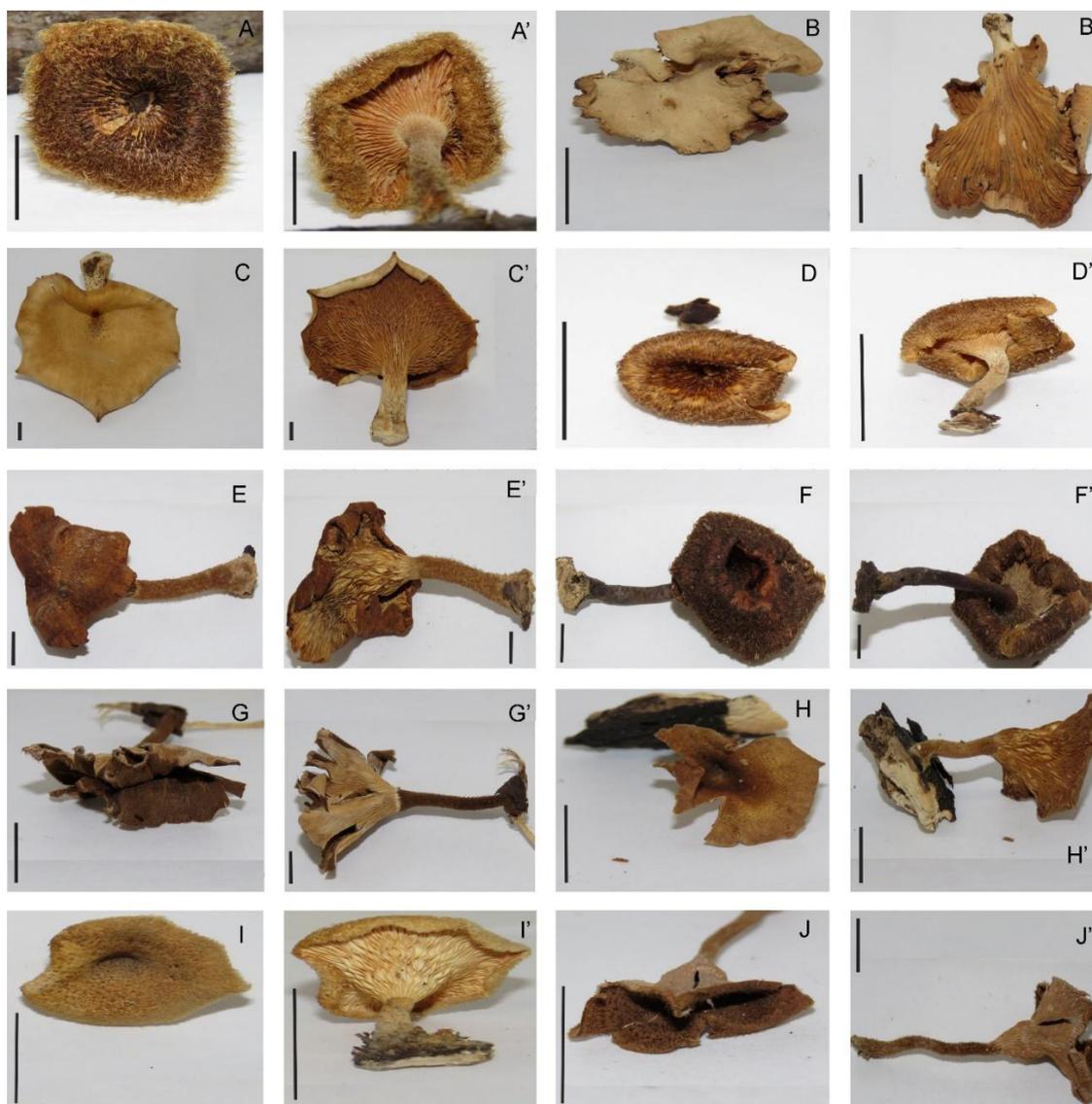
**Material examinado:** Brasil. Amazonas: Estação Ecológica de Maracá (4247; 4384) e Estação Experimental de Silvicultura Tropical (12326).

Nota-se que apesar das características macroscópicas dos basidiomas de *Lentinus* e *Panus* serem diferentes, não apresentam caracteres taxonômicos que permitem a diferenciação entre os gêneros (Figura

2), os quais são diferenciados pelas características microscópicas (Figura 1). Por exemplo, o gênero *Panus* Fr. se diferencia de *Lentinus* Fr. por não apresentar medas (Figura 1 C) e possuir gloecístidios (Figura 1 B) e hifas esqueletais, enquanto que *Lentinus* Fr. apresenta medas e hifas esqueletos-ligadoras.



**Figura 1.** Estruturas microscópicas que diferenciam os gêneros *Lentinus* e *Panus*. A esporos; B gloecístidios; C medas. Barra = 10 µm.



**Figura 2.** Superfície pilial e himenial dos diferentes basidiomas de *Lentinus* e *Panus*. A, A' *L. berteroi* 12433.; B, B' *L. lamelliporus* 7097; C, C' *L. scleropus* 5865; D, D' *L. nigro-osseus* 12109; E, E' *L. umbrinus* 12110; F, F' *L. swartzii* 12182; G, G' *L. fasciatus* 12107; H, H' *P. parvus* 12111; I, I' *P. guaraniticus* 12101; J, J' *P. tephroleucus* 12326. Barra = 1 cm

Quanto às espécies, estas são diferenciadas pelo tamanho do esporo e das hifas generativas, como por exemplo *L. lamelliporus* possui os esporos menores que os de *L. nigro-osseus*. Além disso, as medidas das hifas generativas de *L. bertieri* são maiores em relação ao das hifas generativas de *L. scleropus*. Por outro lado, os esporos de *P. parvus* são menores que os de *P. fasciatus* e as hifas generativas de *P. fasciatus* são menores que as hifas generativas de *P. guaraniticus*.

As características macroscópicas que diferenciam as espécies como tamanho do píleo, estipe, cor, presença ou ausência de pelos constam na Figura.2.

A relação dos locais de ocorrência e dos substratos em que os macrofungos foram coletados consta na Tabela 1. Nota-se que os macrofungos *Lentinus* ocorrem mais em galhos caídos, enquanto que os de *Panus* em tronco em decomposição. A maioria das espécies de *Lentinus* é do Campus do INPA, Manaus, provavelmente, pelo fato do maior esforço amostral no campus e de fácil acesso.

**Tabela 1.** Substrato em que os macrofungos *Lentinus* e *Panus* foram coletados em diferentes locais na região Amazônica.

Táxon	Nº de Registro no acervo	Local	Substrato			Total
			T. D	G. C	A. D	
<i>Lentinus</i>						
<i>L. bertieri</i>	12011; 12112; 12185; 12433	INPA / AUT / MAN		4		4
<i>L. fasciatus</i>	11104; 12107; 12183	MUSA / PNV	2	1		3
<i>L. lamelliporus</i>	7097	PNV			1	1
<i>L. scleropus</i>	5865	MAN	1			1
<i>L. nigro-osseus</i>	12109	INPA		1		1
<i>L. umbrinus</i>	10999; 12110	INPA / EEST	2			2
<i>L. striatulus</i>	7700	EEST	1			1
<i>L. stuppeus</i>	8318; 12105	PNV		2		2
<i>L. swartzii</i>	12108; 12115; 12182.	INPA / PNV		3		3
Subtotal			6	11	1	18
<i>Panus</i>						
<i>P. parvus</i>	12111	INPA	1			1
<i>P. guaraniticus</i>	12099; 12101	MAN	2			2
<i>P. tephroleucus</i>	4247; 4384; 12326.	EEST / EEM	1	2		3
Subtotal			4	2		6
Total			10	13	1	24

Legenda: **PNV** = Parque Nacional do Viruá; **INPA** = Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas; **MUSA** = Museu da Amazônia; **EEM** = Estação Ecológica de Maracá; **EEST** = Estação Experimental de Silvicultura Tropical; **AUT** = Autazes - AM; **MAN** = Manaus - AM. Substrato: **TD** = tronco em decomposição; **GC** = galho caído; **AD** = árvore em decomposição

## Conclusão

A maioria das espécies de *Lentinus* foi coletada nas áreas dos Campus- INPA, enquanto que as de *Panus* em diferentes locais da cidade de Manaus e na Estação Ecológica de Maracá. Os espécimes de *Lentinus* demonstram preferência por galho caído enquanto *Panus* por tronco em decomposição. O número de espécies de *Lentinus* é maior do que a de *Panus*. A identificação dos macrofungos *Lentinus* e *Panus* depositados na Coleção de Fungos Lignocelulolíticos - CFL/COTEI/INPA, contribui com enriquecimento de espécies para a região Amazônica.

## Agradecimentos

A FAPEAM pela bolsa concedida pelo apoio financeiro, ao INPA pela infraestrutura

## Referências bibliográficas

- Andrade MCN, Campos, CS 2011. Aproveitamento de resíduos madeireiros para o cultivo do cogumelo comestível *Lentinus strigosus* de ocorrência na Amazônia. *Acta Amazônica*, 41: 1 – 8.
- Corner EJH 1981. The agaric genera *Lentinus*, *Panus* and *Pleurotus* with particular reference to Malaysian species. *Transactions of the British Mycological Society*, 79: 381 - 382.
- Cota BB 2007. *Busca de Substâncias Antitumorais e Tripanosomicidas: Estudo Químico de Lentinus Strigosus (Basidiomycota) e Habenaria Petalodes (Orquidaceae)*. Tese de Doutorado, Instituto René Rachou / Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais.150 p.
- Drechsler-Santos ER, Wartchow F, Coimbra VRM, Gibertoni TB, Cavalcanti MAQ 2012. Studies on lentinoid fungi (*Lentinus* and *Panus*) from the semiarid region of Brazil. *Journal of the Torrey Botanical Society*,139(4): 437–446.
- Donk MA 1964. A conspectus of the families of Aphyllophorales. *Persoonia*. Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi. 3: 199-324a.
- Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA 2001. Ainsworth & Bisby's *Dictionary of the Fungi*, ninth ed. CABI Publishing, Wallingford.
- Pegler DN 1983. *The genus Lentinus: A world monograph*. Kew Bull.Add. Ser.10.
- Ryvarden L, Johansen IA 1980. *Preliminary Flora of East Africa*. Oslo: Fungi Flora, 636p.
- Schmit JP, Mueller, GM 2007. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodiversity and Conservation*, 16: 99 – 111.
- Senthilarasu G 2015. The lentinoid fungi (*Lentinus* and *Panus*) from Western ghats, India. *IMA - International Mycological Association*. 6: 119 -128.
- Souza JF 2015. *Estudos Taxonômicos Em Fungos Lentinoides (Polyporaceae, Polyporales)*. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-Santa Catarina. 69f.
- Stalpers JA, Loerakker WM 1982. *Laetisaria* and *Limonomyces* species (Corticaceae) causing pink diseases in turf grasses National Research Council of Canada/Conseil national de recherches du Canada.

## Efeito de doses de potássio na incidência e na severidade da antracnose da ata (*Annona squamosa*)

Kedma da Silva Matos<sup>1</sup>, Raphael Henrique da Silva Siqueira<sup>2</sup>,  
Raiovane Araújo Montenegro<sup>3</sup>, Edvan Alves Chagas<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Professora da Universidade Federal de Roraima

<sup>2</sup> Professor do Instituto Federal do Amazonas

<sup>3</sup> Graduando do Curso de Agronomia, Universidade Federal de Roraima

<sup>4</sup> Pesquisador da Embrapa Roraima

Emails: kedma.matos@ufr.br, raphael\_manajosolo@hotmail.com

### Resumo

A ata tem despertado interesse de produtores no Brasil, porém as doenças causadas por fungos como a antracnose podem afetar sua produtividade. Assim, objetivou-se avaliar o efeito de doses de potássio na influência e severidade da antracnose na ata. O experimento foi conduzido no Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Roraima. Folhas de ateiras com sintomas de antracnose foram coletadas para o isolamento de fitopatógenos. O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema de parcelas subdivididas no tempo, aplicadas as doses de KCl: 0, 20, 40, 80 e 160 kg ha<sup>-1</sup>. Cada parcela composta por cinco plantas, totalizando 25 plantas. As plantas foram inoculadas com uma suspensão de 1,0 x 10<sup>6</sup> conídios mL de *Colletotrichum* sp.. As avaliações foram realizadas aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias após a inoculação. A incidência da doença foi avaliada pela contagem das plantas com sintomas de antracnose e a severidade por uma escala de notas. Foram obtidos dois isolados com características morfológicas de *Colletotrichum gloeosporioides* e um isolado com conídios curvados. A maior incidência da doença foi observada nas doses de 20, 40 e 160 kg ha<sup>-1</sup> de KCl. A severidade aumenta com maior tempo de inoculação do patógeno.

**Palavras-chave:** Fruta-do-conde, *Colletotrichum*, Nutrição mineral, Manejo.

### Introdução

A ata, fruta-do-conde ou pinha (*Annona squamosa* L.), pertence ao gênero *Annona* e família Annonaceae. A espécie é originária da América Tropical e tem despertado interesse de produtores e pesquisadores na Região da Amazônia Setentrional, apresentando crescente demanda o que prioriza essa frutífera em relação ao desenvolvimento tecnológico na produção de mudas e manejo visando garantir a formação de pomares uniformes e a produção de frutos de qualidade para produção de polpas ou para o consumo *in natura* (Cordeiro *et al.*, 2000).

Para viabilizar a implantação de pomares comerciais devem-se obter mudas de ata saudáveis e realizar manejo adequado para o controle de doenças. A antracnose, causada por espécies do gênero *Colletotrichum*, é uma das doenças mais comuns e importantes em frutíferas, ocasionando problemas em regiões tropicais e subtropicais. A doença afeta folhas, ramos e frutos, em diversas fases do desenvolvimento, afetando diretamente a produtividade e comercialização dos frutos (Kamei *et al.*, 2014; Amorim *et al.*, 2016). A antracnose é considerada uma das principais doenças da ata (Lopez, 2005). Entretanto, existem poucas informações da diversidade de espécies de *Colletotrichum* que podem causar a doença e os danos.

O uso de estratégias eficientes e seguras no controle da antracnose é fundamental para o cultivo e posterior comercialização das fruteiras nativas, destacando ainda o ponto de vista ambiental. O manejo nutricional pode auxiliar no controle de doenças devido uma melhoria da barreira fisiológica da planta (Tanaka *et al.*, 2008). A nutrição mineral pode influenciar o grau de resistência da planta em resposta à infecção por patógenos (Marschner, 1995; Polanco *et al.*, 2012).

O potássio (K) é um dos elementos que contribuem para a redução da incidência e severidade de doenças em várias culturas, inclusive a antracnose (Carvalho *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2017), porém não há relatos na literatura sobre a influência desse nutriente no controle da antracnose em ata, passível de exploração econômica no Estado de Roraima.

Objetivou-se avaliar o efeito de doses de potássio na incidência e na severidade da antracnose na ata.

## Material e Métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na área experimental localizada no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de Roraima (UFRR), Campus Cauamé, no município de Boa Vista - RR (20° 52' 20,7" N e 60° 42' 44,2" W e altitude de 90 m). A classificação climática segundo Köppen é do tipo Am (Alvares *et al.*, 2013), com duas estações bem definidas durante o ano, chuvosa de abril a setembro e seca de outubro a março, com temperatura média anual 26,7 °C, precipitação anual média de 1614 mm e umidade relativa do ar de 79% (Araújo *et al.*, 2001).

Folhas de ata com sintomas típicos de antracnose foram coletadas na área experimental do CCA e levadas para o Laboratório de Fitopatologia da UFRR para o isolamento de fitopatógenos. O isolamento foi realizado a partir de desinfestação superficial (etanol 70%, hipoclorito de sódio 2,5% e lavagem em água destilada) dos tecidos que, em seguida, foram transferidos para o meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) e incubados em BOD a 25 °C. As culturas com morfologia típica de *Colletotrichum* spp. foram transferidas para o meio BDA para obtenção das culturas monospóricas. A caracterização morfológica foi realizada com isolado monospórico que foi transferido para os meios de cultura BDA e Aveia-ágar, após 7 a 10 dias de incubação a 25 °C com fotoperíodo de 12 h. As medidas das estruturas morfológicas foram realizadas e comparadas com descrições disponíveis na literatura (Weir *et al.*, 2012).

Folhas destacadas de ata sem sintomas de antracnose foram inoculadas com uma suspensão de conídios ( $1,0 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>) dos três isolados de *Colletotrichum* sp., onde foi depositado 20 µm em cada um dos cinco furos/folha utilizando uma agulha estéril. Foram utilizadas três folhas por isolado e a testemunha inoculada com água estéril.

As mudas de ata foram adquiridas da Embrapa Roraima. O experimento em casa de vegetação foi em delineamento inteiramente casualizado em esquema de parcelas subdivididas no tempo, onde foram aplicadas as seguintes doses de KCl: T1 - 0; T2 - 20 kg ha<sup>-1</sup>; T3 - 40 kg ha<sup>-1</sup>; T4 - 80 kg ha<sup>-1</sup> e T5 - 160 kg ha<sup>-1</sup>. Cada parcela foi composta por cinco plantas, perfazendo um total de 25 plantas. As sementes foram semeadas em vasos de 6 dm<sup>3</sup> contendo o substrato composto percentualmente (v/v) de 50% de terra de superfície, 20% de Casca de Arroz Carbonizada (CAC) e 30% de substrato orgânico (Chagas *et al.*, 2013). As mudas foram mantidas a temperatura de 28 ± 1 °C e com irrigação realizada diariamente para manter a condição de umidade próxima a 60%.

Aos 120 dias após a semeadura, as plantas de cada parcela foram inoculadas com uma suspensão de conídios ( $1,0 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>) do isolado A7c (*Colletotrichum* sp.), sendo 15 mL da suspensão do inóculo borrifada nas folhas das plantas que foram submetidas à câmara úmida, durante 24 h em casa de vegetação.

Os tratamentos foram avaliados aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias após a inoculação do patógeno. A incidência da antracnose foi avaliada pela contagem das plantas com sintomas da doença nas parcelas e a severidade foi mensurada utilizando a escala de notas de acordo com Galli *et al.* (2009). Os dados coletados foram submetidos à análise de variância ( $p \leq 0,05$ ) e de regressão, empregando o software SISVAR versão 5.3 (Ferreira, 2010). Os gráficos foram confeccionados com a utilização do software SIGMAPLOT versão 12 (Systat Software, 2011).

## Resultados e Discussão

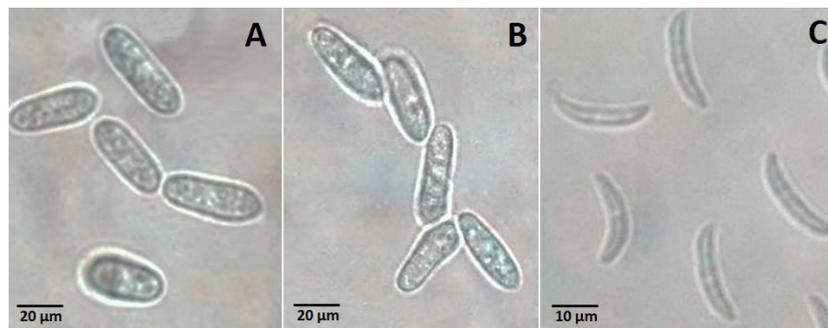
Foram obtidos três isolados de *Colletotrichum* sp. que formaram colônias variando da cor branca a cinza claro. Os isolados A1a e A7c apresentaram conídios retos, cilíndricos com as extremidades arredondadas,

hialinos, asseptados, medindo (n = 20) a média de 10 x 5,2  $\mu\text{m}$  e 9 x 5,5  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Figura 1 A e B). O isolado A7b apresentou conídios curvados com as extremidades afiladas, hialinos, asseptados, medindo (n = 20) a média de 12 x 4  $\mu\text{m}$  (Figura 1 C).

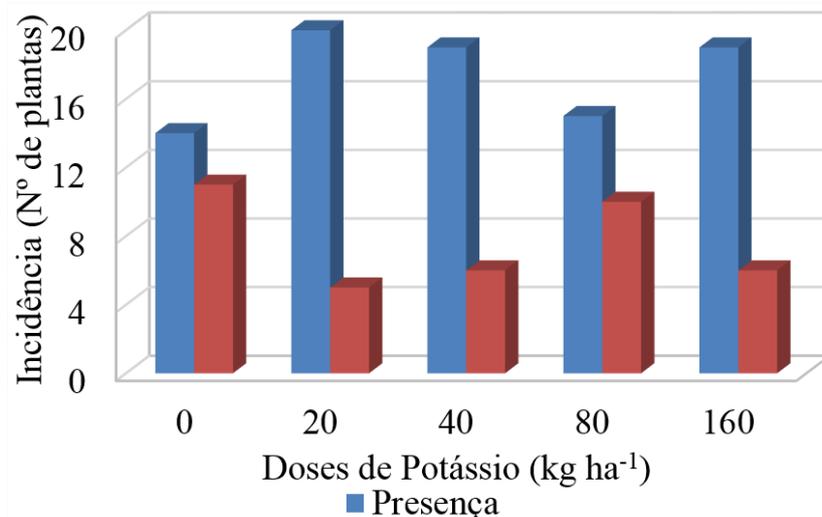
Algumas espécies de *Colletotrichum*, como *C. gloeosporioides*, *C. fragariae* e *C. fruticola* foram relatadas associadas à antracnose em anonáceas (Kamei *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2017). Dentre essas espécies, nenhuma apresenta conídio curvado. A identificação de *Colletotrichum* é tradicionalmente realizada com base na morfologia, no entanto, existe diversidade fenotípica e instabilidade dos caracteres em função do ambiente e das condições de cultivo (Cannon *et al.*, 2008; Weir *et al.*, 2012). Sendo assim, necessários estudos de filogenia molecular para identificar a nível de espécie e confirmar a verdadeira identidade do patógeno.

Todos os isolados de *Colletotrichum* sp. causaram sintomas nas folhas destacadas de ata após cinco dias de inoculação e o isolado A7c foi selecionado para a inoculação das plantas em casa de vegetação, pois apresentou maior severidade dos sintomas da doença. Os sintomas de antracnose nas mudas apareceram após sete dias da inoculação do patógeno. O isolado inoculado foi reisolado, comprovando ser o patógeno da antracnose e completando os postulados de Koch. Nenhum sintoma da doença foi observado nas plantas não inoculadas.

A maior incidência da doença foi observada nas doses de 20 kg ha<sup>-1</sup>, 40 kg ha<sup>-1</sup> e 160 kg ha<sup>-1</sup> de KCl (Figura 2).



**Figura 1.** Características morfológicas de *Colletotrichum* sp. isolados de sintomas de antracnose da ata (*Annona squamosa*). A = Conídios do isolado A1a, B = Conídios do isolado A7c e C = Conídios do isolado A7b.

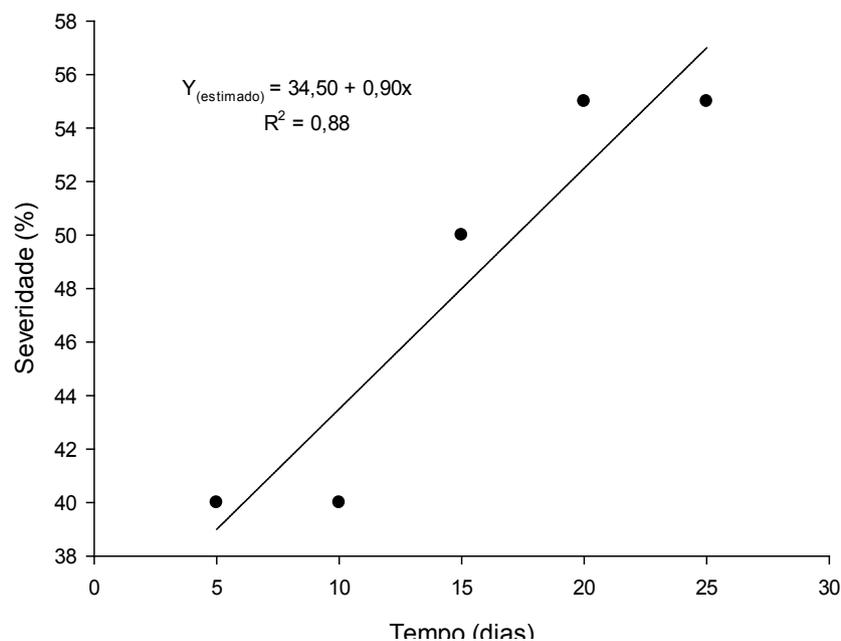


**Figura 2.** Incidência da antracnose em plantas de ata (*Annona squamosa*) em função de doses de potássio.

Diferenças significativas foram observadas entre as doses e o tempo, ambos com efeitos isolados. No entanto, nenhuma regressão se ajustou adequadamente às doses enquanto foi observado que a maior severidade foi com o maior tempo de inoculação do patógeno (Figura 3).

No presente estudo, doses mais elevadas de K não induziram resistência das plantas de ata. De acordo com Marschner (1995), o aumento nos níveis dos nutrientes, além do ótimo, não causa efeitos na resistência a doenças. Assim como observado por May-De-Mio *et al.* (2008) em que o excesso de K aumentou a incidência de podridão parda [*Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey] em ameixeira (*Prunus domestica* L.). No entanto, em alguns casos, o aumento de K pode reduzir a suscetibilidade a várias doenças (Huber e Thompson, 2007). No feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), a dose mais elevada de potássio na forma de KCl ( $180 \text{ kg ha}^{-1}$ ) foi a mais eficiente em reduzir a severidade da antracnose nas plantas (Lima *et al.*, 2017).

Segundo Pozza *et al.* (2001), o equilíbrio nutricional é fundamental para o controle de doenças, a falta ou o excesso de nutrientes pode aumentar ou diminuir a resistência das plantas ao ataque de patógenos. A nutrição mineral equilibrada em K aumenta a espessura da parede celular em células da epiderme e contribui na recuperação de tecidos que sofreram injúrias (Marschner, 1995; Wang *et al.*, 2013). A severidade da doença aumenta se não há nutrição balanceada que induz a resistência da planta, além disso, Carvalho *et al.* (2013) verificaram que a adubação potássica utilizada para o controle da antracnose do milho (*Zea mays* L.) tem diferentes respostas de resistência em função da variedade da planta.



**Figura 3.** Severidade da antracnose em plantas de ata (*Annona squamosa*) em função de doses de potássio.

## Conclusões

O isolado de *Colletotrichum* sp. que apresenta conídios curvados pode representar uma nova espécie que causa antracnose na ata.

As doses de potássio ocasionaram mudanças na incidência e severidade da antracnose em ata.

A severidade da doença é maior com o aumento do tempo de inoculação do patógeno.

## Agradecimentos

À Capes, CNPq e UFRR pelo fomento e estrutura para a realização da pesquisa.

## Referências

- Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA 2016. *Manual de fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas*. 5 Ed., v. 2. São Paulo: Ceres, p. 820.
- Alvares CA, Stape J, Sentelhas PC, Gonçalves JLM, Sparovek G 2013. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, 22(6):711 – 728.
- Araújo WF, Andrade Júnior AS, Medeiros RD, Sampaio RA 2001. Precipitação pluviométrica provável em Boa Vista, Brasil. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 5 (3): 563-567.
- Carvalho DO, Pozza EA, Casela CR, Costa RV, Pozza AAA, Carvalho CO 2013. Adubação nitrogenada e potássica na severidade da antracnose em dois cultivares de milho. *Revista Ceres*, 60(3):380-387.
- Cannon PF, Buddie AG, Bridge PD 2008. The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycotaxon*, 104:189-204.
- Chagas EA, Ribeiro MIG, Souza OM, Santos VA, Lozano RM 2013. Alternatives substrates for production of seedlings camu-camu. *Revista de Ciências Agrárias*, 56(Supl):5-12.
- Cordeiro MR, Pinto ACQ, Ramos VHV 2000. *O cultivo da Pinha, Fruta-do-conde ou Ata no Brasil*. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2000. 52 p.
- Costa JFO, Ramos-Sobrinho R, Chaves TP, Silva JRA, Pinho DB, Assunção IP, Lima GSA 2017. First Report of *Colletotrichum fruticola* Causing Anthracnose on *Annona* **Leaves in Brazil**. *Plant Disease*, 101(2):386.
- Ferreira DF. SISVAR 2010 *Sistema de análise de variância*. Versão 5.3. Lavras-MG: UFLA.
- Galli JA, Silveira LCP, Michelotto MD, Martins ALM 2009. Avaliação da incidência de antracnose, do desempenho e estado nutricional de variedades de mangueira, para cultivo orgânico, na região centro-norte do Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31(3):701-709.
- Huber DM, Thompson LA 2007. Nitrogen and plant disease. In: Datnoff LE, Elmer WH, Huber DM. (Eds.). *Mineral nutrition and plant disease*. Saint Paul: APS, 31-44.
- Kamei SH, Costa JFO, Netto MSB, Assunção IP, Lima GSA 2014. Identificação e caracterização de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose de anonáceas no estado de Alagoas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36:209-216.
- Lima WN, Alves AF, Gonçalves J, Deurimar H, da Silva FF, da Silva A, da Silva WA 2017. Potassium fertilization influence in anthracnose control in Common bean. *Publications from USDA-ARS / UNL Faculty*, 60:11-12.
- Lopez AMQ 2005. *Doenças das Anonáceas e do Uruçuzeiro*. In: Kimati, H. et al. (Eds.). Manual de fitopatologia. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2:73-77.
- Marschner H 1995. *Mineral nutrition of higher plant*. 2. ed. New York: Academy Pres, 889 p.
- May-De-Mio LL, Tutida I, Motta ACV, Dolinski MA, Serrati BM, Montegutti D 2008. Doses de aplicação de nitrogênio e potássio em relação à podridão parda e sarna em ameixeira 'Reubennel' na região de Araucária, Paraná. *Tropical Plant Pathology*, 33(1):35-40.
- Polanco LR, Rodrigues FA, Nascimento KJT, Shulman P, Silva LC, Neves FW, Vale FXR. 2012. Biochemical aspects of bean resistance to anthracnose mediated by silicon. *Annals of Applied Biology*, 161(2):140-150.
- Pozza AAA, Martinez HEP, Caixeta SL, Cardoso AA, Zambolim L, Pozza EA 2001. Influência da nutrição mineral na intensidade da mancha-de-olho-pardo em mudas de cafeeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36(1):53-60.
- SIGMAPLOT 2011. *Sigmaplot for Windows*, version 12. Systat softwar. SOFTWARE.
- Tanaka MAS, Freitas JG, Medina PF 2008. Incidência de doenças fúngicas e sanidade de sementes de trigo sob diferentes doses de nitrogênio e aplicação de fungicida. *Summa Phytopathologica*, 34(4):313-317.
- Wang L, Cai K, Chen Y. 2013. Silicon-Mediated Tomato Resistance Against *Ralstonia solanacearum* is Associated with Modification of Soil Microbial Community Structure and Activity. *Biological Trace Element Research*, 152(2):275-283.
- Weir BS, Johnston PR Damm U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*, 73(1):115-180.

## Crescimento de fungos do gênero *Trichoderma* spp. em contato com gasolina

Nadionara Costa Menezes<sup>1</sup>, Gabrielle Silva da Costa<sup>1</sup>, Francisco Wesen Moreira<sup>2</sup>, Luiz Antonio de Oliveira<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade do Estado do Amazonas

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Emails: nadionaracosta@gmail.com, gaabriellecosta@gmail.com, wesen@inpa.gov.br, luiz.oliveira@inpa.com

### Resumo

O impacto ecológico causado por petróleo e seus derivados vem sendo minimizado por diferentes técnicas de remediação, entre elas a biorremediação. A biorremediação usa microrganismos ou suas enzimas para destoxificar ambientes contaminados. Estudos realizados com fungos do gênero *Trichoderma* mostraram que apresentam a habilidade de usarem petróleo como fonte de carbono e, por em sua maioria não serem patogênicos a animais e plantas, apresentam potencial de uso na descontaminação de ambientes contaminados com esse produto e seus derivados. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de *Trichoderma* sp. em crescerem em meio contendo a gasolina como fonte de carbono. Para o isolamento dos fungos das amostras de solos, foi utilizada a técnica de diluição seriada até  $10^{-3}$ , em meio de cultura Basal utilizando glicose como fonte de carbono, e após seu crescimento, foram purificados em meio BDA. Com isso foi possível isolar 81 fungos, sendo que 16 pertencem ao gênero *Trichoderma*. Posteriormente, foi analisado o crescimento desses 16 fungos em meio INPA enriquecido com 0,1 mL de gasolina. A quantificação do crescimento se deu pelo peso da biomassa microbiana seca. Todas as 16 linhagens foram capazes de crescer em meio INPA acrescido de gasolina, sendo que os isolados INPA R43 e INPA R48 apresentaram as maiores produções de biomassa, respectivamente 296 e 279 mg.

**Palavras-chave:** Biodegradação, metabolismo microbiano, hidrocarbonetos.

### Introdução

As contaminações de solos e do ambiente hídrico por hidrocarbonetos ocorrem desde o processo de extração, transporte, refino, até o consumo, com a produção de gases poluentes. Tais acidentes têm um grande efeito sobre as propriedades do ambiente contaminado. Observam-se com muita preocupação, os casos de contaminação do solo e água por hidrocarbonetos derivados de petróleo, que mesmo em pequenas concentrações, podem constituir um grande perigo à saúde humana e ao meio ambiente (Souza *et al.* 2010).

Na tentativa de fazer reparo adequado em áreas contaminadas, utiliza-se uma técnica de biorremediação, que compreende o processo de transformação e/ou degradação de compostos tóxicos para torná-lo ecologicamente inofensivo (Jacques, 2010). Esse processo pode envolver o emprego de microrganismos inerentes ao produto contaminante e ao meio ambiente, ou ainda pode lançar mão de microrganismos exógenos (Bennet e Faison, 1997).

O crescimento microbiano e a degradação de contaminantes ocorrem em função do meio ambiente de uma maneira interativa: enquanto crescem e se adaptam ao meio ambiente, os microrganismos o alteram através do consumo de nutrientes e liberação de produtos (Bragato, 2006). Assim, a eficiência da biorremediação é limitada se as condições físico-químicas como temperatura, pH, umidade e disponibilidade de outros nutrientes, além do poluente, o qual representa a fonte de energia, não forem favoráveis à sobrevivência e à atividade dos microrganismos degradadores, sendo, portanto, necessário um rigoroso controle e definição de parâmetros para aplicação dessa técnica (Boopathy, 2000; Jacques, 2010).

A habilidade de microrganismos como fungos de adaptar rapidamente o seu metabolismo a diversas fontes de carbono e energia é um fator essencial para sua sobrevivência. Essa flexibilidade se deve a

produção de uma grande quantidade de enzimas intra e extracelulares, capazes de degradar estes compostos inclusive polímeros complexos (Silva e Esposito, 2004).

Fungos do gênero *Trichoderma* são conhecidos por sintetizarem diversos metabólitos secundários, como inibidores de fitopatógenos antimicrobianos, produtores de fitohormônios e enzimas como a celulase e a amilase (Pandey *et al.* 2000; Chandra *et al.* 2009). Estes vivem livremente no meio ambiente ou parasitando outras espécies de fungos, podendo ser encontrados na rizosfera de plantas, em qualquer tipo de solo com disponibilidade de matéria orgânica em abundância como fonte de carbono e nitrogênio e em materiais vegetais em decomposição (Harman, 2006; Carreras-Villasenõr *et al.* 2012), sendo colonizadores de sucesso de seus *habitats*. Esta característica deve-se à sua capacidade degradativa do substrato, que é realizada através de suas enzimas extracelulares (Schuster e Schmoll, 2010), tornando-os de grande interesse econômico.

Por apresentarem essas características e principalmente por raramente serem patogênicos a animais e plantas (Espósito e Silva 1998; Kredics *et al.* 2003; Groll e Walsh, 2001), os fungos *Trichoderma* podem se tornar uma alternativa viável para serem utilizados em processo de biorremediação de ambientes contaminados por petróleo e seus derivados. Assim, o objetivo deste trabalho foi isolar e selecionar linhagens fúngicas de *Trichoderma* spp. e, avaliar a capacidade de crescimento das colônias em contato com gasolina.

## Material e Métodos

### *Coleta dos solos*

Foram coletadas amostras de solos da Reserva Biológica da Campina, e das Estações Experimentais de Silvicultura Tropical e Fruticultura Tropical do INPA situadas no entorno da cidade de Manaus-AM. As amostras foram acondicionadas em tubos *falcon* estéreis e encaminhadas ao Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos da Amazônia/INPA.

### *Isolamento e purificação de Trichoderma spp.*

Das amostras coletadas foram retiradas 10 g de solo e ressuspensas em 50 mL de água destilada estéril e agitados por 30 minutos a 200 rpm em agitador rotativo. As amostras foram submetidas a uma diluição seriada de até  $10^{-3}$  em solução salina (0,85%). Posteriormente, alíquotas de 100  $\mu$ L de cada diluição foram semeadas em triplicata em meio de cultura seletivo para *Trichoderma* em meio Basal utilizando glicose como fonte de carbono (Leelavathi *et al.* 2014). As placas foram incubadas a 30 °C por cinco dias e à medida que as colônias surgiram, foram isoladas e purificadas utilizando-se o meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) nas mesmas condições de cultivo do isolamento.

### *Avaliação do crescimento de Trichodermas spp. em contato com gasolina*

Foram selecionados dezesseis fungos que apresentaram características morfológicas semelhantes aos fungos do gênero *Trichoderma*. Um disco de 5 mm de diâmetro da borda de cada micélio do fungo crescidos em placas de Petri contendo meio BDA foi inoculado, em triplicata, em papéis de filtro estéreis (0,58 mg) colocados sobre a superfície do meio INPA enriquecido com 0,1 mL de gasolina cedida pelo Laboratório pertencente à Refinaria Isaac Sabbá (REMAN), localizada na cidade de Manaus, Amazonas, com um tratamento controle (papel filtro, gasolina e meio mineral INPA). A gasolina foi filtrada em membrana de 0,22  $\mu$ m de poro. A incubação foi realizada em temperatura de 15°C até o momento em que as hifas dos fungos começaram a atingir a borda da placa. Posteriormente, os filtros com as hifas associadas foram secos em estufa a 60°C por 48 horas e em seguida pesados. Os pesos foram obtidos subtraindo-se o peso do filtro após o crescimento dos fungos (Diniz, 2014).

### *Análise estatística*

Os dados gerados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), pelo teste F. Quando significativo, as comparações de médias foram realizadas pelos testes Skott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade (SISVAR).

## Resultados e Discussão

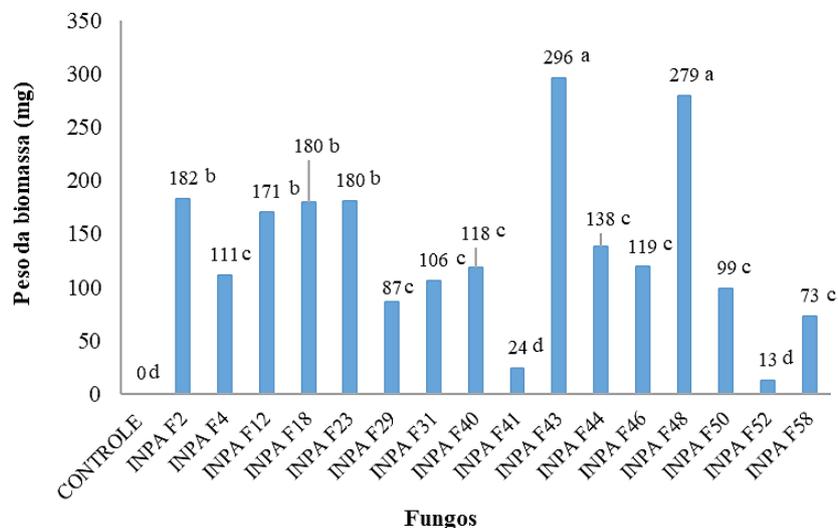
Das amostras de solos coletadas de diferentes locais no entorno de Manaus, foram isolados 81 fungos. Esses fungos foram identificados inicialmente como INPA F1 a INPA F81 e estão depositados na Coleção do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos da Amazônia/INPA. Destes, dezesseis linhagens (INPA F2, INPA F4, INPA F12, INPA F18, INPA F23, INPA F29, INPA F31, INPA F40, INPA F41, INPA F43, INPA F44, INPA F46, INPA F48, INPA F50, INPA F52, INPA F58) foram caracterizadas morfológicamente como sendo *Trichoderma*.

Foram observadas diferenças significativas nos valores médios de peso da biomassa dos fungos testados (Figura 1). Os isolados INPA F43 e INPA F48 apresentaram maiores peso da biomassa microbiana seca, com 296 mg e 279 mg, respectivamente. Enquanto que os isolados INPA F41 e F52 não apresentaram valores satisfatória (24 e 13 mg) até o fim do período de avaliação (15 dias). Quando utilizado o meio INPA com a gasolina (Controle), não foi observada crescimento fúngico no papel filtro, confirmando com isso não haver contaminantes presentes no derivado de petróleo.

Nota-se na figura 1, que a maioria dos tratamentos apresentou peso superior a 80 mg, aos 15 dias de incubação, sugerindo com isso que é possível e viável a utilização destes fungos num processo de biorremediação de solos, uma vez que demonstraram adaptação ao meio de cultura e ao derivado de petróleo.

Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho foram descritos por Diniz (2014), que ao realizar testes com fungos isolados de amostras de solo contaminado da Antártica, observou que quatro isolados apresentaram peso entre 151,8 e 426,4 mg, em diferentes concentrações de óleo diesel. Hugnes *et al.* (2006), por outro lado, ao avaliarem fungos isolados de solo menos contaminado com hidrocarbonetos, verificaram que os fungos isolados a partir de um solo altamente impactado são menos tolerantes. Para os autores, a tolerância menor dos fungos pode ter ocorrido devido ao enriquecimento do solo com microrganismos que degradam os hidrocarbonetos durante derramamentos anteriores de óleo.

Parr *et al.* (1983) descrevem que a atividade microbiológica no solo é intensamente afetada pela disponibilidade de nutrientes, pela tolerância dos microrganismos às variações do pH, compostos tóxicos, entre outros. Segundo Maciel (2013), fungos filamentosos como o *Penicillium*, são capazes de sobreviver em ambientes com poucos nutrientes e degradar hidrocarbonetos do querosene. Khelifi *et al.* (2009), relatam que ao serem expostos a compostos de estrutura complexa, como a gasolina os microrganismos utilizam uma fonte mais facilmente assimilável para a obtenção de energia, para só então metabolizar as moléculas mais complexas.



**Figura 1.** Peso da biomassa microbiana seca das linhagens de *Trichoderma* (mg), crescidos em meio INPA contendo gasolina.

OBS. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

## Conclusões

De um total de 81 isolados de *Trichoderma* da cidade de Manaus, 16 foram capazes de crescer em meio INPA acrescido de gasolina;

Os isolados de *Trichoderma* de maiores pesos de biomassa seca, no período de 15 dias de crescimento foram INPA R43 e INPA R48;

A adição da gasolina ao meio de cultivo não inibiu o crescimento da maioria dos fungos isolados testados. A tolerância e as variações de crescimento na presença da gasolina foram dependentes de cada fungo;

Os testes indicam que esses fungos foram capazes de tolerarem e crescerem na presença de gasolina, indicando com isso potencial uso no processo de biorremediação de solos.

## Referências

- Adekunle AA, Adebambo OA 2007. Petroleum hydrocarbon utilization by fungi isolated from *Detarium senegalense* (J.F. Gmelin) seeds. *Journal of American Science*, 3: 69-76.
- Bennet JW, Faison BD 1997. Use of fungi in Biodegradation. Em: Manual of Environmental Microbiology. Ed. Christon J. Hurst, J. ASM Press, 758-765.
- Boopathy R 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74: 63.
- Bragato M 2006. *Tratamento 'in-situ' de solo contaminado por derivado de petróleo e metais*. São Paulo, Brasil. (Tese. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. USP).194f.
- Carreras-Villasenor N, Sánchez-Arreguín JA, Herrera-Estrella AH 2012. *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. *Microbiology*, 158: 3-16.
- Chandra M, Kalra A, Sharma PK, Kumar H, Sangwan RS 2009. Cellulase production by six *Trichoderma* spp fermented on medicinal plant process. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36: 605-609.
- Diniz GFD 2014. *Isolamento de fungos de solo da Antártica contaminado com óleo diesel e análise do potencial de crescimento e degradação de hidrocarbonetos*. Sete Lagoas – MG, Brasil (Universidade Federal de São João Del-Rei. UFSJ). 33p.
- Esposito E, Da Silva M 1998. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. *Crit Rev Microbiol.*, 24 (2): 89-98.
- Groll AH, Walsh TJ. 2001. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. *Clin Microbiol Infect.*, 7 (2): 8-24.
- Harman GE. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96: 190-194.
- Hugnes KA, Bridge P, Clark MS 2006. Tolerance of Antarctic soil fungi to hydrocarbons. *Science of the Total Environment*, 372: 539-548.
- Jacques RJS *et al.* 2010. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas *Ciência Rural*, 40 (2): 310-317. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v40n2/a468cr1426.pdf>.
- Khelifi E *et al.* 2009. Effect of nitrogen and carbon sources on Indigo and Congo red decolourization by *Aspergillus alliaceus* strain 121C. *Journal of Hazardous Materials*, 163: 1056-1062.
- Kredics L *et al.* 2003. Influence of Environmental Parameters on *Trichoderma* Strains with Biocontrol Potential. *Food Technol. Biotechnol.* 41 (1) 37-42.
- Leelavathi MS, Vani LL, Reena P. 2014. Antimicrobial activity of *Trichoderma harzianum* against bacteria and fungi. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 3 (1): 96-103.
- Maciel CCS, Souza CS, Silva PA, Sousa MFVR, Gusmão NB 2013. Cinética de degradação de querosene de aviação por *Penicillium* sp. através da bioestimulação. *Brazilian Journal of Biosciences*, 1(11): 39-42.
- Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Soccol VT 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugar-cane bagasse. *Bioresour Technol.*, 74: 69-80.
- Parr JF, Sikora LJ, Burge WD 1983. Factors affecting the degradation and inactivation of waste constituents in soil. In Land Treatment of Hazardous Wastes. Parr, J.F., Kla, J.M. (eds). Park Ridge, NJ, *Noyes Data Corp.*, 20: 321-337.
- Schuster A, Schmol M 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3): 787-799.
- Silva M, Esposito E 2004. O papel dos fungos na recuperação ambiental. In: Espósito, E.; Azevedo, J.L. (orgs). Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: *Educs*, 337 -378.
- Souza DB *et al.* 2010. Estudo de micro-organismos presentes em uma área contaminada por gasolina comercial. *Revista de Estudos Ambientais*, Blumenau, 12 (2): 38-46.

## Perfil de resistência a antibióticos em isolados de *Staphylococcus* spp. catalase positiva

Suellen Caroline Barbosa Neves<sup>1</sup>, Graciene do Socorro Taveira Fernandes<sup>2</sup>,  
Rídel Rodrigo Silva Fernandes<sup>1</sup>, Adresa Krislany Ferreira<sup>3</sup>, Ana Clara Ribeiro Morais<sup>3</sup>,  
Jhessica Krhistine Caetano Frota<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bacharel em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Oeste do Pará

<sup>2</sup>Docente Universidade Federal do Oeste do Pará

<sup>3</sup>Discentes de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Oeste do Pará

<sup>4</sup>Técnica do laboratório de Ensino Multidisciplinar de Biologia Aplicada, Universidade Federal do Oeste do Pará.

Emails: scambiente@hotmail.com, gracienefernandes@hotmail.com, ridelrodrigo1995@gmail.com,  
andresa.krislany@yahoo.com.br, morais.acr17@gmail.com, jhessicasm@hotmail.com

### Resumo

O gênero *Staphylococcus* spp. é conhecido por seu potencial patogênico e está entre as infecções estafilocócicas mais comuns no país. Atualmente existe uma grande preocupação no que diz respeito ao uso de antimicrobianos indiscriminados, colocando no ambiente cepas cada vez mais resistentes. Desta forma, o presente trabalho foi realizado isolando cepas de *Staphylococcus* spp catalase positiva de amostras ambientais e de alimentos na cidade de Santarém – PA e tem como objetivo, avaliar o padrão de susceptibilidade de *Staphylococcus* spp. catalase positivo aos principais antibióticos: vancomicina, penicilina, ciprofloxacina, cloranfenicol, tetraciclina, oxacilina e novobiocina utilizando a técnica de difusão em disco de Kirby-Bauer. Os resultados mostraram que as cepas de *Staphylococcus* spp. catalase positiva apresentaram resistência de 65% a novobiocina e 35% de sensibilidade, a oxacilina 56% sensibilidade e 44% resistentes, tetraciclina mostrou 53% de sensibilidade e 23% de resistência, gentamicina com 18% de resistência e 82% de sensibilidade, ciprofloxacina com 23% de resistência e 71% de sensibilidade, vancomicina com 29% de resistência e 71% de sensibilidade, penicilina com 35% de resistência e 65% de sensibilidade, e cloranfenicol com 35% de resistência. Desta forma, pode-se concluir que os isolados apresentaram maior resistência a de *Staphylococcus* spp. a oxacilina, seguido de cloranfenicol e novobiocina.

**Palavras-Chave:** Antimicrobiano, teste de resistência, *Staphylococcus* catalase positiva.

### Introdução

Existe uma grande preocupação no Brasil e no mundo no que diz respeito as infecções bacterianas, Segundo Pereira *et al.* (1994), as intoxicações estafilocócicas são muito comuns no país, sendo a maioria dos casos não investigada ou não notificada.

Os estafilococos foram observados inicialmente em 1878 a partir de material purulento e, em 1881, houve a primeira publicação citando a forma de cocos e a presença constante desses microrganismos em abscessos agudos e crônicos. A relação desses microrganismos com surtos de intoxicação alimentar só ocorreu em 1884, em Michigan, EUA, quando se associou os casos ao consumo de queijo tipo *cheddar* contaminado com estafilococos (Pereira *et al.*, 2000). Este gênero bacteriano é constituído por pelo menos 30 espécies, sendo as de maior importância no ambiente hospitalar são *Staphylococcus aureus*, *S. saprophyticus* e *S. epidermidis* (Brooks e Butel, 2000).

As enterotoxinas estafilocócicas (EE) produzidas por *Staphylococcus* são potentes exotoxinas sintetizadas durante a fase de crescimento ou durante a transição da fase exponencial para a fase estacionária. Estas EE são produzidas entre 10 °C e 46 °C, com um ótimo entre 40 °C e 45 °C. Estas bactérias são tolerantes a concentrações de 10% a 20% de NaCl, o que pode tornar os alimentos um dos principais veículos para a propagação das mesmas (Franco e Landgraf, 2008).

Bastos (2013) enfatiza que as enterotoxinas estafilocócicas (EE), produzidas por algumas cepas de *S. aureus*, causam uma das doenças mais comuns transmitidas por alimentos, a intoxicação alimentar

estafilocócica sendo resultante do consumo de alimentos ou bebidas contendo a dose infectante de uma ou mais EE pré-formadas no alimento.

A resistência microbiana é um problema e está associada a diversos fatores listado entre uma das grandes ameaças a saúde humana segundo a *World Economic Forum Global Risks* (Blair *et al.*, 2015).

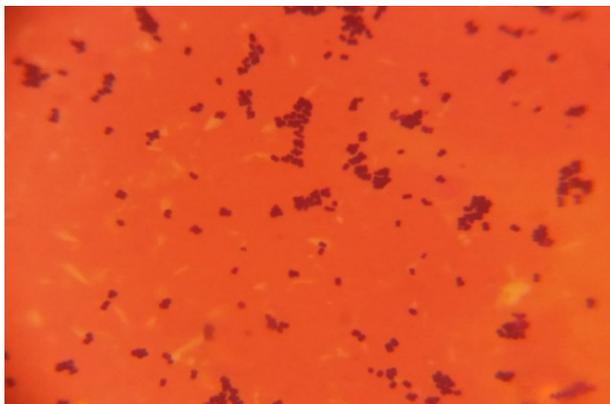
Diante do quadro acima descrito, empreendeu-se um trabalho cujo objetivo foi avaliar o padrão de susceptibilidade de *Staphylococcus* catalase positiva (SCP) a antibióticos de várias classes. Os objetivos específicos foram identificar ao menor nível taxonômico os isolados estudados, identificar entre os isolados os SCP e avaliar o perfil de resistência a antimicrobianos das cepas de isolados de amostras ambientais (ar) e alimentares (camarão). Este estudo tem grande importância no que tange a saúde de um modo geral e assim poder contribuir com pesquisas relacionadas a clínica aplicada.

## Material e Métodos

Foram isoladas 17 cepas de *Staphylococcus* catalase positiva (SCP) obtidas de amostras da microbiota do ar da área urbana e de camarão salgado e seco em Santarém – Pará, que fazem parte da atual bacterioteca do Laboratório de Ensino Multidisciplinar de Biologia Aplicada (LaBio) da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA).

Para a identificação na bacterioteca, as cepas foram reativadas e semeadas em Ágar Baird Parker (Kasvi®), em seguida, inoculadas em Tryptic Soy Agar (TSA – Kasvi®) e incubadas em estufa a temperatura de 35 °C por um tempo de 24 horas. Passado o período de cultivo foi feito o teste tintorial pela coloração de Gram para verificar a pureza da cultura e em seguida foi realizada a prova de catalase.

Para o teste de resistência a antibióticos nas cepas *Staphylococcus* catalase positivo (SCP), foi utilizado o método de Kirby - Bauer através da técnica de difusão em disco, em que foi retirado uma porção de massa bacteriana com a ajuda de uma alça bacteriológica e suspensa em solução salina 0,85% estéril, homogeneizada até obter-se total turbidez, em seguida comparado ao padrão da escala MaC Farland a 0,5 e calibrado em espectrofotômetro. Utilizando *swabs* estéreis embebidos em solução salina, foi feito um tapete com a suspensão bacteriana em placa contendo Ágar Mueller-Hinton (Kasvi®). Para o teste de resistência foram utilizados 8 antimicrobianos de 6 classes, a saber foram: vancomicina (30µg), penicilina (10µg), ciprofloxacina (5µg), cloranfenicol (30µg), tetraciclina (30µg), gentamicina (10µg), oxacilina (1µg) e novobiocina (5µg). As placas de Petri foram levadas à estufa sob temperatura de 35 °C, após 24h de cultivo, os halos foram medidos com auxílio de paquímetro digital. Os dados das medidas foram comparados com os manuais Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016), Anvisa (2013) e como referência o trabalho de Reddy *et al.* (2015) para classificação em sensível (S), resistente (R) e intermediário (I). A partir disso, os resultados foram tabulados utilizando o Microsoft Excel e montados gráficos para melhor compreensão.

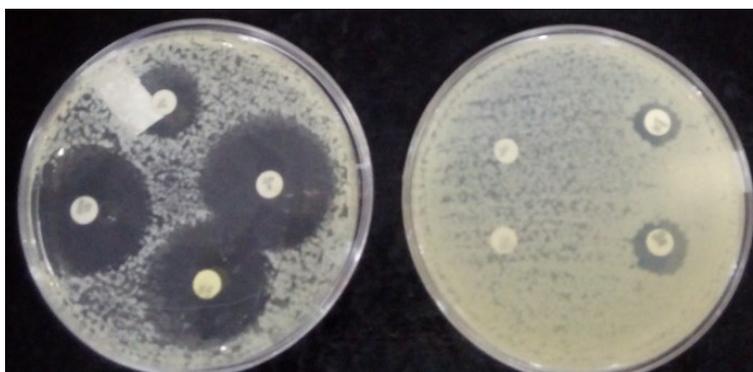


**Figura 1.** Coloração de Gram para *Staphylococcus* catalase positivo (SCP) que se apresentam como cocos Gram positivos observados no microscópio óptico.

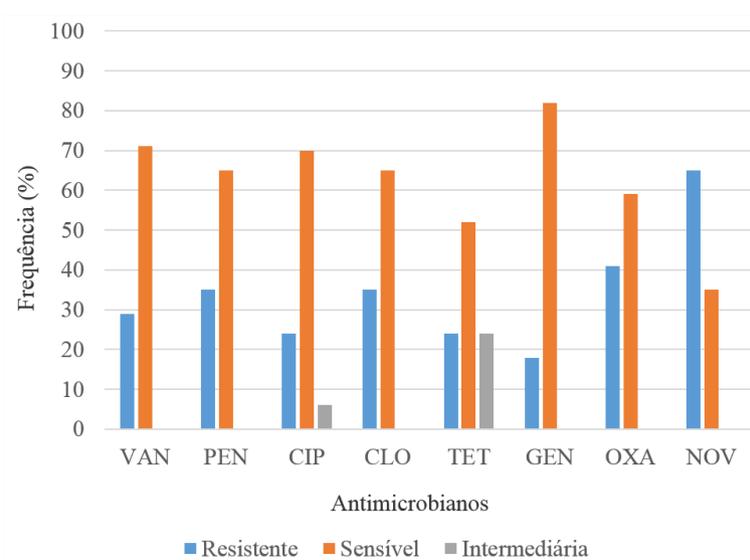
## Resultados e Discussão

As 17 cepas de *Staphylococcus* catalase positivo (SCP) após serem submetidas ao teste de resistência e analisados os halos de inibição, o antibiótico em que foram obtidos maior índice de resistência foi a novobiocina seguida de oxacilina.

Desta forma obteve-se os seguintes resultados de resistência: novobiocina (65%), seguido de oxacilina (41%), cloranfenicol e penicilina (35%), vancomicina (29%), ciprofloxacina e tetraciclina (23%), gentamicina (18%) como apresentado na Figura 3 e Tabela 1.



**Figura 2.** Halo de inibição de resistência das cepas de *Staphylococcus* catalase positivo (SCP).



**Figura 3.** Perfil de resistência de *Staphylococcus* catalase positivo (SCP).

**Tabela 1.** Perfil de sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* catalase positivo (SCP) a diferentes antibióticos.

Antimicrobiano	Resistente (%)	Sensível (%)	Intermediária (%)
Novobiocina	65	35	0
Oxacilina	41	59	0
Penicilina	35	65	0
Cloranfenicol	35	65	0
Vancomicina	29	71	0
Ciprofloxacina	24	70	6
Tetraciclina	24	52	24
Gentamicina	18	82	0

Os antibióticos que apresentaram uma elevada taxa de suscetibilidade foram: gentamicina com 82% e vancomicina com 71%. Respectivamente, a gentamicina pertence ao grupo dos aminoglicosídeos que segundo Bertino *et al.* (1994), esta classe de antibióticos é muito importante no tratamento de infecções por bactérias Gram-negativas e como agentes sinérgicos para o tratamento de infecções estafilocócicas e estreptocócicas. Para vancomicina segundo o trabalho de Reddy *et al.* (2015), todas as cepas de *S. aureus* submetidas ao método de difusão em disco de Kirby- Bauer apresentaram suscetibilidade à vancomicina. Apesar de relatos de resistência intermediária no trabalho de Zhu *et al.* (2014), ainda assim é comum tratamento em hospitais utilizando a vancomicina em infecções com resistência a meticilina (Liu *et al.*, 2014). A vancomicina é um antibiótico pertencente à classe dos glicopeptídeos, e colocado a disposição da medicina em 1956 (Santos *et al.* 2007).

De acordo com os resultados as cepas de *Staphylococcus* catalase positivo apresentaram maior frequência de resistência intermediária à tetraciclina (24%). Brinda, Herman e Faur (2010) também encontraram resistência intermediária à tetraciclina em cepas de *S. aureus* isoladas de mastites em bovinos. Os determinantes da resistência à tetraciclina são amplos entre espécies bacterianas e são regularmente encontradas bactérias resistentes a múltiplas drogas (El-Razik *et al.*, 2017). Porém há relatos sobre altas taxas de resistência em cepas de *Staphylococcus* catalase positiva ou negativa à tetraciclina (El-Razik *et al.*, 2017; Cavalcante *et al.*, 2013).

As tetraciclinas são antibióticas de amplo espectro usados no tratamento e prevenção de infecções bacterianas, principalmente aquelas causadas por *S. aureus* (Ardic *et al.*, 2005). A maioria das bactérias que apresentam resistência à tetraciclina adquirem os genes de resistência à tetraciclina (*tet*). Dois principais mecanismos de resistência à tetraciclina foram descritos em *S. aureus*: efluxo ativo, resultante da aquisição dos genes *tetK* e *tetL* localizados no plasmídeo e proteção ribossômica por proteínas semelhantes ao fator de alongamento que são codificadas por *tetM* ou *tetO* cromossômico ou transposonal determinantes (Esposito *et al.*, 2009; McCallum *et al.*, 2010).

As cepas de SCP testadas nesta pesquisa apresentaram maior resistência à novobiocina, com um percentual de 65%. Azevedo, *et al.* 2007, encontrou em seus testes, resistência à novobiocina, em todas as suas amostras e Freitas *et al.* (2005) encontrou 75% de resistência em suas amostras isoladas de leite de vaca. O teste de sensibilidade com novobiocina é comumente utilizado para identificar espécies de *Staphylococcus* catalase negativo sendo divididos em dois grupos: *S. saprophyticus* e não *S. saprophyticus*. Dessa forma, as cepas de *S. saprophyticus* são resistentes e os não *S. saprophyticus* são sensíveis à novobiocina (Silva *et al.*, 2016; ANVISA, 2013).

Outro antibiótico para qual as cepas foram testadas e apresentaram considerável resistência foi oxacilina, com 41%. Spiandorello *et al.* (2000) encontrou em seu trabalho uma resistência de 32,7% à oxacilina. Zhu *et al.* (2014), também identificou uma resistência à oxacilina e à penicilina, porém no presente estudo, a penicilina apresentou 65% de sensibilidade às cepas de *Staphylococcus* spp., representando bom grau de suscetibilidade.

Segundo Kayser (2010) a oxacilina é um antimicrobiano do grupo das penicilinas sendo a primeira escolha para tratamento das infecções estafilocócicas em hospitais, quando não há resistência aparente. A determinação correta da suscetibilidade à oxacilina em amostras de estafilococos é fundamental, pois a falha na detecção desta resistência pode resultar em terapia ineficaz, levando ao uso desnecessário da vancomicina e outros agentes de amplo espectro em hospitais.

Atualmente o desenvolvimento de resistência por parte de um agente patogênico frente aos antibióticos amplamente usados significa um desafio para a busca por novos agentes antimicrobianos no combate a infecções superando os problemas de resistência, sem efeitos colaterais (Haniffa *et al.*, 2014). Os diferentes padrões de resistência a antibióticos de isolados bacterianos podem ser resultado da diferença na pressão de seleção.

O impacto das bactérias resistentes e o uso indiscriminado de substâncias antimicrobianas é uma preocupação global quanto a saúde humana, animal e do meio ambiente. Assim, o aparecimento e disseminação de resistência a drogas antimicrobianas entre as bactérias são considerados sérios problemas de saúde pública mundial (Haniffa *et al.*, 2014; Nascimento e Araújo, 2014; Balakrishna e Keerthi, 2012).

## Conclusão

Os padrões de suscetibilidade e resistência das cepas de *Staphylococcus* catalase positiva (SCP) é maior para oxacilina e novobiocina.

## Referências

- Ardic N, Ozyurt M, Sareyyupoglu B, Haznedaroglu 2005. Investigation of erythromycin and tetracycline resistance genes in methicillin-resistant staphylococci. *Int J Antimicrob Agents*, 26:213-218.
- Bastos CP 2013. *Detecção, prevalência e expressão de genes de enterotoxinas clássicas de staphylococcus aureus isolados de alimentos e surtos*. Pelotas, Brasil (Tese –Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas). 91p.
- Balakrishna A, Keerthi TR 2012 Screening of potential aquatic probiotics from the major microflora of guppies (*Poecilia reticulata*). *Frontier Chemistry Science Engieneer*, 6 (2):163–173.
- Bertino Jr. JS, Rodvold KA, Destache CJ. 1994. Cost Considerations in Therapeutic Drug Monitoring of Aminoglycosides. *Clin. Pharmacokinet.* 26(1): 71-81
- Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV 2015. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Nature*, 13:42-51.
- ANVISA BRASIL Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde: Detecção e identificação de bactérias de importância médica. 2013. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. – ANVISA, Volume 6. Brasília. 150p
- Brînda M, Herman V Faur B 2010. Antimicrobial sensitivity of some staphylococcus aureus strains from bovine mastitis. *Lucrări științifice medicină veterinară*. 43(1): 102-105.
- Brooks GF, Butel JS, Morse JA 2000. *Microbiota normal do corpo humano*. In:Brooks GF, Butel JS, Morse JA, editores. Jawetz, Melnik & Adelberg's Microbiologia médica. 21<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.142-5.
- Cavalcante FS, Schuenki RP, Caboclo RMF, Ferreira DC, Nouér SA, Santos KRN 2013. Tetracycline and trimethoprim/sulfamethoxazole at clinical laboratory: Can they help to characterize *Staphylococcus aureus* carrying different SCCmec types ?. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 46(1):100-102. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-868216062013>
- CLSI 2016. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Ed. 26.
- El Razik KAA, Arafa AA, Hedia RH, Ibrahim ES 2017. Tetracycline resistance phenotypes and genotypes of coagulase-negative staphylococcal isolates from bubaline mastitis in Egypt. *Veterinary World*. 10(6): 702-710.
- Espósito S, Leone S, Petta E, Noviello S, Ianniello, F 2009. Treatment options for skin and soft tissue infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: oral vs. parenteral; home vs. hospital. *Int J Antimicrob Agents*, 34:30-35.
- Franco B.D.G.M., Landgraf M 2008. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu. 182p.
- Freitas MFL, Júnior JWP, Stamford TLM, Rabelo SSA, Filho VSM., Sena FGB, Mota, RA 2005. Perfil de sensibilidade de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. *Arq. Inst. Biol.* São Paulo, 72(2): 171-177
- Haniffa M.A., Viswanathan S., Jancy D., Poomar I. K., Manikandan S 1994. Antibacterial studies of fish mucus from two marketed air-breathing fishes – *Channa striatus* and *Heteropneustes fossilis*. *International Research Journal of Microbiology*, 5(2): 22-27.
- Kayser TDL, Pacheco FC, Lima AA, Pereira EM, Santos KRN., Nunes APF 2010 Avaliação de métodos comumente usados em laboratórios para a determinação de suscetibilidade à oxacilina entre amostras de *Staphylococcus* sp. isolados de um hospital de Vitória, estado do Espírito Santo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 43(3): 298-303.
- Kluytmans JAJW 2010 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products; cause for concern or case for complacency? *Clinical Microbiology and Infection*. Suíça. 16(1): 11-15.
- Liu C, Chen ZJ, Sun Z, Feng X, Zou M, Cao W, Wang S, Zeng J, Wang Y, Sun M 2014 Molecular characteristics and virulence factors in methicillin-susceptible, resistant, and heterogeneous vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* from central-southern China. *J Microbiol Immunol Infect*, 48(5):490-6.

- McCallum N, Berger-Bächli B, Senn MM 2010. Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*, 300:118-29.
- Nascimento ED, Araújo MFF 2014. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquatic environments in Brazil: a systematic review. *Ambiente & Água – An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 9(2): 239-249.
- Pereira ML, Carmo LS, Santos EJ, BergDoll MS 1994. Staphylococcal food poisoning from cream-filled cake in a metropolitan area of South-Eastern Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 28(6): 406-409.
- Pereira MA, Pereira JL, Serrano AM, Bergdoll MS 1994. Estafilococos: Até onde sua importância em alimentos? *Higiene Alimentar*, 14(68): 32-39.
- Reddy PS, Jhon MS, Devi V, Reddy BSP 2015. Detection of vancomycin susceptibility among clinical isolates of MRSA by using minimum inhibitory concentration method. *International Journal of Research in Medical Sciences*. 3(6):1378-1382
- Robinson D, Enright MC 2003. Evolutionary models of the emergency of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *American Society for Microbiology*, 47(12): 3926-3934.
- Santos AL, Santos D.O., Freitas C.C., Ferreira B.L.A., Afonso I.F., Rodrigues C.R., Castro H.C. 2007. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J Bras Patol Med Lab*, 43(6): 413-423.
- Silva EP, Carreiro MA, Gomes RC 2016. Metodologia para a identificação de *Staphylococcus sp.* na superfície do colchão da maca no pronto socorro. *Revista Pró-UniverSUS* 7(3): 15-19.
- Spiandorello WP, Morsh F, Spiandorello FS 2000. A resistência de *Staphylococcus aureus* à oxacilina em hospital de Caxias do Sul. *Revista AMRIGS*, 44(3,4): 120-125
- Zhu X, Liu C, Gao S, Lu Y, Chen Z, Sun Z 2014. Vancomycin intermediate-Resistant *Staphylococcus aureus* (VISA) Isolated from a patient who never received Vancomycin treatment. *International Journal of Infectious Diseases* 33:185-190.

## Identificação do gênero *Candida* no tecido cutâneo de anfíbios em Santarém, Pará, Brasil

Andreza da Silva Peixoto<sup>1</sup>, Rafael da Silva de Almeida<sup>2</sup>, Graciene do Socorro Taveira Fernandes<sup>3</sup>, Ricardo Alexandre Kawashita-Ribeiro<sup>4</sup>, Eveleise Samira Martins Canto<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Discente de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Oeste do Pará

<sup>2</sup> Discente de Biotecnologia, Universidade Federal do Oeste do Pará

<sup>3</sup> Docente, Universidade Federal do Oeste do Pará

<sup>4</sup> Docente, Universidade Federal do Mato Grosso

Emails: andrezapeixoto9@gmail.com, rafael00sa97@gmail.com, gracienefernandes@hotmail.com, serpenesbr@gmail.com, eveleisesamira@hotmail.com

### Resumo

A pele dos anfíbios apresenta características únicas dentre os vertebrados, sendo o órgão responsável tanto pela troca gasosa quanto pela defesa contra agentes patogênicos e oportunistas. Portanto, o presente trabalho objetivou avaliar a presença de leveduras do gênero *Candida* no tecido cutâneo de anfíbios anuros na cidade de Santarém, Pará. Para isso foram realizadas 3 amostragens em buscas ativas entre os meses de novembro de 2017 a fevereiro de 2018 sendo, 9 espécimes de anfíbios capturados sem distinção de espécie ou sexo. O material cutâneo foi colhido por esfregaço na região dorsoventral do animal, utilizando um *swab* embebido em solução salina 0,85% e cultivado em placas de Petri contendo meio BDA, acrescido de cloranfenicol. Posteriormente, analisou-se as características macromorfológicas das colônias em meio BDA. Sucessivamente, as colônias foram inoculadas em CHROMagar *Candida* (Merck®) e foram caracterizadas pela coloração exibida no meio. Foram isoladas 22 colônias de *Candida*, na qual 12 colônias apresentaram coloração violeta, 4 com coloração azul, 2 com coloração rosa e 4 apresentaram-se incolores. O gênero *Candida* faz parte da microbiota normal da pele de anfíbios, sendo um gênero dificilmente estudado nestes vertebrados, com isso enfatiza-se que novos estudos devem ser realizados para monitorar a microbiota dos anuros.

**Palavras-chave:** Anuros, Microbiota, Pele, Amazônia.

### Introdução

A Classe dos Anfíbios (Amphibia) é dividida em três ordens: Urodela ou Caudata (salamandras), Gymnophiona (cecílias ou cobras-cegas) e Anura (sapos, rãs e pererecas) (Herpetofauna, 2018). No Brasil, a ordem Anura é a mais representativa e possui 1020 espécies (AmphibiaWeb, 2018a). Os anfíbios são distribuídos globalmente, exceto nas regiões polares da Antártida e Groelândia, e especialmente concentrados em países neotropicais. Eles habitam uma variedade de ecozonas, das florestas tropicais aos desertos (AmphibiaWeb, 2018b).

Os anfíbios são um grupo de vertebrados que a despeito da complexidade de seu sistema imunológico, seu ciclo de vida inclui uma fase aquática e outra terrestre, e pelo fato de possuírem uma pele permeável, torna-os vulneráveis já que expõe estes animais ao ambiente e facilita a passagem de poluentes químicos e biológicos com facilidade (Feder e Burggren, 1992). Dentre os vertebrados, a pele desses animais apresenta características únicas e atua como uma interface bastante funcional entre o organismo e o meio externo (Assis, 2015).

Além disso, a pele desempenha outros papéis importantes dentre os quais o destaque ocorre na respiração e defesa imunológica destes animais. Nesse sentido, o muco presente na superfície da pele tem como constituintes moléculas bioativas responsáveis pela proteção desses animais. Os principais ingredientes do muco são glicoproteínas e materiais de fibra. Geralmente, as secreções mucosas têm propriedades antibacterianas, antioxidante, antitumoral, resistente à fadiga e fortalecem a imunidade (Colombo *et al.*, 2015).

O muco da pele é produzido tanto pelas glândulas dérmicas dos sapos quanto pela comunidade microbiana residente, e muitas apresentam atividade antimicrobiana (Santos, 2013). Porém, independentemente disso, na microbiota cutânea dos anfíbios estão presentes patógenos oportunistas, que podem provocar infecções quando o hospedeiro é submetido a condições ambientais inóspitas ou a eventos como imunossupressão (Assis, 2012; 2015).

Todos os animais são hospedeiros de microrganismos simbióticos que constituem sua microbiota natural. Os animais dependem desses microrganismos para muitos processos vitais críticos, como digestão, aquisição de energia, e resistência a patógenos (Rosenberg *et al.*, 2007). Essa comunidade microbiana simbiote pode nos fornecer importantes informações em vários aspectos, além de abrir possibilidades de identificar substâncias com potenciais usos biotecnológicos com várias áreas de aplicação.

O microbioma da pele ou muco de animais é constituído por bactérias, fungos e vírus. Os fungos leveduriformes pertencem aos filos Ascomycota e Basidiomycota, possuem uma gama de aplicações biotecnológicas atuando na produção de enzimas que catalisam processos fermentativos e produzindo diversos compostos secundários que podem ser usados na indústria química, farmacêutica, alimentícia e agropecuária (Angioletto, 2013; Fuentefria, 2004).

Porém algumas leveduras, principalmente as espécies do gênero *Candida* são amplamente distribuídas, oportunistas e podem causar danos em seus hospedeiros, como infecções superficiais até infecções sistêmicas aos indivíduos com sistema imunológico deficiente (Crocco *et al.*, 2004). Apesar da ampla distribuição, até o presente momento do estudo, possivelmente apenas o trabalho de Douglas e Amuzie (2017), relata a ocorrência do gênero *Candida* como parte da microbiota cutânea de anfíbios.

Na última década muitas pesquisas têm focado no estudo da microbiota presente na pele de muitos animais fornecendo informações sobre a diversidade, funcionalidade e ecologia microbiana além das interações estabelecidas e os papéis críticos dessa microbiota para o hospedeiro (Sylvain *et al.*, 2016).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a presença de leveduras do gênero *Candida* no tecido cutâneo de anfíbios anuros na cidade de Santarém, Pará.

## Material e Métodos

O estudo foi desenvolvido principalmente na área portuária localizada na Unidade Tapajós da Universidade Federal do Oeste do Pará (2°25'13.3"S, 54°44'26.7"W), localizado na área urbana do município de Santarém, no Oeste do Estado do Pará. Exemplares adicionais foram obtidos na área do Zoológico da Universidade da Amazônia (ZooUnama) (2°27'34 "S, 54°44'06"W), também na área urbana de Santarém.

Foram capturados sete espécimes de anfíbios anuros em buscas ativas entre os meses de novembro de 2017 a fevereiro de 2018 na área portuária da Unidade Tapajós da UFOPA (Figura 1) e dois exemplares na área do ZooUnama. Os exemplares foram coletados sem distinção de espécie ou sexo, e colocados em sacos plásticos do tipo zip-lock transparentes e estéreis, transportados para o Laboratório Multidisciplinar de Ensino de Biologia Aplicada (LaBio) da UFOPA para os procedimentos de coleta do material cutâneo dos animais.

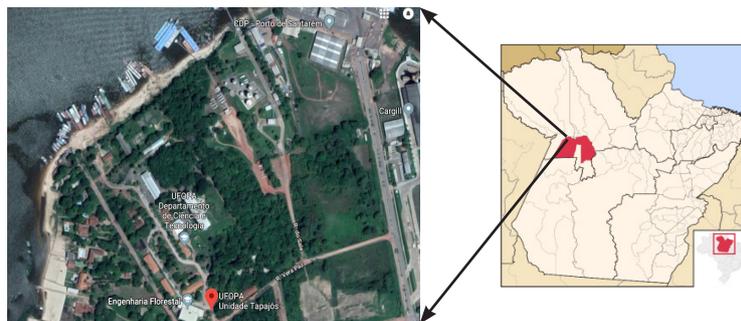


Figura 1. Imagem de satélite parcial da Unidade Tapajós – UFOPA, na cidade de Santarém, PA.

Fonte: Google Maps, 2018; Inside Brazil, 2018.

O material cutâneo foi colhido por esfregaço na região dorsoventral (comprimento rostro-cloacal) de cada animal, utilizando um *swab* embebido em solução salina 0,85% da qual foram obtidas três séries até a diluição  $10^{-3}$ . Após as diluições serem feitas, o material foi inoculado em placas de Petri contendo BDA – Ágar Batata Dextrose (Merck®) acrescido de cloranfenicol, com duplicata, e incubado em temperatura ambiente ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) por cerca de 7 dias.

As culturas foram isoladas em meio BDA (Merck®) suplementado com cloranfenicol, e cultivadas em temperatura ambiente ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), no período de 7 dias. Após o crescimento as colônias foram analisadas quanto às características macromorfológicas (coloração, textura, consistência, relevo, borda e reverso).

As colônias que apresentaram coloração branca a creme, textura lisa brilhante, úmidas e cremosas, que são características fenotípicas do gênero *Candida* (Spolidorio *et al.*, 2009) foram inoculadas em meio CHROMagar *Candida* (Merck®) e incubadas por 48 horas, à  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em estufa bacteriológica, passado o período de incubação, foram identificadas de acordo com a coloração exibidas no meio de cultura (Tabela 1).

**Tabela 1.** Coloração das espécies de *Candida* em meio cromogênico.

Espécie	Cor
<i>Candida albicans</i>	Verde
<i>C. tropicalis</i>	Azul
<i>C. krusei</i>	Rosa
<i>C. glabrata</i>	Lilás/Violeta

## Resultados e Discussão

Até o presente momento do estudo, foram capturadas quatro espécies de anfíbios anuros, pertencentes a três famílias (Bufonidae, Hylidae e Strabomantidae), totalizando nove espécimes (Tabela 2).

Dos nove indivíduos da ordem Anura, foram isoladas 37 culturas leveduriformes, das quais 22 culturas apresentaram características morfológicas presuntivas de *Candida* após a caracterização macroscópica das colônias em BDA (Merck®) com cloranfenicol.

As colônias típicas para *Candida*, foram identificadas, sendo 12 de *Candida glabrata* (54,5%) de coloração violeta, 4 de *C. tropicalis* (18,2%) coloração azul esverdeado-violeta, 2 de *C. krusei* (9,1%) coloração rosa claro, e 4 colônias identificadas como não-*Candida* (18,2%) por apresentarem-se incolores.

A frequência das espécies e suas colorações apresentadas no meio CHROMagar *Candida* estão apresentadas na tabela 3.

As espécies de *Candida* são muito comuns no meio ambiente. Elas causam não apenas infecções superficiais, mas também infecções sistêmicas, incluindo fungemia (Schmidt e Weber, 2001). O gênero *Candida* faz parte da microbiota normal da pele dos humanos, porém em casos específicos pode apresentar patogenicidade.

**Tabela 2.** Espécimes de anfíbios anuros capturados e analisados quanto a microbiota cutânea.

Espécie	Sexo	CRC	MC	Local de captura
<i>Pristimantis cf latro</i>	-	-	-	ZooUnama
<i>Pristimantis cf latro</i>	-	-	-	ZooUnama
<i>Rhinella major</i>	M	38,9	6	UFOPA
<i>Rhinella major</i>	M	40	6	UFOPA
<i>Scinax x-signatus</i>	F	39,2	3,5	UFOPA
<i>Rhinella marina</i>	M	110,2	105	UFOPA
<i>Rhinella marina</i>	F	101,8	105	UFOPA
<i>Rhinella major</i>	M	46,9	9,3	UFOPA
<i>Rhinella major</i>	F	55	15,8	UFOPA

Sexo: Macho (M); Fêmea (F). CRC= Comprimento rostro-cloacal; MC= Massa corporal.

**Tabela 3.** Frequência e coloração dos isolados de *Candida* da microbiota de anfíbios anuros cultivados em meio CHROMagar *Candida*

Espécie	Cores	Frequências
<i>Candida albicans</i>	Verde	-
<i>C. tropicalis</i>	Azul	18,2%
<i>C. krusei</i>	Rosa	9,1%
<i>C. glabrata</i>	Lilás/Violeta	54,5%
Espécies não- <i>Candida</i>	Incolor	18,2%

Assim como na pele de anfíbios, pode ser um agente simbiote, e inclusive fazer parte da sua microbiota residente, não causando danos a esses animais, mas contribuindo para a proteção dos mesmos.

Muitos estudos de modelos animais com *C. albicans* foram relatados tanto em mamíferos como em aves (Velasco, 2000; Sousa e Siqueira, 2003; Moretti *et al.*, 2004; Jin e Lin, 2005; Cafarchia *et al.*, 2006; Jadhav e Pal, 2006; Balasubramaniam e Sukumar, 2007; Garcia *et al.*, 2007; Kivaria e Noordhvizen, 2007; Cafarchia *et al.*, 2008; Jacobsen *et al.*, 2008 e Klinke *et al.*, 2011). Apesar de *C. albicans* ser mais comum e maior causadora de candidoses em humanos e animais, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* também são apontadas como agentes infecciosos. Em relação à diversidade microbiana da pele de anfíbios, apenas o estudo de Douglas e Amuzie (2017) relatou a ocorrência de *Candida* sp. na cavidade bucal, intestinal e cutânea.

De acordo com Assis (2015), alguns componentes da microbiota residente dos anuros, são patógenos oportunistas com os quais os indivíduos normalmente convivem, até que haja um desequilíbrio ambiental e conseqüentemente corporal. Ademais, um estudo realizado por Woodhams *et al.* (2007), analisando duas populações de *Rana muscosa* expostas a *Batrachochytrium dendrobatidis*, um fungo oportunista que coloniza a pele dos anuros causando a quitridiomiose, uma doença responsável pela morte e declínio de populações de anfíbios em quase todo o mundo (Hyatt *et al.*, 2007). Uma dessas populações de *R. muscosa* estava em declínio, com parte da população de indivíduos diminuindo, e a outra resistente às infecções. Nesse estudo, constatou-se que havia uma proporção de indivíduos da população resistente que hospedava pelo menos uma bactéria com ação antifúngica. Portanto, enfatiza-se a importância de estudar a diversidade e as relações biológicas entre microrganismos e seus hospedeiros animais, para compreender quais são os principais fatores que podem ocasionar um desequilíbrio entre esses organismos.

## Conclusões

A análise microbiológica do tecido cutâneo de anuros da região Amazônica identificou as leveduras *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

O meio de cultura CHROMagar foi eficaz na identificação presuntiva das leveduras do gênero *Candida*.

As espécies do gênero *Candida* isoladas podem ser caracterizadas como potenciais agentes patogênicos, no entanto, não há evidências de que estariam causando malefícios aos anfíbios estudados.

## Referências

- AmphibiaWeb. 2018a. [on line]. USA. Disponível em: < [https://amphibiaweb.org/cgi/amphib\\_query?rel-isocc=like&orderbyaw=Order&where-isocc=Brazil](https://amphibiaweb.org/cgi/amphib_query?rel-isocc=like&orderbyaw=Order&where-isocc=Brazil) > Acesso em: 29 de maio de 2018.
- AmphibiaWeb. 2018b. [on line]. USA. Disponível em: < [https://amphibiaweb.org/amphibian/amph\\_index.html](https://amphibiaweb.org/amphibian/amph_index.html) > Acesso em: 30 de maio de 2018.
- Angioletto E 2013. *Isolamento e caracterização de leveduras para produção de sidra*. Florianópolis, Santa Catarina, Brasil (M. Sc Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina. UFSC). 105p.
- Assis AB 2012. Microbiota, secreções cutâneas e microclima: conseqüências para os anfíbios. *Revista da Biologia*, 8:45-48.
- Assis AB 2015. *Microbiota cutânea e secreções dérmicas de Proceratophrys boiei (Amphibia, Anura) em fragmentos de floresta atlântica*. São Paulo, Brasil. (Tese Doutorado. Universidade de São Paulo. USP). 201p.

- Balasubramaniam A, Sukumar S 2007. An overview on outbreaks of candidiasis in poultry. *Tamilnadu Journal Veterinary & Animal Sciences*, 3(3):121-123.
- Cafarchia C, Romito D, Iatta R, Camarda A, Montagna MT, Otranto D 2006. Role of birds of prey as carriers and spreaders of *Cryptococcus neoformans* and other zoonotic yeasts. *Medical Mycology*, 44(6):485-492.
- Cafarchia C, Romito D, Coccioli C, Camarda A, Otranto D 2008. Phospholipase activity of yeasts from wild birds and possible implications for human disease. *Medical Mycology*, 46(5):429-934.
- Colombo BM, Scalvenzi T, Benlamara S, Pollet N 2015. Microbiota and mucosal immunity in amphibians. *Frontiers in Immunology*, 6(111):1-15.
- Crocco EI, Mimica LMJ, Muramatu LH, Garcia C, Souza VM, Ruiz LRB, Zaitz C 2004. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica in vitro: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 79(6):689-697.
- Douglas SI, Amuzie CC 2017. Microbiological quality of *Hoplobatrachus occipitalis* (Amphibia, Anura) used as meat. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(6):3192-3200.
- Feder ME, Burggren WW 1992. *Environmental Physiology of Amphibians*. The University of Chicago Press, Chicago, 472p.
- Fuentefria AM 2004. *Identificação e avaliação do potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados do filoplano do Hibiscus rosa-sinensis*. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil (MSc Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. UFRGS). 131p.
- Herpetofauna. 2018. [on line]. Brasil. Disponível em: <<http://www.herpetofauna.com.br/anfibios.htm>> Acesso em: 28 de maio de 2018.
- Hyatt AD, Boyle DG, Olsen V, Boyle DB, Berger L, Obendorf D, Dalton A, Kriger K, Hero M, Hines H, Phillott R, Campbell R, Marantelli G, Gleason F, Colling A 2007. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 73(3):175-192.
- Garcia ME, Lanzarot P, Rodas VL, Costas E, Blanco JL 2007. Fungal flora in the trachea of birds from a wildlife rehabilitation centre in Spain. *Veterinari Medicina*, 52(10):464-470.
- Jacobsen MD, Bougnoux ME, D'Enfert C, Odds F 2008. Multilocus sequence typing of *Candida albicans* isolates from animals. *Research in Microbiology*, 159(6):436-440.
- Jadhav VJ, Pal M. 2006. Canine mycotic stomatitis due to *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 23(4):233-234.
- Jin Y, Lin D 2005. Fungal urinary tract infections in the dog and cat: a retrospective study (2001-2004). *Journal of the American Animal Hospital Association*, 41(6):373-381.
- Kivaria FM, Noordhuizen JPTM 2007. A retrospective study of the aetiology and temporal distribution of bovine clinical mastitis in smallholder dairy herds in the Dar es Salaam region of Tanzania. *Veterinary Journal*, 173:617-622.
- Klinke T, Guggenheim B, Klimm W, Thurnheer T 2011. Dental caries in rats associated with *Candida albicans*. *Caries Research*, 45(2):100-106.
- Kurtzman CP, Fell J 1998. *The yeasts - A taxonomic study*. 4. ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherlands, 1088p.
- Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, De Melo NT 2002. *Tratado de Micologia Médica*. 9. ed. Sarvier, São Paulo, 1104p.
- Moretti A, Posteraro B, Boncio L, Mechelli L, De Gasperis E, Agnetti F, Raspa M 2004. Diffuse cutaneous candidiasis in a dog - Diagnosis by PCR-REA. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 21(3):139-142.
- Rosenberg E, Koren O, Reshef L, Efrony R, Zilber-Rosenberg I 2007. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 5(5):355-362.
- Santos C 2013. *Caracterização da microbiota presente na pele do anuro Phyllomedusa distincta pela análise da biblioteca do gene do RNAr 16S*. Brasília, Brasil. (Bel Monografia. Universidade Católica de Brasília. UCB). 49p.
- Schmidt A, Weber OF 2001. *Animal Testing in Infectiology*. Contributions to Microbiology. vol. 9. Basel, Karger. 123p.
- Silva JO, Franceschini AS, Candido RC 2002. Presença de leveduras em mucosas e fezes de indivíduos aparentemente saudáveis e de pessoas com sintomas de infecção fúngica. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 61(2):113-120.

- Souza WA, Siqueira, AM 2003. Ocorrência de *Candida albicans* em intestinos de bovinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 55(3):262-265.
- Spolidorio DMP, Boriollo MFG, Estrela C, Spolidorio LC 2009. Diferentes métodos fenotípicos para isolamento e identificação de espécies de Cândida. *Robrac*, 18(45):18-26.
- Sylvain FE, Cheaib B, Llewellyn M, Correia TG, Fagundes DB, Val AL, Derome N 2016. pH drops impact differentially skin and gut microbiota of the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropopum*). *Scientific Reports*, 6:32032.
- Velasco MC 2000. Candidiasis and Cryptococcosis in birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 9(2):75-81.
- Woodhams DC, Vredenburg VT, Simon MA, Bilheimer D, Shakhtour B, Shyr Y, Briggs CJ, Rollins-Smith LA, Harris RN 2007. Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*. *Biological Conservation*, 138(3-4):390-398.

## Contribuição à taxonomia de *Phellinus gilvus* (Schwein.) Pat. (Hymenochaetaceae) da Região Amazônica

Rafaela Saraiva Peres<sup>1</sup>, Maria Aparecida de Jesus<sup>2</sup>, Raimunda Liége Souza de Abreu<sup>2</sup>, Genivaldo Alves-Silva<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Bolsista, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

<sup>2</sup> Pesquisadora, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

<sup>3</sup> PPG Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Emails: rafaelasaraiva82@gmail.com, ranna@inpa.gov.br, raiabreu@inpa.gov.br, genivaldobio@gmail.com

### Resumo

O gênero *Phellinus* foi descrito por Quélet e é um dos mais abundantes da família *Hymenochaetaceae* com aproximadamente 220 espécies. *Phellinus gilvus* (Schwein.) Pat. apresenta uma distribuição Pantropical e é uma espécie de importância tanto ecológica, biotecnológica quanto medicinal. O presente estudo tem como objetivo ampliar o conhecimento da micodiversidade (fúngica) na região Amazônica através da revisão taxonômica do acervo de *Phellinus gilvus* provenientes de áreas de reservas naturais de três estados da região Amazônica. Os exemplares analisados de *P. gilvus* estão depositados na Coleção de Fungos Lignocelulolíticos (INPA) provenientes do Estado do Amazonas, Pará e Roraima. Para a identificação dos fungos foram utilizadas técnicas de taxonomia clássica para fungos poroides e utilização de chaves dicotômicas específicas. Um total de 61 espécimes de *Phellinus* consta no acervo da Coleção, destes, 38 espécimes são de *Phellinus gilvus* e 18 estão inférteis. O estado que apresentou a maior representatividade de *P. gilvus* foi Roraima e o substrato mais recorrente foi tronco caído. No entanto, é possível que se trate de um complexo de espécies crípticas e merece uma abordagem integrativa, aliando diferentes perspectivas, tal como a revisão morfológica e análises moleculares para uma melhor compreensão dos limites entre as possíveis diferentes linhagens existentes nesse grupo.

**Palavras-chaves:** Basidiomycota, diversidade críptica, macrofungo, revisão morfológica.

### Introdução

O gênero *Phellinus* foi descrito por Quélet em 1886 e é um dos mais abundantes da família *Hymenochaetaceae* (Hymenochaetales Oberw.) com aproximadamente 220 espécies. Seus representantes são caracterizados por serem lignocelulolítico degradando a madeira e causando podridão branca (Reck, 2009).

*Phellinus gilvus* (Schwein.) Pat. é uma espécie de importância tanto ecológica, atuando na degradação da madeira e na ciclagem de nutrientes (Reck, 2009), como em processos de biorremediação (Valvi, 2011). Ainda, na Coreia, China e Japão é consumida para fins medicinais, devido suas propriedades antioxidante e antimicrobiana (Yoon e Jang, 2016).

É considerada uma espécie de distribuição pantropical (Ryvarden, 2004). No Brasil, ocorre praticamente em todo o território, sendo reportada para os estados Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Alagoas, Bahia, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina segundo o *website* Flora do Brasil 2020 (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>). Na região Amazônica *P. gilvus* é citada por Gomes-Silva e Gibertoni (2009), Campos *et al.*, (2005) e Martins-Júnior *et al.*, (2011).

O presente trabalho tem como objetivo ampliar o conhecimento da micodiversidade (Funga, Kuhar *et al.*, 2018) na região Amazônica através da identificação taxonômica do acervo de *Phellinus gilvus* provenientes de áreas de reservas naturais de três estados da região Amazônica.

### Material e Métodos

Os exemplares de *Phellinus* estão depositadas na Coleção de Fungos Lignocelulolíticos (CFL/INPA) e são provenientes de diferentes áreas da região Amazônica, tais como: Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD),

Reserva Biológica do Uatumã (RBU), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) localizadas no estado do Amazonas, AM.; Estação Ecológica de Maracá (EEM) e Parque Nacional de Viruá (PNV) no estado de Roraima, RR.; e Fazenda Cauaxi (FC) no estado do Pará, PA. Os espécimes de *P. gilvus* foram coletados em diferentes substratos lignocelulolíticos tais como: árvore morta, galho caído, galho suspenso e tronco caído.

Para a análise macroscópica foram mensurados o comprimento, largura e espessura do basidioma, observados a cor e formato do himenóforo e da superfície do píleo, como também a consistência do basidioma e com auxílio de estereomicroscópio os poros por mm e camadas de tubos foram anotados.

Quanto a análise microscópica, foram realizados cortes à mão livre com o auxílio de lâmina de aço da superfície himenial e abhimenial do basidioma, conforme Teixeira (1995). Os cortes foram montados entre lâminas e lamínulas para análise com o auxílio de microscópio óptico para caracterização e mensuração (em 1000x, sob ocular micrometrada) das estruturas microscópicas: sistema hifal, basidiósporos e elementos estéreis (setas, cystídios). Foram utilizados o reagente de Melzer (IKI), solução aquosa de KOH 3% e Azul de Algodão (Cotton Blue) para a verificação de reação dextrinoide ou amiloide dos basidiósporos e/ou hifas, determinar a reação xantocroica e verificar a reação cianófila, respectivamente (Teixeira, 1995; Reck, 2009).

Na caracterização macroscópica foi dada prioridade para a confirmação de exemplares que aparentemente apresentavam características de *P. gilvus*. No entanto, estas divergem das descritas para a espécie. Com isso, a identificação dos espécimes seguiu as descrições publicadas por Ryvarden e Johansen (1980), Ryvarden (2004) e nas informações disponíveis no site <http://www.mycobank.com> e <http://www.indexfungorum.org>.

Todos os dados de coleta, como nome do coletor, substrato, local e data de coleta foram informatizados de acordo com o programa BRAHMS (*Botanical Research and Herbarium Management System*) adotado pelo Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA.

## Resultados e Discussão

Um total de 61 espécimes de *Phellinus* consta no acervo da Coleção, destes, 38 espécimes são de *Phellinus gilvus* e 18 estão inférteis. Com relação à distribuição, 17 espécimes de *P. gilvus* foram do Amazonas, 11 de Roraima e 7 do Pará. E isso se dá pelo esforço amostral ter sido maior no estado do Amazonas em comparação com os outros estados. O substrato de maior preferência pelo macrofungo foi tronco caído (Tabela 1). Apesar de *P. gilvus* ser reportado geralmente em substrato em estado de decomposição, este foi também encontrado em árvore viva o que pode indicar que se trata de um fungo generalista. Segundo Ryvarden (2004), *P. gilvus* apresenta uma distribuição Pantropical e uma ampla variação morfológica. Portanto, é possível que se trate de um complexo de espécies crípticas, tornando-se necessário uma abordagem integrativa, somando, por exemplo, revisão morfológica e análises moleculares para um melhor entendimento dos limites entre uma linhagem ou outro dentro desse grupo.

**Tabela 1.** Ocorrência de *Phellinus gilvus* em diferentes substratos de três Estados da Amazônia brasileira.

Estado/Local	Substrato						Total
	AV	AM	TC	GS	MB	GC	
Amazonas RFAD	-	-	3	2	-	-	5
INPA	2	-	3	-	2	-	7
RBU	-	-	2	1	-	-	3
ZF-2	-	-	1	1	-	-	
Subtotal	2	0	9	4	2	0	17
Roraima EEM	-	-	4	2	-	1	7
PNV	-	-	4	-	-	-	4
Subtotal	0	0	8	2	0	1	11
Pará FC	3	-	4	-	-	-	4
Subtotal	3	0	4	0	0	0	7
Total	5	0	21	6	2	1	35

Local: RFAD = Reserva Florestal Adolpho Ducke, INPA = Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, RBU = Reserva Biológica do Uatumã, ZF-2 = Estação Experimental de Silvicultura Tropical, PNV = Parque Nacional do Viruá, EEM = Estação Ecológica de Maracá, FC = Fazenda Cauaxi. Substrato: AV = árvore viva, AM = árvore morta, TC = tronco caído, GS = galho suspenso, MB = madeira beneficiada, GC = galho caído.

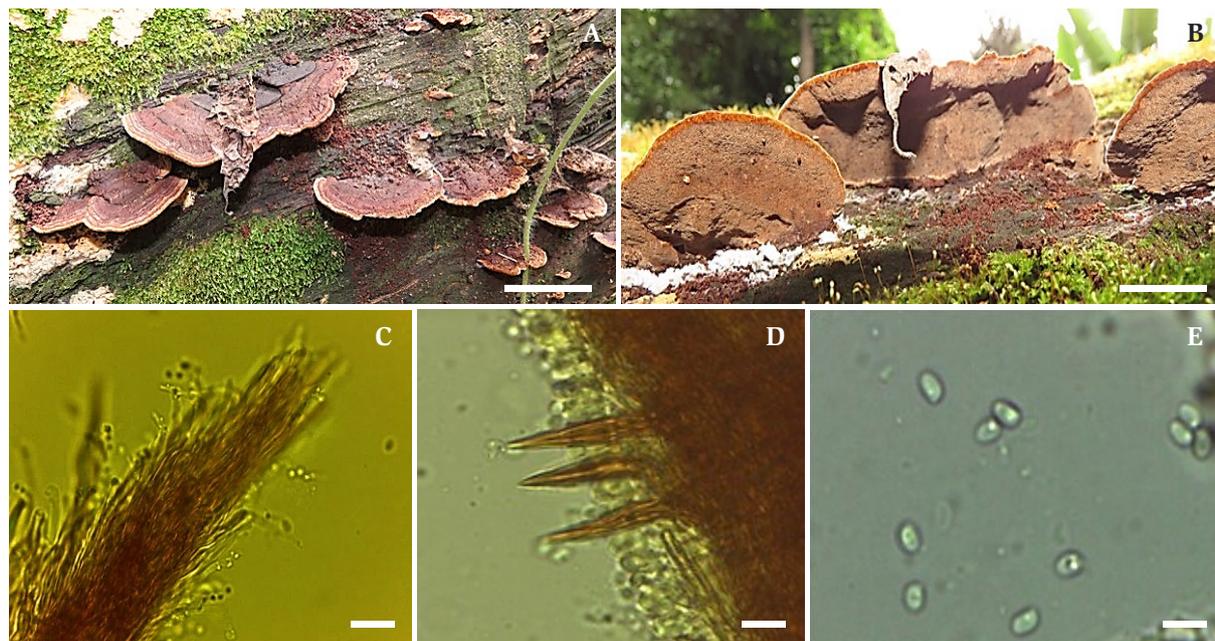
*Descrição taxonômica*

*Phellinus gilvus* (Schwein.) Pat., Essai Tax. Hyménomyc. 82. 1900.

≡ *Boletus gilvus* Schwein. Schr. naturf. Ges Leipzig 1:96, 1822.

**Características macroscópicas** – Basidioma anual a perene, pileado a efuso-reflexo, solitário a imbricado. Píleo dimidiado, lenhoso. Superfície pilear finamente velutina a glabra, concêntrica zonada, sulcada ou não, castanho-escuro a marrom-amarelado, margem velutina a glabra, aguda ou não, amarelada a castanha. Superfície himenial poroide, poros circulares, 6-8 por mm, castanho-ferrugíneo, tubos concolores à superfície himenial (Figura 1. a, b). Contexto homogêneo, castanho-ferrugíneo. Reação positiva em KOH. **Características microscópicas** – Sistema hifal dimítico, hifas não amiloides; hifas generativas com septos simples, parede fina a ligeiramente espessa, 2,5-3,5  $\mu\text{m}$  de espessura, geralmente encrustadas; hifas esqueléticas castanho-escuro, de parede espessa, 3-5  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Setas presentes, subuladas a ventricosas, castanha-ferrugínea em KOH, parede espessada, 15-45  $\times$  5-10  $\mu\text{m}$ . Basídios clavados. Basidiósporos elipsoides a oblongo elipsoides, hialinos, negativo em Melzer (IKI-), parede fina, liso, 3,5- 4-5  $\times$  2,5-3,5 (-4)  $\mu\text{m}$  (Figura 1. c, d, e).

Material examinado: BRASIL. Amazonas: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (CFL 2293, 5841, 12239, 2908, 2284, 2295, 12263, 12255, 12339, 12263, 12255, 12529), Reserva Florestal Adolpho Ducke (CFL 3120, 3122, 3123), Reserva Biológica do Uatumã (CFL 5222, 5227, 5228). Roraima: Estação Ecológica de Maracá (CFL 4024, 7200, 4146, 4119, 4140, 5867), Parque Nacional do Viruá (CFL 6541, 6405, 6403, 7217). Pará: Fazenda Cauaxi (CFL 4966, 5106, 5104, 2284, 4971, 5027, 4970).



**Figura 1.** Basidiomas de *Phellinus gilvus* (CFL 12239). A) superfície abhimenial, B) superfície himenial, C) hifas encrustadas (em Melzer), D) setas (em Melzer), E) basidiósporos (em KOH 3%). Barras: a, b = 3 cm; c-e = 7 $\mu\text{m}$ .

**Conclusões**

A maior representatividade de *Phellinus gilvus* foi no Estado de Roraima.

O substrato mais recorrente para *Phellinus gilvus* foi tronco caído.

## Referências

- Campos EL, Sotão HMP, Cavalcanti MAQ, Luz AB 2005. Basidiomycetes de Manguezai da APA de Algodual-Maiandeuá, Pará, Brasil. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi*, 1(1): 141-146.
- Donk MA 1964. A conspectus of the families of Aphyllophorales. *Persoonia*, 3: 199-324.
- Gomes-Silva AC, Gibertoni TB 2009a. Revisão do Herbário URM. Novas ocorrências de Aphyllophorales para a Amazônia brasileira. *Revista Brasileira de Botânica*, 32(1): 587-596.
- FLORA DO BRASIL 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, *Hymenochaetales* em construção Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB92814> > ACESSO EM: 02 DEZ. 2019.
- INDEX FUNGORUM NAMES 2018. Disponível em: < [www.indexfungorum.org/names](http://www.indexfungorum.org/names) > Acesso em 02 dez. 2019.
- Kuhar, F, Furci, G, Drechsler-Santos, ER, Pfister, DH 2018. Delimitation of Funga as a valid term for the diversity of fungal communities: the Fauna, Flora & Funga proposal (FF & F). *IMA Fungus*, 9(2), 71-74.
- Martins-Júnior AS, Gibertoni TB, Sotão HMP 2011. Espécies de *Ganoderma* P. Karst (Ganodermataceae) e *Phellinus* Quél. (Hymenochaetaceae) na Estação Científica Ferreira Penna, Pará, Brasil. *Acta Botânica Brasilica*, 25(3): 531-533.
- MYCOBANK 2016. Disponível em: < [www.mycobank.org](http://www.mycobank.org) > Acesso em 30 nov. 2019.
- Quelet L 1886. Enhiridion fungorum in Europa media et praesertim in Gallia Vigentium. *Lutetiae*, 352p.
- Reck, MA 2009. *Políporos (Basidiomycota) em remanescentes de Mata Atlântica sensu stricto no Rio Grande do Sul*. Rio Grande do Sul, Brasil. (Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. UFRGS). 88p.
- Ryvarden L 2004. Neotropical Polypores. Part 1. Introduction, Hymenochaetaceae and Ganodermataceae. *Synopsis Fungorum*, 19:1-227.
- Ryvarden L, Johansen IA 1980. *Preliminary Flora of East Africa*. Oslo: Fungi Flora, 636p.
- Teixeira AR 1995. *Método para o estudo das hifas do basidiocarpo de fungos poliporáceos*. Instituto de Botânica, São Paulo, 20p.
- Valvi MB 2011. Fungos basidiomicetos em biorremediação. *Instituto de Botânica de São Paulo – IBt*, 23p.
- Yoon KN, Jang HS 2016. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Fruiting Bodies of *Phellinus gilvus* Collected in Korea. *The Korean Society for Clinical Laboratory Science*, 48(4):355-364.

## Vestígios de transmissão horizontal de bactérias cultiváveis em *Anopheles darlingi* Root, 1926

Elerson Matos Rocha<sup>1</sup>, Deidre Machado Serrão<sup>2</sup>, Laura Viana Correa<sup>2</sup>, Ricardo de Melo Katak<sup>1</sup>, Juan Campos de Oliveira<sup>1</sup>, Veranilce Alves Muniz<sup>2</sup>, Joaquim Ferreira<sup>3</sup>, Jairo da Silva Rocha Filho<sup>4</sup>, Marcos Cézar Fernandes Pessoa<sup>5</sup>, Wanderli Pedro Tadei<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Doutorando em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas

<sup>2</sup> Mestra em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Universidade do Estado do Amazonas

<sup>3</sup> Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

<sup>4</sup> Graduado em Química, Universidade do Estado do Amazonas

<sup>5</sup> PHD, Universidade Federal do Amazonas

<sup>6</sup> Pesquisador, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Emails: elerson.matos@hotmail.com, deidre.machado@hotmail.com, laura\_v.c@hotmail.com, ricardokatak@hotmail.com, juan\_16\_oliveira@hotmail.com, veralves2@gmail.com, joaquimfnn@gmail.com, jairo-rocha61@gmail.com, mrpessoa@outlook.com, wptadei@gmail.com

### Resumo

O habitat aquático, onde se desenvolvem larvas de mosquitos vetores de doenças, é um lugar repleto de vida microscópica. Além de contribuir para o equilíbrio da biota no local, os microrganismos presentes nesse ambiente podem influenciar na oviposição de fêmeas de mosquitos, na composição da sua microbiota intestinal e no desenvolvimento das larvas. Estudos voltados à paratransgênese, que visa bloquear o desenvolvimento de patógenos dentro de vetores, por meio de microrganismos simbiotes geneticamente modificados, se apresentam como uma alternativa viável para substituir métodos tradicionais de controle vetorial que utilizam inseticidas químicos, tóxicos ao meio ambiente e a espécie não-alvo. Conhecer espécies bacterianas simbiotes que sejam encontradas no hábitat aquático, larvas e em mosquitos adultos é um grande salto para a introdução da paratransgênese no controle da malária e outras doenças vetoriais na Região Norte do Brasil. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo detectar bactérias cultiváveis que apresentam características de transmissão horizontal em *Anopheles darlingi* Root, 1926. Por meio de seleção fenotípica e sequenciamento do rDNA 16S de 46 bactérias, foram detectados vestígios de transmissão horizontal das espécies *Chromobacterium violaceum* e *Serratia marcescens* em *A. darlingi* na cidade de Manaus-Am.

**Palavras-chave:** Bactérias simbiotes, Paratransgênese, Alternativas de controle.

### Introdução

Bactérias simbiotes vivem em associação com os mais variados organismos, além disso, desempenham funções essenciais no desenvolvimento, proteção e nutrição de insetos (Favia *et al.*, 2008; Minard *et al.*, 2013).

No interior do corpo dos mosquitos, a composição e número de bactérias variam dependendo de alguns fatores, como espécie, fase de desenvolvimento, hábitos alimentares e hábitat (Douglas, 2011; Gendrin e Christophides, 2013; Minard *et al.*, 2013). Mosquitos hematófagos, por exemplo, são capazes de abrigar uma elevada população bacteriana simbiótica, principalmente após uma refeição sanguínea, onde microrganismos atuam na síntese de nutrientes necessários para o desenvolvimento de larvas e adultos (Wang e Jacobs-Lorena, 2017).

O processo de obtenção de bactérias simbiotes em mosquitos envolve três tipos de transmissão: vertical, horizontal e transestadial. Aqui será relatada a transferência horizontal, onde as bactérias simbiotes presentes no ambiente são geralmente adquiridas na fase larval ou juvenil. Neste período de vida dos mosquitos, que sucede a embriogênese, o hospedeiro passa por uma fase aposimbiótica, na qual não possui microrganismos simbiotes, ficando suscetível a adquiri-los, principalmente no seu hábitat aquático (Bright e Bulgheresi, 2010).

Devido à relação estável entre microrganismos e mosquitos e o papel que desempenham neste hospedeiro, bactérias simbiotes têm sido propostas como uma alternativa promissora no controle de importantes doenças vetoriais, como a malária. Nesta abordagem, denominada Paratransgênese, as bactérias simbiotes geneticamente modificadas são re-introduzidas no vetor para expressar moléculas anti-*Plasmodium* que interferem no desenvolvimento do parasita ou bloqueiam sua transmissão, tornando-o um vetor ineficaz (Durvasula *et al.*, 1997; Beard *et al.*, 2002; Wang e Jacobs-Lorena, 2017).

Para uma aplicação paratransgênica, estes microrganismos simbiotes devem ser prevalentes no interior do corpo dos adultos e larvas e no hábitat aquático dos anofelinos, isto é, que se dispersam na forma horizontal e, além disso, devem ser cultiváveis e manipuláveis geneticamente (Favia *et al.*, 2008).

Neste trabalho, são fornecidos dados importantes sobre vestígios de transmissão horizontal de bactérias cultiváveis oriundas do hábitat aquático em *Anopheles darlingi*, o principal vetor da malária na região Amazônica. Diante disso, objetivou-se detectar bactérias cultiváveis que apresentam características de transmissão horizontal em *A. darlingi*.

## Material e Métodos

As coletas do material para este estudo foram realizadas em abril de 2017, no município de Manaus - AM, mais precisamente no Sítio Portela, situado no bairro Puraquequara, cujas coordenadas são 3°02'46.6"S 59°52'56.8"W.

Em um lago, caracterizado por apresentar grandes procriações de anofelinos, principalmente de *A. darlingi*, amostras de água foram coletadas em dois pontos, onde este foi dividido. Estas amostras foram coletadas utilizando uma tela de malha de aço inoxidável esterilizada medindo 400 cm<sup>2</sup>, com um tamanho de malha de 1,25 e 0,36 milímetro de diâmetro (Agogue *et al.*, 2004).

A coleta de larvas foi realizada no início da manhã, por um tempo de 5 minutos, seguindo as mesmas divisões de pontos propostas na coleta de água. Para esta, foi utilizada uma concha entomológica padrão, esterilizada, de capacidade volumétrica de 350 mL, abertura de 11 cm e cabo de manuseio de um metro, onde, após coletadas, as amostras foram transferidas para depósitos de plásticos esterilizados e armazenados em isopor com gelo.

Para coleta de mosquitos adultos, foi utilizado um capturador de castro. Os mosquitos coletados foram transferidos para copos parafinados com a abertura protegida com o tecido do tipo filó contendo algodão e preso com liga de borracha. Esta coleta foi realizada ao fim da tarde, no galinheiro existente no Sítio Portela. Larvas e adultos de *A. darlingi* foram identificados individualmente em microscópio estereoscópico, utilizando-se a chave de identificação de Consoli e Oliveira (1994).

As amostras de larvas e adultos foram lavadas primeiro por imersão em água estéril, depois em uma solução de álcool 70% e novamente lavadas em água estéril. Após isso, as amostras foram centrifugadas por 3 min a 8.000 rpm. Em câmara de segurança biológica, 50 µL de cada amostra (água, solução com larvas e adultos macerados) foram inoculados em placas de Petri contendo o meio de cultivo Ágar Nutrient (NA) e fluconazol, para impedir o crescimento fúngico. Estas foram armazenadas por 48 h a 29 °C em uma estufa incubadora B.O.D.

O isolamento consistiu em selecionar colônias bacterianas crescidas nas placas e transferi-las para outras placas de Petri contendo o mesmo meio de cultivo, desta vez sem fluconazol, realizando a técnica do esgotamento por estrias cruzadas.

Os isolados foram reunidos em grupos de acordo com morfologia macroscópica, que consistiram na cor, textura e forma, bem como a morfologia microscópica detectada na coloração de Gram. Todos os isolados encontram-se estocados em freezer 80°C em microtubos de 2 mL contendo o caldo do meio NA e glicerol a 20% (v/v).

A extração de DNA genômico foi realizada com o produto InstaGene TM – Matrix da BIO-RAD, seguindo as recomendações do fabricante. A quantidade de DNA foi ajustada em 10 ng/µL para a PCR.

As reações de amplificação do gene 16S consistiram em um volume final de 25 µL (1,5 µL MgCl<sub>2</sub>; 2,5 µL Tampão 10X; 0,5 µL dNTP; 0,125 µL Taq polimerase; 18,375 µL H<sub>2</sub>O milli-Q; 1 µL DNA e 0,5 µL de cada Primer 8f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') e 1401R (5'- CCG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG -3')) e realizadas em termociclador Thermal Cycler®. O perfil térmico da PCR consistiu de um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 3 min, seguido por 35 ciclos como segue: desnaturação das fitas-molde a 94 °C por 25 seg, pareamento dos iniciadores a 62 °C por 25 seg e extensão a 72 °C por 1 min e 25 seg. Ao final, um ciclo de extensão a 72 °C por 5 min (Boichenko, 2000). Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados após a eletroforese em gel de agarose (0,8%, p/v) e corados com solução de brometo de etídio (0,005%, p/v), onde o registro das imagens foi feito em fotodocumentador (Eagle Eye II, Stratagene).

Os fragmentos de rDNA 16S amplificados na reação de PCR foram purificados utilizando kit QIAquick™ PCR Purification (QIAGEN), de acordo com as recomendações do fabricante. Uma alíquota de 200ng do DNA purificado foi usada como matriz para as reações de sequenciamento, nas quais foi utilizado o kit de sequenciamento Big Dye Terminator V 3.1. (Life Technologies) e 0,5µM do mesmo oligonucleotídeo utilizado para a reação de PCR. As reações de sequenciamento foram precipitadas com etanol, inseridas no equipamento ABI 3500 XL (Applied Biosystems) para a determinação das sequências. As sequências foram analisadas nos programas PHRED/CAP3, disponível no site do Laboratório de Biologia Molecular da UNB.

As sequências resultantes foram comparadas com sequências bacterianas depositadas na base de dados do NCBI.

## Resultados e Discussão

As relações simbióticas entre bactérias e anofelinos vêm sendo relatadas como importantes para o processo de desenvolvimento dos mosquitos na natureza (Terenius *et al.*, 2008; Capone *et al.*, 2013; Villegas e Pimenta, 2014). Além disso, podem contribuir para a introdução de novos métodos de controle de doenças zoonóticas.

Neste estudo, foram isoladas 285 bactérias de amostras de larvas e adultos de *A. darlingi* e água de um criadouro natural de anofelinos do Município de Manaus (Tabela 1), demonstrando, dessa forma, a existência de uma gama de bactérias vivendo em associação com larvas e adultos de *A. darlingi* em criadouros desta região.

Os isolados deste trabalho foram reunidos de acordo com as semelhanças fenotípicas em 19 grupos, onde cada um teve três representantes submetidos à identificação molecular do gene rDNA 16S, totalizando 57 isolados, dos quais 46 tiveram suas sequências analisadas, o que configura o resultado aqui apresentado. Este procedimento, se assemelha ao realizado por Yadav *et al.* (2015), onde foram identificadas bactérias associadas ao trato intestinal de duas espécies de mosquitos *Aedes* na Índia.

Os isolados bacterianos identificados pertencem a 11 gêneros dos filos Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes com os respectivos predomínios, 46%, 30%, 20% e 4%. Dentre os gêneros, o mais predominante foi o *Bacillus*, seguido de *Chromobacterium*, os demais apresentaram apenas uma espécie (Tabela 2).

Ngo *et al.* (2015) detectaram em amostras de mosquitos adultos do gênero *Anopheles*, capturados no Vietnã, um número de filos similar ao detectado neste trabalho, porém com predomínio maior de Proteobacteria que somou 73% dos gêneros identificados.

**Tabela 1.** Números de isolados e grupos bacterianos do ponto 1 e 2 de água, larvas e adultos de *A. darlingi* do Município de Manaus.

Amostras	Ponto 1	Ponto 2	Número de isolados	Grupos Bacterianos
Água	56	69	125	8 (G1-G8)
Larvas	46	51	97	5 (G9-G13)
Adultos	36	27	63	6 (G14-G19)

**Tabela 2.** Filo, gêneros e espécies de bactérias identificadas nas amostras do habitat aquático, larvas e adultos de *A. darlingi* do Município de Manaus/AM.

Filo	Genero/Espécie	Água	Larvas	Adulto	Total
Proteobacteria	<i>Acinetobacter nosocomiales</i>	1	1	-	2
	<i>Chromobacterium</i> sp	2	1	-	3
	<i>Chromobacterium violaceum</i>	3(G4)	1(G9)	1(G17)	5
	<i>Klebsiella</i> sp	2	-	-	2
	<i>Pseudomonas genculata</i>	2	1	-	3
	<i>Serratia marcescens</i>	4 (G1/G6)	1 (G10)	1 (G19)	6
Firmicutes	<i>Bacillus</i> sp	2	1	2	5
	<i>Bacillus megabacterium</i>	1	2	-	3
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	3	1	-	4
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2	-	-	2
Actinobacteria	<i>Arthrobacter protophormiae</i>	1	1	-	2
	<i>Brachybacterium conglomeratum</i>	3	2	-	5
	<i>Tsukamurella paurometabola</i>	1	1	-	2
Bacteroidetes	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	2	-	-	2

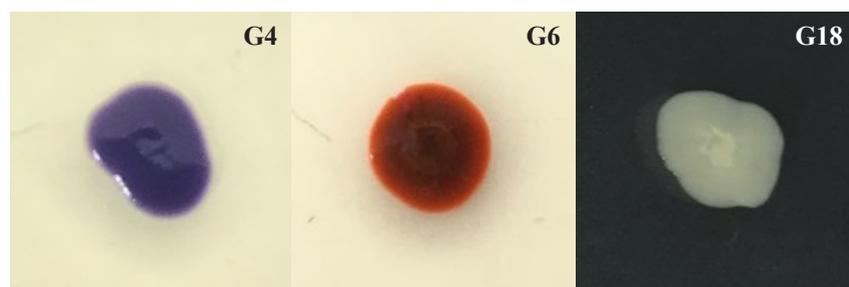
Apesar de serem morfológicamente semelhantes, apenas os grupos G4, G6 e G18 tiveram seus três representantes definidos como a mesma espécie, sendo estes identificados com *Chromobacterium violaceum*, *Serratia marcescens* e *Bacillus thuringiensis* respectivamente (Figura 1). Os grupos G2, G5, G8, G13 e G15 apresentaram duas espécies cada, os demais grupos G1, G3, G7, G9, G10, G11, G12, G14, G16, G17 e G19 três espécies distintas.

Entre todos os isolados identificados, foi observado que somente as espécies *C. violaceum*, *S. marcescens* foram detectadas nas amostras de água, larvas e adultos. *C. violaceum* nos grupos G4, G9 e G17. *S. marcescens* nos grupos G1, G6, G10 e G19. Dessa forma, pressupõe-se serem vestígios que configuram a característica de transmissão horizontal destas duas espécies em *A. darlingi*.

Tal característica é um fator importante para considerar bactérias simbiotes e utilizá-las na paratransgenia, visando o controle da malária (Riehle *et al.*, 2007; Favia *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012; Wang e Jacobs-Lorena, 2013 e Mancini *et al.*, 2016).

A espécie *S. marcescens* já foi relatada em muitos trabalhos como um microrganismo comum em associação com mosquitos do gênero *Anopheles* (Ngo *et al.*, 2015 e Wang *et al.*, 2017). Uma cepa desta espécie, geneticamente modificada, apresentou um nível significativo de secreção das proteínas efetoras anti-*Plasmodium* ((MP2)<sub>2</sub>, scorpine, (EPIP)<sub>4</sub>, Shiva1, (SM2)<sub>2</sub>) e foi eficiente na mortalidade do parasita *Plasmodium falciparum* (Wang *et al.*, 2017).

No trabalho realizado por Ramirez *et al.* (2014), uma espécie do gênero *Chromobacterium* (Csp\_P), isolada a partir do intestino médio de *A. aegypti* capturados em campo no Panamá, apresentou potencial para colonizar o intestino médio do mosquito do gênero *Anopheles* e reduziu significativamente a susceptibilidade a *P. falciparum*, comprometendo a competência vetorial do mosquito (Ramirez *et al.*, 2014). Não foram encontrados estudos relacionados a utilização de *C. violaceum* na paratransgênese.

**Figura 1.** G4 *C. violaceum*; G6 *S. marcescens*; G18 *B. thuringiensis*.

Para serem caracterizadas como possíveis bactérias de transmissão horizontal em *A. darlingi*, as cepas *C. violaceum* e *S. marcescens* ainda precisam passar outros testes, como por exemplo, o monitoramento, que se dá pela transformação genética das mesmas com marcadores fluorescentes, em seguida, reintroduzi-las nas amostras para que possam ser analisadas quanto ao nível de prevalência.

## Conclusões

A grande quantidade de criadouros naturais e artificiais existentes na vasta região Amazônica do Brasil influencia positivamente na prevalência dos mosquitos do gênero *Anopheles* e conseqüentemente nos elevados números de casos registrados de malária. Por meio da bioprospecção da microbiota bacteriana que vive associada a anofelinos desta região, podemos conhecer espécies simbiotes que apresentam todos os requisitos, inclusive a transmissão horizontal, para serem utilizadas no controle da malária por novos métodos de controle, como a paratransgênese.

## Referências

- Agogue H, Casamayor E, Joux F, Obernosterer I, Dupuy C, Lantoin F 2004. Comparison of samplers for the biological characterization of the sea surface microlayer. *Limnology and oceanography - methods*, 2:213–225.
- Beard CB, Cordon-Rosales C, Durvasula R 2002. Bacterial symbionts of the Triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission. *Annual Review of Entomology*, 47:123–41.
- Boichenko VA, Klimov VV, Miyashita H, Miyachi S 2000. Functional characteristics of chlorophyll *d*-predominant photosynthetic apparatus in intact cells of *Acaryochloris marina*. *Photosynthesis Research*, 65:269–277.
- Bright M, Bulgheresi S 2010. A complex journey: transmission of microbial symbionts. *Nature reviews Microbiology*, 8(3):218–230.
- Capone A, Ricci I, Damiani C, Mosca M, Rossi P, Scuppa P, Favia G 2013. Interactions between *Asaia*, *Plasmodium* and *Anopheles*: new insights into mosquito symbiosis and implications in malaria symbiotic control. *Parasites & Vectors*, 6(1):182.
- Consoli R A, Lourenço-De-Oliveira R 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Editora FIOCRUZ, p. 228.
- Douglas AE 2011. Lessons from studying insect symbioses. *Cell Host Microbe*, 10(4):359–367.
- Durvasula R, Gumbs A, Panackal A, Kruglov O, Aksoy S, Merrifield R, Richards F, Beard C 1997. Prevention of insect-borne disease: An approach using transgenic symbiotic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7):3274–3278.
- Favia G, Ricci I, Damiani C, Raddadi N, Crotti E, Marzorati M, Rizzi A, Urso R, Brusetti L, Borin S, Mora D, Scuppa P, Pasqualini L, Clementi E, Genchi M, Corona S, Negri I, Grandi G, Alma A, Kramer L, Esposito F, Bandi C, Sacchi L, Daffonchio D 2007. Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104:9047–9051.
- Favia G, Ricci I, Marzorati M, Negri I, Alma A, Sacchi L, Bandi C, Daffonchio D 2008. Bacteria of the genus *Asaia*: A potential paratransgenic weapon against malaria. In: *Transgenesis and the Management of Vector-Borne Disease. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 627:49–59.
- Gendrin M, Christophides GK 2013. The *Anopheles* mosquito microbiota and their impact on pathogen transmission. In: *Anopheles Mosquitoes - New Insights into Malaria Vectors. Intech Open Science*, 17:525–548.
- Mancini, M, Spaccapelo R, Damiani C, Accoti A, Tallarita M, Petraglia E, Favia G. 2016. Paratransgenesis to control malaria vectors: a semi-field pilot study. *Parasites & Vectors*, 9:140.
- Minard G, Mavingui P, Moro CV 2013. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasites & Vectors*, 6:146.
- Ngo CT, Aujoulat F, Veas F, Jumas-Bilak E, Manguin S 2015. Bacterial diversity associated with wild caught *Anopheles* mosquitoes from DakNong Province, Vietnam Using Culture and DNA Fingerprint. *Plos One*, 10(3):18.
- Ramirez JL, Short SM, Bahia AC, Saraiva R, Dong Y 2014. *Chromobacterium Csp* Produces malaria and dengue infection in vector mosquitoes and has entomopathogenic and in vitro anti-pathogen activities. *PLoS Pathogens*, 10(10):e1004398.

- Riehle MA, Moreira CK, Lampe D, Lauzon C, Jacobs-Lorena M 2007. Using bacteria to express and display anti-*Plasmodium* molecules in the mosquito midgut. *International Journal of Parasitology*, 37(6):595–603.
- Terenius O, De Oliveira CD, Pinheiro WD, Tadei WP, James AA, Marinotti O 2008. 16S rRNA gene sequences from bacteria associated with adult *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) Mosquitoes. *Journal of Medical Entomology*, 45(1):172–5.
- Villegas LM, Pimenta PF 2014. Metagenomics, paratransgenesis and the *Anopheles* microbiome: a portrait of the geographical distribution of the anopheline microbiota based on a meta-analysis of reported taxa. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(5):672–84.
- Wang S, Ghosh AK, Bongio N, Stebbings KA, Lampe DJ, Jacobs-Lorena M 2012. Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31):12734–12739.
- Wang S, Jacobs-Lorena M 2017. Paratransgenesis applications: Fighting malaria with engineered mosquito symbiotic bacteria. In: Arthropod Vector: Controller of Disease Transmission. *Vector Microbiome and Innate Immunity of Arthropods*, 13(1):219–234.
- Wang S, Dos-Santos ALA, Huang W, Liu KC, Oshaghi MA, Wei G, Agre P, Jacobs-Lorena M 2017. Driving mosquito refractoriness to *Plasmodium falciparum* with engineered symbiotic bacteria. *Science*, 359:1399–1402.
- Wang S, Jacobs-Lorena M 2013. Genetic approaches to interfere with malaria transmission by vector mosquitoes. *Trends in Biotechnology*, 31:185–193.
- Yadav KK, Bora A, Datta S, Chandel K, Gogoi HK, Prasad GBKS, Veer V 2015. Molecular characterization of midgut microbiota of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* from Arunachal Pradesh, India. *Parasites & Vectors*, 8:641.

## Efeito antifúngico do extrato bruto dos resíduos madeireiros de *Hymenaea* sp. e *Dipteryx* sp.

Sara Freitas Sousa<sup>1</sup>, Aline Aparecida Müncher Kasper<sup>1</sup>,  
José Jeosafá Vieira de Sousa Júnior<sup>2</sup>, Silvia Katrine Rabelo da Silva<sup>2</sup>,  
Victor Hugo Pereira Moutinho<sup>3</sup>, Lauro Euclides Soares Barata<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Naturais Bioativos da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA (sara\_freitas\_stm@hotmail.com; aliny\_@msn.com.br; lauroesbarata@gmail.com)

<sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Oeste do Pará (josejeosatajrstm@hotmail.com; katrine-rabelo@gmail.com)

<sup>3</sup>Laboratório de Tecnologia da Madeira da Universidade Federal do Oeste do Pará (victormoutinho@ufopa.edu.br)

### Resumo

A Amazônia exporta anualmente mais de dez milhões de toneladas de madeira e 40% deste volume é desprezado como resíduo. Deste modo, objetivou-se avaliar a composição química de extratos etanólicos do resíduo de *Hymenaea* sp. e *Dipteryx* sp. e verificar seu potencial antifúngico. Foram obtidos resíduos florestais de árvores de jatobá (*Hymenaea* sp.) e cumarú (*Dipteryx* sp.), provenientes de uma área de manejo florestal próximo a cidade de Santarém, Pará. Foram obtidos em aparelho Soxhlet o extrato bruto e analisados as principais classes presentes por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), a concentração mínima inibitória (CMI) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). Os rendimentos obtidos foram de 16,09% (*Hymenaea* sp.) e 8,82% (*Dipteryx* sp.). No extrato de *Hymenaea* sp. verificou-se a presença de terpenos, flavonoides e taninos e no extrato de cumarú, flavonoides e compostos fenólicos, cumarina, terpenos. O extrato de cumarú foi efetivo contra *F. oxysporum* (1000 µg.mL<sup>-1</sup>), sendo este fungistático. Para *M phaseolina* constatou-se ação fungicida em 125 µg.mL<sup>-1</sup>. Para o extrato de Jatobá verificou-se ação fungistática em 125 µg.mL<sup>-1</sup> frente a *T. versicolor*. Conclui-se que dentre os extratos testados, o de *Hymenaea* sp. é o mais ativo, sendo uma fonte natural efetiva no controle desses fungos.

**Palavras-chave:** Controle alternativo, microrganismos, resíduos madeireiros.

### Introdução

A produção de madeira na Amazônia atinge mais de 10 milhões de tonelada métrica ao ano. Considerando que cerca de 40-50% das operações correspondem a resíduos madeireiros, percebe-se uma enorme oportunidade para o uso desses resíduos na região.

O jatobá (*Hymenaea* sp.) pertence à família Fabaceae. É amplamente distribuído na América Central e do Sul, ocorre de forma dispersa nas matas de terra firme e de certas várzeas altas, e com maior frequência em solos argilosos e pobres. A árvore tem entre 10 a 15 m de altura, podendo atingir até 30 m na Amazônia, e apresenta as copas amplas e densas, casca cinza prateada, troncos retos, mais ou menos cilíndricos que podem atingir até 2 m de diâmetro (Carvalho Filho, 2003; Shanley e Nascimento, 2009).

Estudos revelam a ação anestésica, analgésica e antiinflamatória provenientes dos extratos do caule do jatobá, sendo estes utilizados para os mais diversos fins, como o súber do caule, na forma de xarope e chá para o tratamento de problemas respiratórios, inflamações, ferimentos, reumatismo, dores no estômago, no peito, e na coluna, além da resina existente no caule ser utilizada como cicatrizante (Cipriano *et al.*, 2014).

O processo de industrialização acarreta a geração de resíduos, que em sua maioria não é reaproveitado, sendo diretamente eliminados, sem ter um tratamento e nem destinação adequada. E com relação a este gênero, segundo o Sistema de Comercialização e Transporte de Produtos Florestais - SISFLORA entre 2009 e 2015, foram colhidos legalmente 194.767.661 m<sup>3</sup> de jatobá, gerando mais de 750.000 m<sup>3</sup> de resíduos na forma de galho acima de 20 cm de diâmetro (Kern *et al.*, 2010; Silva Ribeiro *et al.*, 2013).

Por outro lado, constata-se também grande importância de outros gêneros para o setor florestal, como o *Dipteryx* sp., pertencente a ordem Fabales e família Fabaceae (Cronquist classifica como Leguminosae); e subfamília Faboideae (Papilionoideae) (Souza e Lorenzi, 2012; Carvalho, 2009). Nesse gênero são registrados 33 nomes de plantas correspondentes, no entanto os nomes aceitos e utilizados para se referir às espécies (ou a uma subespécie, variedade ou forma) são: *D. alata* Vogel, *D. lacunifera* Ducke, *D. magnifica* (Ducke) Ducke, *D. micrantha* Harms, *D. odorata* (Aubl.) Willd., *D. oleifera* Benth., *D. polyphylla* Huber, *D. punctata* (S. F. Blake) Amshoff e *D. rosea* Benth. As outras espécies foram classificadas como “sinônimos” ou “não resolvidos”, e com isto *The Plant List* não considera nomes atualmente aceitos (The plant list, 2013).

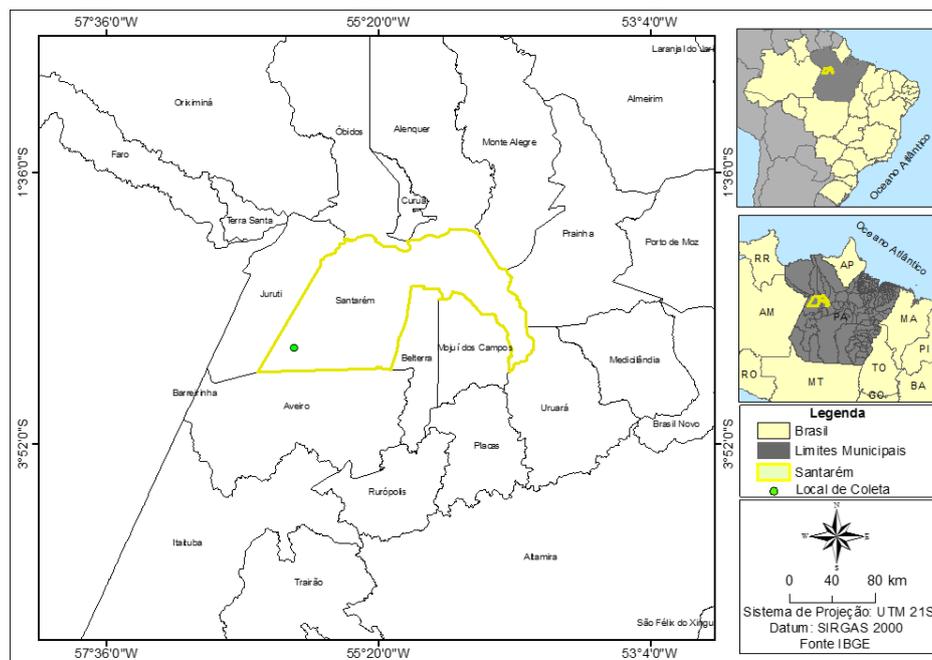
Espécies de cumarú (*Dipteryx* sp.) são utilizadas para diversos fins, como: aproveitamento alimentar (cumarú-ferro, cujas castanhas – sementes - são comestíveis), na confecção de bijuterias (o uso é arriscado porque as sementes possuem ação antiespasmódica, diaforética, cardíaca e emenagoga), na indústria (possui um óleo essencial aromático utilizado na perfumaria, como fixador) e cosméticos. Existem espécies deste gênero, como *Dipteryx odorata*, cujas sementes fermentadas produzem um óleo essencial e industrial – cumarina (anidrido cumarínico) - essência aromática usada como narcótico e estimulante, além de possuir propriedades utilizada para disfarçar odores desagradáveis em formulações farmacêuticas (Araújo *et al.*, 2004; Carvalho, 2009)

As plantas não são unicamente empregadas como fonte potencial de princípios ativos isolados, quimicamente definidos, mas o uso de extratos também é uma possibilidade. Em algumas situações, seu efeito pode ser da ação de vários princípios ativos. Com isso, as plantas despertam grande interesse em função de atividades já descritas em diversos setores, sendo de suma importância investigar o que gera essa ação (Santos Fernandes *et al.*, 2009).

Com isso, objetivou-se avaliar a composição química de extratos etanólicos dos galhos de *Hymenaea* sp. e *Dipteryx* sp. e determinar suas atividades antifúngicas.

## Material e métodos

O material utilizado na pesquisa foi proveniente de uma área de manejo da Empresa Rondobel Florestal, próximo à comunidade de Cachoeira do Aruã, localizado no município de Santarém, estado do Pará (Figura 1).



**Figura 1.** Mapa de localização da região de coleta das árvores de *Hymenaea* sp. e *Dipteryx* sp. Fonte: Branco (2018).

As amostras foram colhidas aleatoriamente de resíduos florestais de galhos de três árvores de *Hymenaea* sp. e três de *Dipteryx* sp., após a segunda bifurcação. O material foi desdobrado em plaina devidamente higienizada a fim de evitar contaminação, visando a coleta de serragem. Posteriormente, as amostras foram secas em estufa (40°C por 96 h), homogeneizadas e armazenadas em sacos de papel. Após este procedimento, foram realizadas as extrações de cada amostra no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Naturais Bioativos da Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA, Santarém, PA.

Utilizaram-se 50 g de serragem seca para extração em etanol 92,8° INPM (álcool 96°GL) tratado com hidróxido de sódio (NaOH) e destilado, sendo as extrações realizadas em triplicata em aparelho de Soxhlet por 8 h. O solvente foi evaporado em pressão reduzida a 50 °C em evaporador rotativo Fisatom, modelo 801 com sistema de refrigeração acoplado. Após a evaporação do solvente, as amostras foram pesadas, armazenadas em frascos âmbar hermeticamente fechados e mantidos sob refrigeração (10 °C) (Taube Jr *et al.*, 2014). Foram obtidos os rendimentos do extrato pela equação [(Massa do extrato/Massa do material vegetal) \*100].

A caracterização fitoquímica dos extratos de jatobá e de cumarú foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Naturais Bioativos. Para isto, foram utilizadas placas de alumínio (10 cm x 10 cm) e sílica 60 com indicador fluorescente 254 nm e espessura da camada de 0,20 mm. Foram solubilizados 10 mg de cada extrato com 1 mL de etanol e, posteriormente, aplicado 10 µL de cada repetição na placa cromatográfica. As placas foram eluídas utilizando como fase móvel a mistura dos solventes hexano: acetato de etila (60:40) acrescido 0,5% de metanol para as placas de terpenos, e 2,0% de metanol para flavonoides e taninos. Para verificar a presença de cumarinas, utilizou-se o sistema tolueno: éter etílico (1:1). Após a eluição, as placas foram reveladas, sendo usado: para terpenos, vanilina sulfúrica; para flavonoides, cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>); para cumarinas, hidróxido de potássio (KOH) a 5%; e para taninos, cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>).

Os fungos testados foram *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina* (MP5), e *Trametes versicolor* pertencentes à Micoteca do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA) e da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Para determinar a concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos brutos das árvores de *Hymenaea* sp. e de *Dipteryx* sp. foram utilizadas microplacas para Elisa de 96 poços sendo realizada a microdiluição com caldo Batata-Dextrose (BD). As suspensões foram ajustadas na escala de 0,5 MacFarland com caldo BD esterilizado para a concentração de 10<sup>4</sup> esporos. mL<sup>-1</sup>. Foram testadas as concentrações do extrato entre 1000 µg. mL<sup>-1</sup> até 15,625 µg. mL<sup>-1</sup>. Para o controle positivo foi utilizado o fungicida comercial Azimut® (azoxystrobin + tebuconazole) a 1%. O ensaio foi realizado durante 96 h a 30° C e, posteriormente, adicionados 10 µL de Resazurina a 0,1% como indicador colorimétrico para caracterizar a viabilidade celular em cada poço da placa teste. A concentração fungicida foi determinada pela subcultura do conteúdo dos poços correspondente a CMI. Para este teste, foi posto em placa de Petri o meio de cultura Batata-dextrose-ágar (BDA) e posteriormente, foi semeada uma alíquota de 10 µL do conteúdo de cada poço da placa de Elisa. Após o período de incubação (25 °C por 96 h), foi verificada a inibição do crescimento fúngico.

## Resultados e discussão

Após as extrações, foram obtidas as médias de rendimentos dos extratos dos resíduos de *Hymenaea* sp. e *Dipteryx* sp., sendo encontrados valores de 16,09% e 10,58%, respectivamente (Tabela 1):

**Tabela 1.** Rendimentos dos extratos dos resíduos de *Hymenaea* sp. e *Dipteryx* sp.

Indivíduo	Rendimentos (%)	
	<i>Hymenaea</i> sp.	<i>Dipteryx</i> sp.
1	15,31	10,20
2	17,42	10,55
3	15,55	11,00
Média	16,09	10,58

Por meio da CCD foi identificada a presença das classes de metabólitos de terpenos, flavonoides e taninos no extrato do resíduo de jatobá, e de flavonoides e compostos fenólicos, cumarina e terpenos no extrato do resíduo de cumarú.

Verificou-se que o extrato de cumarú não foi efetivo contra os fungos *T. versicolor* e *M. phaseolina* (MP5), mas foi efetivo contra *F. oxysporum* com atividade na concentração de 1000 µg.mL<sup>-1</sup>, e quando verificado a concentração Fungicida mínima (CFM) mostrou-se fungistático (Tabela 2).

Para *M. phaseolina*, constatou-se a ação fungicida do extrato bruto de jatobá nas concentrações entre 1000 até 125 µg. mL<sup>-1</sup> e para *T. versicolor*, ação fungistática na concentração de 125 µg. mL<sup>-1</sup>. Vale ressaltar que o fungicida Azimut®, na concentração de 1%, não foi efetivo contra os fungos testados.

Verificou que o gênero *Hymenaea* apresenta potencial para o controle alternativo de fitopatógenos, como constatado sua atividade antifúngica para os fungos testados neste trabalho. Outros trabalhos relatam o potencial de extrato deste gênero no controle de fungos fitopatogênicos. Maranhão (2009), testando o extrato de *H. stigonocarpa* contra fungos do gênero *Fusarium*, constatou que na concentração de 4.500 µg.mL<sup>-1</sup> inibiu o crescimento do fitopatógeno. Estes resultados confirmam a atividade biológica também encontrada neste trabalho para fungos do gênero *Fusarium*, com CMI igual a 125 µg.mL<sup>-1</sup>.

A inibição do crescimento fúngico pelo extrato de jatobá provavelmente está relacionada à sua composição química. Fernandes *et al.* (2005) afirmam que *Hymenaea* sp. possui em sua composição, classes de compostos como os taninos e flavonoides, associando estes a possível atividade antifúngica.

Mesmo em uma concentração maior (1000 µg. mL<sup>-1</sup>), quando comparada com a efetividade do extrato de *Hymenaea* sp., verificou-se que o extrato de cumarú também apresenta potencial antifúngico, pois foi efetivo, inibindo o crescimento micelial do *F. oxysporum*.

Os extratos testados foram mais eficientes no controle de *F. oxysporum*, *T. versicolor* e *M. phaseolina* do que o fungicida Azimut, o que os tornam uma alternativa de controle, podendo vir a ser um forte aliado à agricultura sustentável, pois uma vez utilizando produtos alternativos, temos redução no uso de agrotóxicos, além de garantir maior produção de alimentos de qualidade e menor contaminação ambiental (Abdel-Monaim *et al.*, 2011).

**Tabela 2.** Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos do resíduo de *Hymenaea* sp. e *Dipteryx* sp.

Fungo	Concentração Mínima Inibitória (µg/mL)	
	<i>Hymenaea</i> sp.	<i>Dipteryx</i> sp.
<i>Trametes versicolor</i>	125	-
<i>Macrophomina phaseolina</i> (MP5)	125	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	125	1000

## Conclusões

O extrato do resíduo de *Hymenaea* sp. foi mais ativo quando comparado ao extrato de cumarú, podendo ser considerado uma fonte natural efetiva no controle de alguns fungos, destacando-se sua ação contra *M. phaseolina* (MP5) (125 µg. mL<sup>-1</sup>).

O extrato de cumarú não foi tão efetivo aos microrganismos, mas foi mais efetivo que o fungicida comercial Azimut.

Os resultados apresentados neste estudo demonstram a efetividade do extrato etanólico de jatobá, além de que, este é uma fonte alternativa de moléculas antifúngicas no controle microrganismos.

## Agradecimentos

À Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA); À Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas (FAPESPA) pela concessão da bolsa de estudos e por fomentar a pesquisa.

## Referências

- Abdel-Monaim MF, Abo-Elyousr KAM, Morsy KM 2011. Effectiveness of plant extracts on suppression of damping-off and wilt diseases of lupine (*Lupinus termis* Forsk.). *Crop Protection*, 30 (I):185-191.
- Araújo VF, Echeverria RM, Pastore J 2004. *Sistema de extração de sementes de Cumarú*. Universidade de Brasília - UnB. Instituto de Química, Laboratório de Tecnologia Química - LATEQ. Brasília, Distrito Federal, p. 12.
- Carvalho Filho JLS, Arrigoni-Blank MF, Blank AF, Rangel MSA 2003. Produção de mudas de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) em diferentes ambientes, recipientes e composições de substratos. *Cerne*, 9 (I): 109-118.
- Carvalho PER 2009. *Cumarú-ferro Dipteryx odorata*. Comunicado técnico Embrapa, n. 225, ISSN 1517-5030, 2009.
- Cipriano J, Martins L, Deus MSM, Peron AP 2014. O gênero *Hymenaea* e suas espécies mais importantes do ponto de vista econômico e medicinal para o Brasil. *Caderno de Pesquisa*, 26 (II): 41-51.
- Fernandes RS, Lourenço MV, Miranda CES, França SC, Januário AH 2009. Validação do método de extração e quantificação de 7-hidróxi-4', 6-dimetóxi-isoflavona em culturas de células em suspensão e calos de *Dipteryx odorata*. *Eclética Química*, 34 (I): 13-18.
- Fernandes TT, Santos ATF, Pimenta FC 2005. Atividade antimicrobiana das plantas *Phathymenia reticulada*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. *Patologia Tropical*, 39 (II): 113-122.
- Kern DC, Ruivo MDLP, Rodrigues TE, Cometti JLS 2010. Uso de resíduos de madeira como alternativa de melhorar as condições ambientais em sistema de reflorestamento. *Acta Amazonica*, 40 (III): 409-413.
- Lorenzi H 2008. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5 ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 384p, 2008.
- Maranhão CA 2009. *Estudo químico, antimicrobiano, larvicida e antitermítico do cerne da madeira de lei Hymenaea stigonocarpa Mart. ex Hayne*. 2009. Recife - PE. (Dr. Universidade Federal de Pernambuco). 139 f.
- Shanley P, Medina G 2005. *Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica*. 1. Ed. Belém: CIFOR, Imazon, 2005.
- Silva-Ribeiro RB, Gama JRV, Souza AL, Leite HB, Soares CPB, Silva GF 2016. Métodos para estimar o volume de fustes e galhos na floresta nacional do Tapajós. *Revista Árvore*, 40 (I), p.81-88.
- Souza VC, Lorenzi H 2012. *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação de famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III*. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p.768.
- Taube Jr OS, Castro KCF, Barata LES 2014. *Experimentos de Química*. Santarém: UFOPA, 2014. p. 242.
- The Plant List 2013. Versão 1.1. Publicado na Internet; <http://www.brasiliana.com.br/obras/amazonia-brasileira-iii-arvores-e-plantas-uteis-indigenas-e-aclimatadas/pagina/167/texto> (acesso: 28 de fevereiro de 2018).

## Avaliação da atividade antimicrobiana e modulatória de complexos de inclusão de óleo de *Euterpe oleraceae* Mart e $\beta$ -ciclodextrina e HP- $\beta$ -ciclodextrina

Thalita Sévia Soares de Almeida Magalhães<sup>1</sup>, Pollyana Cristina de Oliveira Macedo<sup>2</sup>, Stephany Yumi Kawashima Pacheco<sup>3</sup>, Marília Andreza da Silva Ferreira<sup>4</sup>, José Cezário de Almeida<sup>5</sup>, Ádley Antonini Neves de Lima<sup>6</sup>.

<sup>1</sup> Doutoranda em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte

<sup>2</sup> Graduanda em Bacharelado em Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte

<sup>3</sup> Graduada em Bacharelado em Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte

<sup>4</sup> Mestre em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco

<sup>5</sup> Pós-Doc em Ciências, Universidade de São Paulo

<sup>6</sup> Doutor em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco e Professor da Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Emails: thalitasevia22@gmail.com, macedopollyanax@gmail.com, teh.pacheco@hotmail.com, marilia.andreza.masf@gmail.com, cezarioja@gmail.com, adleyantonini@yahoo.com.br.

### Resumo

O óleo de *Euterpe oleraceae* Mart (açai) é reconhecido por possuir importantes atividades biológicas como anti-diarreica, anti-inflamatória e antioxidante. Porém, sua utilização é limitada pela indústria farmacêutica pela baixa solubilidade e rápida rancidez hidrolítica. Os complexos de inclusão surgem como alternativa para encapsulamento de compostos apolares, proporcionando estabilidade físico-química e, consequentemente, melhorando a resposta biológica. Portanto, neste estudo avaliou-se a atividade antibacteriana e modulatória de complexos de inclusão contendo óleo de *Euterpe oleracea* e  $\beta$ -ciclodextrina (EOO- $\beta$ -CD) e HP- $\beta$ -ciclodextrinas (EOO-HP- $\beta$ -CD) frente contra cepas de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Obteve-se complexos de inclusão pelos métodos de malaxagem (MLX) e *slurry* (SL) e as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) e atividade modulatória do óleo e complexos foram avaliadas pelo método de diluição em caldo. Os resultados da CIM dos complexos mostraram eficiência antibacteriana em cepas Gram-positivas e negativas, consideravelmente melhor se comparado à CIM do óleo puro. A resposta modulatória de EOO e EOO- $\beta$ -CD preparada por KND, e complexos com EOO- $\beta$ -CD e EOO-HP- $\beta$ -CD preparada por SL mostrou efeito sinérgico com ampicilina contra *E. coli*, enquanto outros fármacos testados, a resposta antibiótica foi mantida. Os resultados obtidos são importantes, pois subsidiam estudos para o desenvolvimento de novos fármacos e formas farmacêuticas.

**Palavras-chave:** óleo de *Euterpe oleracea* Mart, ciclodextrinas, complexos de inclusão, atividade antibacteriana, atividade modulatória.

### Introdução

Os óleos vegetais têm sido alvo de estudos pelas suas variadas aplicações farmacológicas. Silva *et al.* (2018) afirmam que constituintes químicos presentes nos diversos óleos dispõem de diferentes atividades biológicas. Pode-se apontar o óleo resina da *Copaifera multijuga*, sendo comumente aplicado como anti-inflamatório, estudado por Pinheiro *et al.* (2017), enquanto o óleo essencial do *Ocimum basilicum* é aplicado como anti-hiperalgésico, estudado por Nascimento *et al.* (2015). O óleo de *Allium sativum* por outro lado, apresenta atividade antioxidante e antimicrobiana (Wang *et al.* 2011), de semelhante modo ao óleo de *Euterpe oleraceae* (Pacheco-Palencia *et al.*, 2008; Melhorança Filho e Pereira, 2012).

O óleo de *Euterpe oleraceae* Mart (EOO), popularmente conhecido como óleo de açai, é produzido no Brasil em grandes proporções. Composto em sua maioria por ácidos graxos, de cadeias longas e insaturadas, cujo constituinte majoritário é o ácido oleico (Brian, 1998; Galotta e Boaventura, 2005, Favacho, 2011). Segundo Sousa (2017), o ácido oleico representa 54,32% da fração lipídica, seguido pelo

de palmítico (30%), linoleico (5,9%) e palmitoleico, vacênico, esteárico em menores concentrações. Dentre os fitoesteróides presentes no óleo, destacam-se o Beta-Sitosferol, o Stigmasterol e o Campesterol, sendo muito utilizados pela indústria cosmética, como preventivos do envelhecimento cutâneo, por auxiliar o metabolismo celular e reduzir processos inflamatórios (Lubrano, Robin e Khaiat, 1994).

Recentemente, Marques *et al.* (2016) apresentaram a caracterização fitoquímica do EOO que evidenciou os ácidos vanílico, palmítico,  $\gamma$ -linolênico, linoleico, oleico, cinâmico, cafeico, protocatecuico, ferúlico, siringico e os flavonoides quercetina e kaempferol rutinosídeo como principais componentes fitoquímicos do óleo. Essa gama de constituintes pode justificar as atividades biológicas do óleo de açaí já descritas na literatura.

Estudos apontam que o EOO possui ação antidiarreica (Plotkin e Balick, 1984), anti-inflamatória e antinociceptiva (Favacho *et al.*, 2011), efeito inibitório contra *Staphylococcus aureus* (Melhorança Filho e Pereira, 2012), ação antiproliferativa (Pacheco-Palencia *et al.*, 2008), antioxidante (Pacheco-Palencia *et al.*, 2008; Rufino *et al.*, 2011), e efeito antiaterogênico (Sousa *et al.*, 2017). Ainda é descrito pela ausência de citotoxicidade e genotoxicidade (Marques *et al.*, 2016).

Apesar do grande interesse e vasto arsenal farmacológico pertinente aos óleos, em especial ao EOO, a sua utilização pode ser limitada por parte da indústria farmacêutica em virtude da baixa solubilidade. Com a finalidade de viabilizar este problema são empregados polímeros para a complexação de fármacos, a citar: as ciclodextrinas, sendo frequentemente encontradas na literatura (Nascimento *et al.*, 2015; Vikas *et al.*, 2018), entre outros polímeros como poli(etileno glicol) (PEG), poli(óxido de etileno) (PEO), poli(álcool vinílico) (PVA), poli(vinil pirrolidona) (PVP) (Villanova e Cunha, 2010).

As ciclodextrinas têm sido utilizadas como excipiente farmacêutico, principalmente para solubilizar fármacos com baixa solubilidade. Além de apresentarem características físico-químicas estáveis, capazes de proteger moléculas hóspedes da degradação pelo trato gastrointestinal, proporcionam fotoestabilidade e estabilidade térmica, protegem da oxidação, reduzem efeitos fisiológicos e características organolépticas indesejadas, volatilidade de fármacos e toxicidade (Ramos *et al.*, 2018; Ferreira *et al.*, 2018).

Com o intuito de desenvolver complexos de inclusão com óleos, a fim viabilizar suas características físico-químicas, concebem-se formulações capazes de melhorar sua função e aplicação farmacológica. Desta forma o produto torna-se quimicamente estável e seus constituintes são protegidos, ao passo que é reduzida a sua exposição a fatores ambientais e microbiológicos. Além destes benefícios, a formação de complexos de inclusão com EOO pode melhorar a sua solubilidade, promover a estabilidade oxidativa contra efeitos da fotosensibilidade ou temperatura e, especialmente, impedir a rancidez hidrolítica.

Estudos físico-químicos para investigar a formação de complexos de inclusão entre EOO e  $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD foram procedidos anteriormente. A energia de interação, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (SEM), pó Difração de raios X (PXRD), análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria de varredura diferencial (DSC) confirmaram a eficiência de complexação entre EOO e as ciclodextrinas estudadas.

Portanto, este trabalho objetivou avaliar a atividade antibacteriana e moduladora dos complexos de inclusão de *Euterpe oleracea* Mart. e  $\beta$ -ciclodextrina e HP- $\beta$ -ciclodextrinas contra as cepas bacterianas padrão, *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25932), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) pelo método de microdiluição em caldo.

## Material e Métodos

O óleo de *Euterpe oleraceae* Mart. (OEO) foi obtido da Amazon Oil (Belém, PA) e  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Os complexos de inclusão foram desenvolvidos no Laboratório da Escola de Farmácia Industrial pertencente à Universidade Federal do Rio Grande do Norte. As cepas bacterianas (ATCC) foram doadas pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Campina Grande - Campus Cajazeira (PB), onde o experimento foi procedido. O caldo Brain Heart Infusion (BHI) foi obtido pela Kasvi (São José dos Pinhais, PR, Brazil). Todas as experiências foram realizadas usando água purificada ( $< 1,3 \mu\text{S}$ ) obtida por osmose reversa e os reagentes foram de grau analítico.

Os complexos de inclusão do óleo com cada ciclodextrina óleo de *Euterpe oleraceae*-beta-ciclodextrina (EOO- $\beta$ -CD) e óleo de *Euterpe oleraceae*-hidroxipropil-beta-ciclodextrina (EOO-HP- $\beta$ -CD) foram produzidos pelos métodos de malaxagem (KND) e *slurry* (SL), utilizando grau e pistilo. Utilizou-se uma concentração equimolar (1:1) de ciclodextrina e EOO. Considerou-se que o peso molecular de EOO igual ao de ácido oleico, com  $282,47\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , e pesos moleculares de  $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD,  $1134,98$  e  $1396\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , respectivamente.

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

Para determinar a menor concentração bactericida, a CIM foi determinada pelo método de microdiluição em caldo. As cepas bacterianas padrão utilizadas foram duas gram-positivas: *Enterococcus faecales* e (ATCC 29212) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25932); e duas gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* e (ATCC 27853) *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Previamente, as cepas foram replicadas em Brain heart infusion (BHI), e após 24 h os testes foram desenvolvidos. Inicialmente cada cepa foi diluída em solução salina à turbidez equivalente a 0,5 em escala de Mc Farlane. Em seguida o inóculo foi adicionado em um tubo de ensaio contendo BHI a 10%, na proporção de 1:9 (v:v), deste modo obtendo a suspensão bacteriana. Procedeu-se então a microdiluição em placas de 96 poços, no qual todos os poços receberam de  $100\ \mu\text{L}^{-1}$  da suspensão bacteriana. No primeiro poço de cada coluna da placa aplicou-se  $100\ \mu\text{L}^{-1}$  da substância testada (EOO, EOO- $\beta$ -CD e EOO-HP- $\beta$ -CD, obtidos por KND e SL), bem como as substâncias controle (penicilina, ampicilina, piperacilina-tazobactam e dime-tilsulfóxido (DMSO)), e por conseguinte foi realizada uma microdiluição em série até o penúltimo poço.

A concentração inicial das substâncias foi de  $1024\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , decrescendo a  $8\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , enquanto o último poço recebeu apenas a suspensão bacteriana. As placas foram incubadas por 24 h a uma temperatura de  $37^\circ\text{C}$ . Decorrido este tempo, aplicou-se 20  $\mu\text{L}$  de resazurina em cada poço e após uma hora à temperatura ambiente a leitura foi realizada por uma inspeção visual da turbidez. Os testes foram realizados em triplicatas (Oliveira *et al.*, 2016).

#### *Ensaio de Modulação de drogas*

O teste de modulação de drogas foi realizado de acordo com Oliveira *et al.* (2017), a fim de avaliar a atividade das substâncias em estudo como moduladores de medicamentos antimicrobianos comumente aplicados à prática clínica laboratorial CLSI (2013). Para este experimento, foram adicionadas alíquotas de cada amostra a cada suspensão bacteriana previamente preparada, a fim de atingir a concentração subinibitória (CIM/8). Para a determinação do volume de amostra necessário, foi considerada a concentração inicial de  $1024\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para um volume final de 100  $\mu\text{L}$  por poço. Após a inoculação de cada poço com 100  $\mu\text{L}$  de suspensão bacteriana, foi realizada uma microdiluição em série com 100  $\mu\text{L}$  da solução de antibiótico padrão para cada cepa até o penúltimo poço. Os 100  $\mu\text{L}$  finais foram descartados dessa microdiluição. A concentração inicial de antibióticos foi adotada de acordo com a suscetibilidade e sensibilidade microbiana fornecidas no manual CLSI (2013). O último poço recebeu apenas a suspensão bacteriana e as placas foram incubadas por 24 h a uma temperatura de  $37^\circ\text{C}$ . Decorrido este tempo, aplicou-se 20  $\mu\text{L}$  de resazurina (0.01 w/w) em cada poço e após uma hora à temperatura ambiente a leitura foi realizada por uma inspeção visual da turbidez. Os testes foram realizados em triplicata e três repetições (Oliveira *et al.* 2016).

#### *Análise estatística*

Aos resultados obtidos foram aplicados as médias e desvio padrão e analisados pela variância bidimensional (ANOVA), utilizando Graph Pad Prism 5.0. (San Diego, CA, EUA). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## **Resultados e Discussão**

#### *Concentração Inibitória Mínima (CIM)*

O uso racional de antibióticos e a descoberta de novas drogas são apontados como ação estratégica a fim de evitar a resistência bacteriana (Guimarães 2010; Coutinho *et al.*, 2015). Para esse fim, as

Concentrações Inibitórias Mínimas dos complexos de inclusão EOO e EOO- $\beta$ -CD e EOO-HP- $\beta$ -CD, indicativas de sua capacidade de prevenir a atividade bacteriana, foram determinadas visualmente pelo método de microdiluição em poços.

Pode-se observar na Tabela 1, que os maiores valores de CIM, indicativos do menor poder bactericida, foram obtidos usando EOO contra *S. aureus* (512  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), *E. faecalis* ( $\geq 1024 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) e *E. coli* (512  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), enquanto os complexos EOO-HP- $\beta$ -CD obtidos por malaxado ou *slurry* exibiram sua maior eficácia contra *E. coli* (CIM = 341  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) e a menor contra *P. aeruginosa* (CIM = 512  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). No entanto, o melhor desempenho obtido foram os complexos preparados com  $\beta$ -CD, especialmente o EOO- $\beta$ -CD obtido por *slurry*, cujos valores de CIM contra *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli* apresentaram-se mais baixos, com 341, 384, 384 e 256  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , respectivamente. No entanto, o complexo EOO- $\beta$ -CD preparado por malaxado foi o mais eficaz contra *S. aureus*, com um valor de CIM de 256  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

**Tabela 1.** Valores médios da Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

Amostras	Bactéria gram-positiva		Bactéria gram-negativa	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
EOO	512	$\geq 1024$	427	512
EOO- $\beta$ -CD (KND)	256	480	384	341
EOO- $\beta$ -CD (SL)	384	341	384	256
EOO-HP- $\beta$ -CD (KND)	469	512	512	341
EOO-HP- $\beta$ -CD (SL)	384	402	512	341
Ampicilina	-	32	-	48
Penicilina	0,03	-	-	-
Piperacilina + tazobactam	-	-	2	-

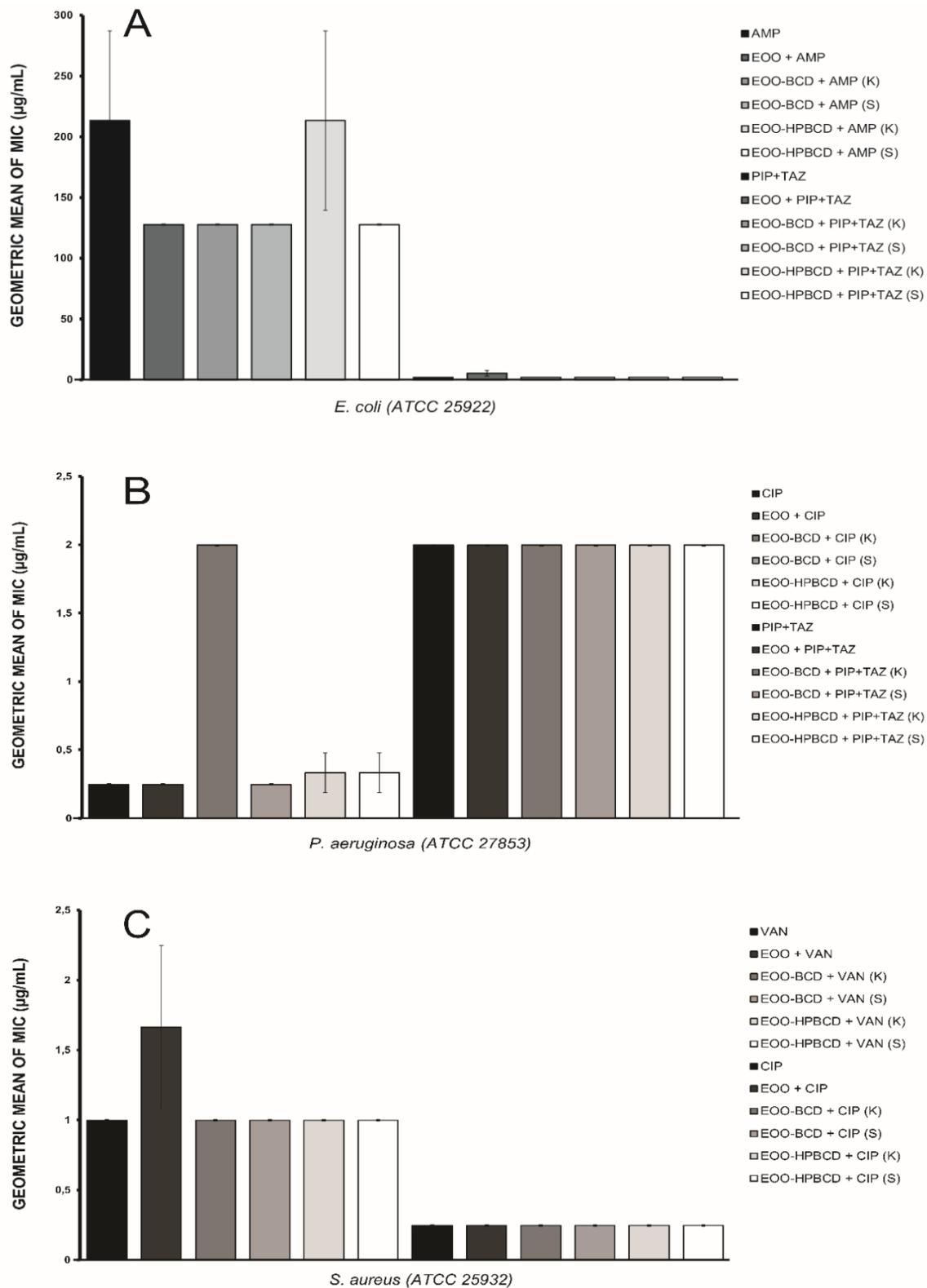
Abreviações: EOO, óleo de *Euterpe oleracea*; EOO- $\beta$ -CD, complexo de inclusão de EOO e  $\beta$ -betaciclodextrina; EOO-HP- $\beta$ -CD, complexo de inclusão de EOO e hidroxi-propil- $\beta$ -betaciclodextrina; KND, preparação por malaxado; SL, preparação por *slurry*. Os testes foram realizados em triplicata em três repartições. Valores de  $P < 0.05$  foram considerados estatisticamente significantes.

### Atividade moduladora de drogas

O ensaio de modulação de drogas foi realizado a partir da adição do EOO e complexos de inclusão a antibióticos comumente prescritos na prática clínica para o tratamento de doenças nosocomiais e hospitalares, a fim de estabelecer possível efeito sinérgico ou antagônico dos compostos. Para o teste foram utilizados dois antibióticos sugeridos pela CLSI (2013) contra cada microrganismo em estudo, dos quais a Ampicilina (AMP 1024  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) e Piperacilina + tazobactam (PIT + TAZ 28,5 + 3  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) contra a *E. coli*, Ciprofloxacino (CIP 4  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) e PIT + TAZ contra a *P. aeruginosa*; Vancomicina (VAN 16  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) e CIP 4  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , contra a *S. aureus* e *E. faecales*.

Nos resultados da atividade modulatória de drogas contra a *E. coli* (Figura 1A) foi possível observar uma diminuição da CIM da AMP de 213 para 128  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  quando este antibiótico foi usado em combinação com EOO, EOO- $\beta$ -CD preparado por qualquer método e EOO-HP- $\beta$ -CD preparado por *slurry*, destacando um efeito sinérgico, enquanto o EOO-HP- $\beta$ -CD preparado por malaxado não influenciou sua atividade. Tal efeito sinérgico foi inesperado, uma vez que a parede celular das bactérias Gram-negativas é mais complexa que a das bactérias Gram-positivas, por possuir um maior número de camadas de peptidoglicano cuja formação está diretamente ligada às proteínas ligadoras de penicilinas (Pereira *et al.*, 2017; Leite *et al.*, 2017). Sinergismo semelhante foi relatado para a combinação de óleo essencial de *Croton limae* e neomicina contra outra cepa da mesma espécie bacteriana (Leite, 2017). Em relação à adição de EOO à PIT + TAZ, contra a mesma cepa bacteriana, não houve variação significativa, quer seja antagonista ou sinérgica da CIM.

Nos resultados da atividade modulatória contra a *P. aeruginosa* (Figura 1B) foi observado um aumento da CIM do CIP de 0,25 para 2,0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  quando aplicado o complexo EOO-HP- $\beta$ -CD KND, inferindo ação antagônica do complexo ao antibiótico. Sugere-se que esta resposta antimicrobiana foi afetada



**Figura 1.** Efeito modulador do óleo de *E. oleracea* (EOO) e seus complexos de inclusão com  $\beta$ -ciclodextrina (EOO- $\beta$ CD) ou Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (EOO-HP- $\beta$ -CD) em combinação com (A) Ampicilina (AMP) ou Piperacilina + Tazobactam (PIP + TAZ) contra *E. coli*, (B) Ciprofloxacina (CIP) ou PIP + TAZ contra *P. aeruginosa*, (C) Vancomicina (VAN) ou CIP contra *S. aureus*, em comparação com o efeito desses antibióticos isoladamente. As diferenças comparadas com o controle foram consideradas estatisticamente significantes quando  $P < 0,05$ . Os complexos de inclusão foram preparados malaxado (KND) ou *\_slurry\_* (SL).

pela grande modificação das propriedades físico-químicas ocasionada pela formação dos complexos de inclusão interferindo na atividade antibacteriana da droga (Costa *et al.*, 2019). Por outro lado, os demais complexos testados não apresentaram diferença significativa em comparação com a administração da CIP isoladamente. Além disso, a adição de EOO e complexos de inclusão à PIP + TAZ não ocasionou nenhuma variação da CIM em comparação com a administração isolada do antibiótico, isso sugere que a modificação supracitada foi dependente do antibiótico testado.

Embora os resultados contra a *S. aureus* (Figura 1C) tenham mostrado um aumento da CIM para VAN, de 1,00 para 1,66  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  quando o EOO foi aplicado adicionado, o alto desvio padrão desse dado, bem como a ausência de qualquer efeito estatisticamente significativo da adição de complexos de inclusão em comparação com o medicamento isoladamente, sugerem que excluamos qualquer ação antagônica do óleo. Como os resultados da atividade moduladora contra *E. faecalis* não mostraram variação estatisticamente significativa da CIM para VAN e CIP induzida por EOO ou complexos de inclusão, portanto não foram ilustrados na figura.

De acordo com esses resultados, pode-se concluir que apesar da capacidade dos complexos de inclusão melhorar a atividade antibacteriana expressa na determinação da CIM, a atividade modulatória apresentou efeito sinérgico dos complexos de inclusão apenas para a AMP contra *E. coli*, de semelhante modo ao encontrado por Oliveira *et al.* (2017). Para as demais drogas não houve diferença significativa na resposta modulatória quando usado EOO e os complexos de inclusão, mantendo a resposta biológica do antibiótico.

## Considerações Finais

Os resultados da CIM mostraram que os complexos de inclusão apresentaram eficiência antibacteriana em cepas Gram positivas e negativas, sendo consideravelmente melhor se comparado à CIM do EOO puro. Para esta análise também podemos destacar os valores da CIM dos complexos obtidos com a  $\beta$ -CD, notavelmente apresentaram-se inferiores aos valores apresentados com o uso do EOO e complexos com a HP- $\beta$ -CD. O EOO e a maioria dos seus complexos demonstraram efeito sinérgico à ampicilina frente à *E. coli*. Além disso, os complexos de inclusão proporcionaram estabilidade físico-química aos compostos e não mostraram perda na eficiência biológica da EOO, suportando assim sua aplicação terapêutica. A resposta antimicrobiana apresentada pelos complexos foi extremamente importante, pois subsidia estudos para o desenvolvimento de novos fármacos e formas farmacêuticas.

## Referências

- Arakha M, Pal S, Samantarrai D, Panigrahi TK, Mallick BC, Pramanik K, Mallick B, Jha 2015. Antimicrobial activity of iron oxide nanoparticle upon modulation of nanoparticle-bacteria interface. *Scientific Reports*. 5(1):1-12. *Springer Science and Business Media LLC*;
- Araújo RSA de, Barbosa-Filho JM, Scotti MT, Scotti L, da Cruz RM, Falcão-Silva dos S, de Siqueira-Júnior JP, Mendonça-Junior FJ 2016. Modulation of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus* with Coumarin Derivatives. *Scientifica*. 1-6, 2016. *Hindawi Limited*;
- Bracarense AAP, Takahashi JA 2014. Modulation of antimicrobial metabolites production by the fungus *Aspergillus parasiticus*. *Brazilian J Microbiol*. 45(1):313-21;
- Brian, MB 1998. Ethnobotany of the Chacobo Indians and their Palms. *Advanced in economic botany*. New York: *The New York Botanic Garden*.;
- CLSI 2013. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-third Informational Supplement. *CLSI document M100-S23*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute;
- Coutinho HDM, Freitas MA, Gondin CNFL, Alburquerque SL, Ferreira JVA, Andrade JC 2015 Atividade antimicrobiana in vitro de Geraniol e Cariofileno sobre *Staphylococcus aureus*. *Rev Cubana Plant Med*, Ciudad de la Habana. 20(1):98-105;
- De Assis Galotta ALQ, Boaventura MAD 2005. Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do açai (*Euterpe precatoria* Mart., Arecaceae). *Quim Nova*. 28(4):610-3.
- Da Silva BJM, Souza-Monteiro JR, Rogez H, Crespo-López ME, Do Nascimento JLM, Silva EO 2018. Selective effects of *Euterpe oleracea* (açai) on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania infantum*. *Biomed Pharmacother*, 97:1613-21;

- Dos Santos Ramos MA, Da Silva PB, Spósito L, De Toledo LG, Bonifácio BV, Rodero CF, Dos Santos KC, Chorilli M, Bauab TM 2018. Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: A review. *Int J Nanomedicine*. 13:1179–213;
- Souza BSF, Carvalho HO, Ferreira IM, da Cunha EL, Barros AS, Taglialegna T, Carvalho JCT 2017. Effect of the treatment with *Euterpe oleracea* Mart. oil in rats with Triton-induced dyslipidemia. *Biomed Pharmacother*, 90:542–7;
- Fankam AG, Kuate JR, Kuete V 2017. Antibacterial and antibiotic resistance modulatory activities of leaves and bark extracts of *Recinodindron heudelotii* (Euphorbiaceae) against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *BMC Complement Altern Med*, 17(1):1–6.;
- Favacho HAS, Oliveira BR, Santos KC, Medeiros B JL, Sousa PJC, Perazzo FF 2011. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Euterpe oleracea* oil. *Brazilian J Pharmacogn*, 21(1):105–14;
- Ferreira EB, da Silva WFJ, Pinheiro JGO, da Fonseca AG, Moura Lemos TMA, Rocha HAO, de Azevedo EP, Mendonça FJBJ, de Lima AAN 2018. Characterization and antiproliferative activity of a novel 2-aminothiophene derivative- $\beta$ -cyclodextrin binary system. *Molecules*, 23(12);
- Guimarães DO, Da Silva Momesso L, Pupo MT 2010. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quim Nova*, 33(3):667–79;
- Leite TR, da Silva MAP, Dos Santos ACB, Coutinho HDM, Duarte AE, da Costa JGM. 2017. Antimicrobial, modulatory and chemical analysis of the oil of croton limae. *Pharm Biol* [Internet]. 55(1):2015–9;
- Lubrano C, Robin JR 1997. Étude des composés majeurs d’huiles de pulpe de fruits de six espèces de palmiers de Guyane. *Acta Bot Gall*. 144(4):495–9;
- Marques ES, Froder JG, Carvalho JCT, Rosa PCP, Perazzo FF, Maistro EL 2016. Evaluation of the genotoxicity of *Euterpe oleraceae* Mart. (Arecaceae) fruit oil (açai), in mammalian cells in vivo. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 93:13–9;
- Melhorança Filho AL, Pereira MRR 2012. Atividade antimicrobiana de óleos extraídos de açai e de pupunha sobre o desenvolvimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. *Biosci. J.* [Internet]. 28(4);
- Nascimento SS, Araújo AAS, Brito RG, Serafini MR, Menezes PP, Desantana JM 2015. Cyclodextrin-complexed *Ocimum basilicum* leaves essential oil increases fos protein expression in the central nervous system and produce an antihyperalgesic effect in animal models for fibromyalgia. *Int J Mol Sci*. 16(1):547–63;
- Oliveira F de S, Freitas TS de, Cruz RP da, Costa M do S, Pereira RLS, Quintans-Júnior LJ 2017. Evaluation of the antibacterial and modulatory potential of  $\beta$ -bisabolol,  $\beta$ -cyclodextrin and  $\beta$ -bisabolol/ $\beta$ -cyclodextrin complex. *Biomed Pharmacother*. 92:1111–8.;
- Pacheco-Palencia LA, Mertens-Talcott S, Talcott ST 2008. Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from açai (*Euterpe oleracea* Mart.). *J Agric Food Chem*. 56(12):4631–6;
- Pacheco-Palencia LA, Talcott ST, Safe S, Mertens-Talcott S 2008. Absorption and biological activity of phytochemical-rich extracts from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and oil *in vitro*. *J Agric Food Chem*. 56(10):3593–600;
- Pereira NLF, Aquino PEA, Júnior JGAS, Cristo JS, Vieira Filho MA, Moura FF 2017. *In vitro* evaluation of the antibacterial potential and modification of antibiotic activity of the *Eugenia uniflora* L. essential oil in association with led lights. *Microb Pathog* [Internet]. 110:512–8;
- Pinheiro JGO, Tavares EA, da Silva SS, Silva JF, de Carvalho YMBG, Ferreira MRA 2017. Inclusion complexes of copaiba (*Copaifera multijuga hayne*) oleoresin and cyclodextrins: Physicochemical characterization and anti-inflammatory activity. *Int J Mol Sci*. 18(11);
- Plotkin MJ, Balick MJ 1984. Medicinal uses of South American palms. *J. of Ethnoph*. 10(2):157-179;
- Rufino MSM, Pérez-Jiménez J, Arranz S, Alves RE, de Brito ES, Oliveira MSP, Saura-Calixto F 2011. Açai (*Euterpe oleraceae*) “BRS Pará”: A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. *Food Research International*, 44(7), 2100–2106;
- Vikas Y 2018. Cyclodextrin Complexes: An Approach to Improve the Physicochemical Properties of Drugs and Applications of Cyclodextrin Complexes. *Asian J of Pharm*. 12(2):394-409;
- Villanova JCO, Oréfice RL, Cunha AS 2010. Aplicações farmacêuticas de polímeros. *Polímeros*, 20(1), 51–64;
- Walkenhorst WF 2016. Using adjuvants and environmental factors to modulate the activity of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 1858 (5):926–35;
- Wang J, Cao Y, Sun B, Wang C 2011. Physicochemical and release characterization of garlic oil- $\beta$ - cyclodextrin inclusion complexes. *Food Chem* [Internet]. 127(4):1680–5.

## Isolamento e caracterização do agente causal da mancha zonada em *Rollinia mucosa*

Aricléia de Moraes Catarino<sup>1,2\*</sup>, Cláudia Afras de Queiroz<sup>2,3</sup>, Thiago Fernandes Sousa<sup>2,4</sup>, Luadir Gasparotto<sup>2</sup>, Rogério Eiji Hanada<sup>1</sup>, Gilvan Ferreira da Silva<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

<sup>2</sup> Embrapa Amazônia Ocidental

<sup>3</sup> Universidade Federal do Amazonas

<sup>4</sup> Universidade do Estado do Amazonas

\*Emails: amoraescatarino@gmail.com, gilvan.silva@embrapa.br

### Resumo

A Amazônia possui inúmeras espécies frutíferas, dentre as quais se destaca o biribazeiro (*Rollinia mucosa*), pertencente à família das Anonáceas. A mancha zonada, causada por *Sclerotium coffeicola*, é uma doença comum na região Norte e a mais importante para a gravioleira (*Annona muricata*), também pertencente a essa família. O objetivo desse trabalho foi avaliar as características morfológicas e moleculares de *S. coffeicola* infectando plantas de biribazeiro no município de Manaus-AM. A partir de folhas com sintomas típicos de mancha zonada foi realizado o isolamento direto do patógeno, através da transferência de propágulos vegetativos presentes sobre as lesões. A caracterização morfológica foi realizada com base nas características da colônia e dos escleródios. Para a análise molecular, utilizou-se a região LSU domínios D1/D2 da subunidade 28S do rDNA e o teste de patogenicidade, em folhas sadias de ramos destacados de biribazeiro, foi realizado colocando-se os escleródios diretamente sobre a face adaxial das folhas com e sem prévio ferimento. O fungo apresentou micélio branco, ramificado e crescimento rápido. Sobre a superfície das colônias observou-se a formação de escleródios globosos, isolados e agrupados, de coloração inicial branca e posteriormente alaranjada. A análise filogenética da região LSU identificou com alto suporte de bootstrap, o isolado BIR 010 como sendo *S. coffeicola*. No teste de patogenicidade foi possível observar os primeiros sintomas característicos de mancha zonada quatro dias após a inoculação. As análises morfológicas, a caracterização molecular e o teste de patogenicidade confirmaram que a mancha foliar observada em biribazeiro é causada por *S. coffeicola*.

**Palavras-chave:** Anonaceae, biribazeiro, *Sclerotium coffeicola*.

### Introdução

A família das anonáceas é composta por cerca de 40 gêneros e de mais de 2.000 espécies, porém as comestíveis estão distribuídas nos gêneros *Annona*, *Rollinia*, *Duguetia*, *Uvaria* e *Asimira*, e apenas os dois primeiros apresentam espécies de importância econômica (Nogueira *et al.*, 2005). A Amazônia possui inúmeras espécies frutíferas, dentre as quais se destaca o biribazeiro (*Rollinia mucosa* [Jacq.] Baill) que apresenta uma ampla distribuição geográfica e produz um fruto conhecido vulgarmente como “biribá”, “biribá-do-pará”, “fruta-da-condessa”, “biribá-de-Pernambuco”, “pinha”, “anona” e “jaca-de-pobre”, o qual tem grande aceitação popular, sendo na maioria das vezes comercializado e consumido *in natura* (Costa e Muler, 1995).

A mancha zonada, causada por *Sclerotium coffeicola* Bull, é uma doença comum na região Norte, porém não causa danos expressivos (Souza *et al.*, 2012). Apesar disso, na Amazônia, essa doença é a mais relevante para a cultura da graviola (*Annona muricata* L.), também pertencente à família das Anonáceas (Spósito *et al.*, 2016).

A primeira descrição desse patógeno foi em folhas de cafeeiro no Suriname (Stahel, 1921). Em 1957, foi descrito nessa mesma cultura na África do Sul (Saccas, 1957) e em 1965 em cafeeiro e mangueira na Costa do Marfim (Boisson *et al.*, 1965). No Brasil, foi descrito em gravioleira como *Sclerotinia* sp. no estado do Pará (Tabosa *et al.*, 1983), entretanto sua identificação ficou hipotética e só foi formalmente

identificado como *S. coffeicolum* em 1986, atacando gravioleira no município de Manaus, confirmando assim a presença da doença na Amazônia (Lourd e Alves, 1986). O patógeno afeta as folhas, causando lesões necróticas circulares, com centro marrom-claro, bordas bem definidas de coloração marrom escura com diâmetro de aproximadamente 4 mm. Essas lesões com o tempo tornam-se irregulares, formando linhas concêntricas, claras e escuras de 1 a 2 mm de largura, podendo coalescer. Pode haver perfuração no centro da lesão, em certos casos. A olho nu, se observa uma massa de hifas espessas (2-5 mm de comprimento), de coloração branca na face abaxial das folhas. A alta incidência dessa doença ocasiona a queda precoce das folhas e o desfolhamento ascendente da planta, que pode ser total, em condições de clima favorável, culminando com a redução da produção de frutos (Spósito *et al.*, 2016).

A ocorrência da mancha zonada em folhas de biribazeiro foi relatada em 1999 no município de Manaus-AM (Gasparotto e Veras, 1999), porém sem a caracterização do patógeno, agente causal da doença nessa cultura. Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar as características morfológicas e moleculares de *S. coffeicola* infectando plantas de biribazeiro.

## Material e Métodos

No primeiro semestre de 2017, numa área reservada ao estudo de frutíferas localizado no campo experimental da Embrapa Amazônia Ocidental no município de Manaus-AM, foram observadas e coletadas folhas infectadas de biribazeiro apresentando sintomas típicos de manchas necróticas circulares de coloração castanha, de bordos mais escuros, medindo aproximadamente 1,5 a 3,1 cm de diâmetro, distribuídas no limbo foliar.

Isolamento direto a partir dos propágulos vegetativos de *S. coffeicola* sobre as lesões foi realizado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (200 g/L de batata, 10g/L de dextrose e 15g/L de ágar). Após o crescimento do fungo e da produção de escleródios no meio-de-cultura, um único escleródio foi colocado por placa para a obtenção da cultura pura do patógeno.

A massa micelial para extração de DNA total foi a partir das culturas puras, crescidas em meio BD (200 g/L de batata, 10 g/L de dextrose, 2 g/L de extrato de levedura, 2g/L de peptona e 1,5 g/L de caseína). A extração de DNA de quatro isolados foi realizada segundo o protocolo CTAB (Doyle e Doyle, 1987) e quantificado em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo).

Visando determinar os genótipos dos isolados obtidos nas amostras foliares, utilizou-se o marcador molecular ERIC-PCR por meio dos *primers* ERIC 1R 5'-ATGTAAGCTCCTGGGATTCAC-3' e ERIC F-5'-AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG-3'. As reações de PCR foram realizadas com: 1X de tampão (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.4, 1% de Triton), 1,5 mM de cloreto de magnésio, 0,5 mM de dNTP, 50 ng de DNA, 0,2 µM de cada *primer* e 1U de enzima Taq DNA polimerase (*Karpa*). As condições das reações foram: desnaturação inicial de 94 °C por 5 min, 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 48 °C por 1 min, 65 °C por 5 min, seguido pela extensão final de 65 °C por 16 minutos e o perfil de bandas visualizado em gel de agarose 1,5%.

Os caracteres morfológicos analisados foram os aspectos da colônia e formato, tipo, coloração e tamanho dos escleródios. Um isolado foi escolhido para sequenciamento com base na morfologia e dados de ERIC-PCR, com as regiões Espaçadores Internos Transcritos (ITS) e região LSU domínios D1/D2 da subunidade 28S do rDNA utilizando os *primers* ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' (White *et al.*, 1990) e NL4-5'-GGTCCGTGTTCAAGACGG-3' (Carbone e Kohn, 1999), os quais amplificam aproximadamente 1100 pb.

Os fragmentos de PCR foram sequenciados no 3500 Genetic Analyser (Thermo Fisher) e a árvore filogenética foi construída a partir de um alinhamento da região LSU utilizando a ferramenta ClustalW e a topologia da árvore foi obtida por meio do método maximum likelihood no programa MEGA 7.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0) com 1,000 replicatas utilizando o parâmetro de deleção parcial com limite de corte de 95%. O suporte dos ramos foi dado em bootstrap (Tamura *et al.*, 2013).

O teste de patogenicidade foi realizado em folhas sadias de ramos destacados de plantas de biribá, colocando-se os escleródios diretamente sobre a face adaxial das folhas com e sem prévio ferimento. Após a inoculação, as folhas foram submetidas à câmara úmida por 48 h.

## Resultados e discussão

Conforme os caracteres morfológicos, o fungo apresentou micélio branco, pouco ramificado e crescimento rápido. Sobre a superfície das colônias de coloração inicial branca, entre o 3º e o 5º dias de crescimento e, posteriormente, alaranjada entre o 9º e o 12º dias de incubação a 25 °C formaram-se escleródios globosos, isolados e agrupados, medindo de 3 a 5 mm de diâmetro (Figura 1).

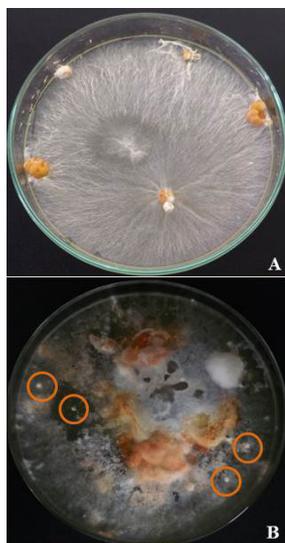
Assis *et al.* (2007) descreveram morfológicamente o fungo *S. coffeicola* em mogno, apresentando micélio branco, pouca ramificação e rápido crescimento. Os escleródios globosos mediam de 2 a 5 mm de diâmetro e apresentavam coloração inicial branca – creme, entre o 3º e o 5º dias de incubação e, posteriormente alaranjada entre o 8º e 10º dias de incubação. Mais recentemente, Pérez-Vera *et al.* (2017) observaram que, a colônia de *S. coffeicola* no 6º dia de idade apresentava micélio branco com pouca ramificação e escleródios esféricos ou globosos, de aparência parda e com diâmetro médio de 1,99 mm. Entre o 10º e o 15º dias, os escleródios atingiram diâmetro médio de 4,43 mm, cuja coloração mudou de amarelo cremoso para laranja e no 21º dia, os escleródios tornaram-se globosos a subglobosos e atingiram diâmetro de 5,9 mm. Essas características são semelhantes às observadas no presente estudo.

O fingerprint obtido pelo marcador ERIC-PCR indicou que o isolado BIR 010 e BIR 013 apresentam o mesmo perfil de bandas, sendo possível distinguir três genótipos a partir dos quatro isolados analisados (Figura 2). Esta técnica tem sido utilizada em outros fungos fitopatogênicos devido a sua eficiência na diferenciação entre isolados, reduzindo assim o sequenciamento de clones (Queiroz *et al.*, 2015; Sousa *et al.*, 2017).

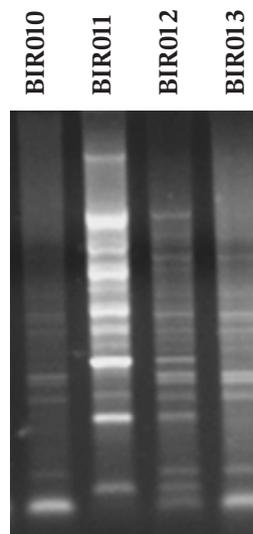
A análise filogenética da região LSU pelo método Maximum Likelihood (ML) com base na sequência de 35 isolados de *Sclerotium* spp. distribuídos em 9 táxons identificou com alto suporte de bootstrap, o isolado BIR 010 como sendo *Sclerotium coffeicola* (Figura 3).

A relação filogenética de espécies dentro do gênero *Sclerotium*, foram determinadas por Xu *et al.* (2010) utilizando-se as regiões ITS e LSU. Estas também foram capazes de resolver as relações filogenéticas entre *S. coffeicola* e *S. rolfsii* (Xu, 2008). Contudo neste trabalho apenas a região LSU foi suficiente para identificação de *S. coffeicola*.

No teste de patogenicidade, foi possível observar os primeiros sintomas característicos de mancha zonada quatro dias após a inoculação em folhas sadias de *R. mucosa* (Figura 4). As etapas do postulado de Koch foram concluídas após o reisolamento do fungo em meio de cultura BDA e a confirmação através das características morfológicas do fungo.

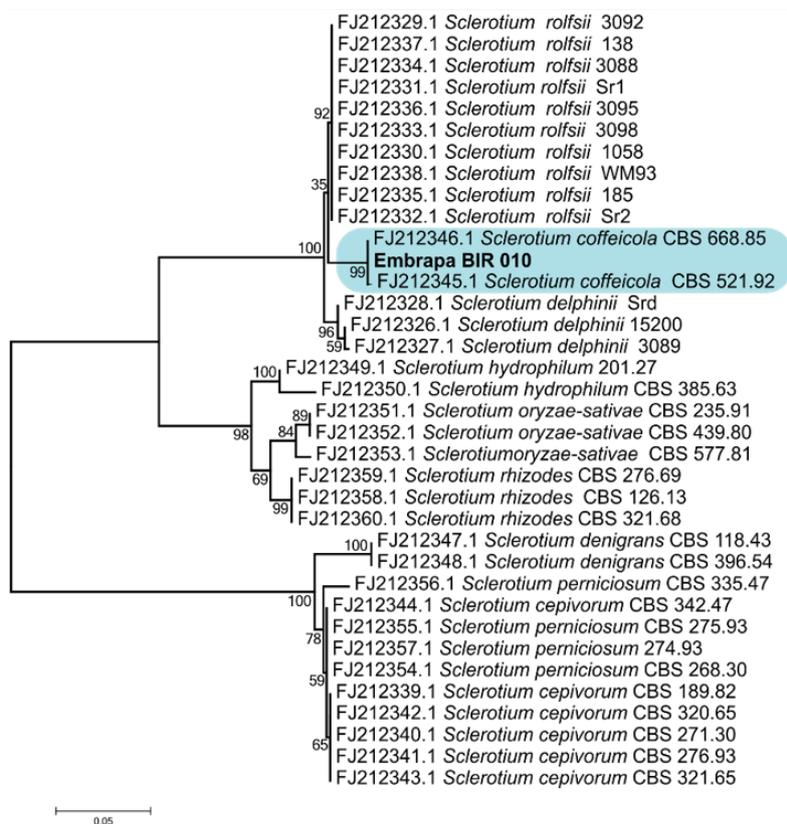


**Figura 1.** Colônia branca (A) e alaranjada (B) contendo escleródios de *Sclerotium coffeicola* em meio BDA.



**Figura 2.** Perfil de bandas obtidas pelo marcador ERIC-PCR com base em quatro isolados de *Sclerotium coffeicola*.

Segundo Ferreira (1989), *S. coffeicola* é um dos patógenos mais agressivos em inoculações artificiais. No estado do Amazonas, além de *R. mucosa* essa doença já foi relatada em *Poraqueiba sericea* Tul., *P. acuminata* Miers, *Ceiba pentandra* (L.) Gaertn., *Khaya ivorensis* A. Chev., *Alibertia edulis* (Rich.) A.Rich., *Genipa americana* L., *Couma macrocarpa* Barb. Rodr., *Mespilus germânica* L., *Dioscorea cayenensis* Lam., *Anona senegalensis* Pers., *Averrhoa carambola* L. (Gasparotto e Veras, 1999) e *Swietenia macrophylla* King. (Bastos, 1998, Assis *et al.*, 2007), *Nauclea diderichii* Wild. e *Gmelina arborea* L. (Hodges *et al.*, 1975), (*Mangifera indica* L.) (Boisson *et al.*, 1965), *Bauhinia* sp. (Ferreira, 1989). Recentemente foi relatado em mogno africano (*S. macrophylla*) no México (Pérez-Vera *et al.*, 2017) e em graviolinha (*A. montana*) no Panamá (Kirschner *et al.*, 2018).



**Figura 3.** Inferência filogenética pelo método Maximum Likelihood com base na região LSU de 9 táxons de *Sclerotium*. O isolado BIR 010 é destacado em negro.



**Figura 4.** Lesões naturais causadas por em folhas de *Rollinia mucosa* por *Sclerotium coffeicola* (A) e inoculação artificial de *S. coffeicola* com escleródios (B).

## Conclusão

De acordo com as características morfológicas, análise filogenética e o teste de patogenicidade, os isolados obtidos causando a mancha zonada em folhas de biribazeiro foi identificado como *S. coffeicola* Bull.

## Referências

- Assis LAG de, Coelho Netto RA, Barbosa AP 2007. Ocorrência de mancha foliar em mogno causada por *Sclerotium coffeicola* no estado do Amazonas. *Summa Phytopathologica*, 33(1):99.
- Bastos CN 1998. Mancha foliar em mogno (*Switenia macrophylla*) causada por *Sclerotium coffeicolum* Stahel. *Agrotropica*, Ilhéus, 10(1):41-42.
- Boisson C, Frossard P 1965. Note sur deux maladies à sclérotos des feuilles de manguier et de caféier excelsa em Côte d'Ivoire. *Fruits*, 10:565-569.
- Carbone I, Kohn LM 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91:553-556.
- Costa JPC, Müller CH 1995. Fruticultura tropical: o biribazeiro *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. Documentos, 84:1-36.
- Ferreira FA 1989. Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil. Sociedade de Investigações Florestais, Viçosa, 570p.
- Gasparotto L, Veras SM 1999. Hosts of *Sclerotium coffeicola* in the state of Amazonas, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 24(1):93.
- Hodges CS; Ferreira FA, Reis MS 1975. *Dois fungos na região amazônica que produzem propágulos vegetativos*. VIII Congresso da Sociedade Brasileira de Fitopatologia. Mossoró, RN. 2p.
- Kirschner R, Cáceres O, Piepenbring M (2018). Three new records of plant parasitic phyllosphere fungi from Panama: *Annelophora phoenicis*, *Cercospora corniculatae*, and *Sclerotium coffeicola*. *Check List*, 14 (1):93–100.
- Lourd M, Alves MLB 1986. A mancha zonada da gravioleira (*Annona muricata* L.) causada por *Sclerotium coffeicolum*, nova doença na região de Manaus. *Fitopatologia Brasileira*, 11(4):1015-1017.
- Nogueira EA, Mello NTC, Maia ML 2005. Produção e comercialização de anonáceas em São Paulo e Brasil. *Informações Econômicas*, 35(2):51-54.
- Okabe I, Arakawa M, Masumoto N 2001. ITS polymorphism within a single strain of *Sclerotium rolfsii*. *Mycoscience*, 42:107-13.
- Pérez-Vera OA, Cibrián-Tovar D, T-Hanlin R 2017. Primera descripción de *Sclerotium coffeicola* en caoba africana en México. *Revista Argentina de Microbiología*. 1-4.
- Queiroz CA, Silva AF, Cruz JC, Silva GF, Sousa NR, Matos KS, Hanada RE 2015. *Caracterização de Fusarium decemcellulare isolado de guaranazeiro (Paullinia cupana var. sorbilis) por meio de ERIC-PCR*. 2015. 5º Congresso sobre Diversidade Microbiana da Amazônia. Manaus, Amazonas. 9p.
- Saccas AM 1957. La maladie des taches zonées de Coffen excelsa en Oubangui-Chari, due à *Sclerotium coffeicolum* Stah. *Revue de Mycologie*. 22:65-84.
- Souza MF de, Martins MQ, Silva MFO, Coelho RI 2012. Omissão de macronutrientes em mudas de biribazeiro (*Rollinia mucosa* [Jacq.] Baill) cultivadas em solução nutritiva. *Agronomía Colombiana*, 30(1):41-45.
- Sousa TF, Queiroz CA, Sousa SB, Silva GF 2017 *Diferenciação genética entre as formas homotáticas e heterotáticas de Fusarium decemcellulare por meio de marcadores moleculares*. 2017. 6º Congresso sobre Diversidade Microbiana da Amazônia. Manaus, Amazonas. 7p.
- Spósito MB, Lopez AMQ, Belasque Junior J 2016. Doenças das Anonáceas e do Urucuzeiro. In: Amorim L., Rezende JAM, Bergamim Filho A, Camargo LEA (ed.). Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas. Agronômica Ceres, São Paulo, p.83-86.
- Stahel G. 1921. *De Sclerotium - Ziekte van de Liberica Koffie in Surinam*. Bull. Dept. van den Landbouw, Surinam, 42p.
- Tabosa SAS, Santos ABC 1983. Mancha zonada da folha de graviola (*Annona muricata* L.) no Estado do Pará. *Fitopatologia Brasileira*, 8:584.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S 2013 MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30:2725-2729.

- Templeton MD, Rikkerink EHA, Solon SL, Crowhurst RN 1992. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. *Gene*, 122:225-230.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J 1990. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, p.315-322.
- Xu Z 2008. Overwinter survival of *Sclerotium rolfsii* and *S. rolfsii* var. *delphinii*, screening hosta for resistance to *S. rolfsii* var. *delphinii*, and phylogenetic relationships among *Sclerotium* species. Ames, Iowa. (Master Dissertation. Iowa State University. ISU). 124p.
- Xu Z, Harrington TC, Gleason ML, Batzer JC 2010. Phylogenetic placement of plant pathogenic *Sclerotium* species among teleomorph genera. *Mycologia*, 102(2):337 – 346.

## Importância da viabilidade, conservação e uso biotecnológico de fungos anamorfos

Gabrielle Silva da Costa<sup>1</sup>, Hunter Douglas de Souza Lima<sup>2</sup>,  
Gláucia Rayane Pimentel Melo<sup>3</sup>, Jamile Cristina Figueiredo Barros de Moraes<sup>4</sup>,  
Daniela Alexandra Silva de Oliveira<sup>4</sup>, Maria Aparecida de Jesus<sup>4</sup>

<sup>1</sup> PG Biotecnologia, Universidade do Estado do Amazonas

<sup>2</sup> PG Educação Física, Universidade São Judas Tadeu de São Paulo

<sup>3</sup> PG Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas

<sup>4</sup> Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Emails: gaabriellecosta@gmail.com, hunterdouglasshd@gmail.com, danielasoliveir@gmail.com, glaucia.rayane@gmail.com, jamile\_moraes17@hotmail.com, ranhna@gmail.com.

### Resumo

Os fungos anamorfos são encontrados em diversos ambientes e possuem importância ecológica e econômica, e para suas aplicabilidades, faz-se necessárias diversas etapas, como o isolamento, a purificação, caracterização, identificação, armazenamento em diferentes métodos de preservação, visando à viabilidade desses fungos. O objetivo deste trabalho foi reativar fungos anamorfos, verificar a viabilidade das linhagens e identificá-las. Foram reativadas 273 estirpes, sendo (74) linhagens de *Aspergillus* spp, (106) de *Penicillium* spp, (49) de *Paecilomyces* spp e (44) de *Trichoderma* spp. As quais foram caracterizadas macroscopicamente e microscopicamente com base nas literaturas e chaves dicotômicas. Estas linhagens foram preservadas em quatro métodos de conservação (óleo mineral, sílica-gel, repique contínuo e água destilada esterilizada) e por fim armazenadas na Coleção de Culturas de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural-INPA, onde encontram-se acessíveis para futuros estudos e aplicações biotecnológicas.

**Palavra-chave:** Coleção microbiológica, Culturas, Biotecnologia e Fungos.

### Introdução

Os fungos anamorfos, apresentam como característica principal a reprodução assexuada que ocorre no sistema vegetativo através da produção contínua de conidióforos e conídios (Ellis, 1971; Kendrick, 2000; Kirk *et al.*, 2001). Os conidióforos são micélios distintos que originam as células conidiogênicas, estas por sua vez, formam as estruturas de disseminação das espécies, os conídios, que são largamente disseminados no ambiente através do vento (Neufeld, 1999; Kirk *et al.*, 2001). Estes fungos são amplamente distribuídos no ambiente, algumas espécies são cosmopolitas, podendo ser encontrados em diferentes habitats terrestres, aquáticos, associados a animais, material vegetal vivo ou em decomposição e em produtos produzidos pelo homem (Gravesen *et al.*, 1994; Gusmão *et al.*, 2000).

Os anamorfos apresentam potencial econômico para as indústrias farmacêuticas e alimentícias, pois podem produzir antibióticos, vitaminas, enzimas, ácidos orgânicos, fermentarem bebidas, dentre outros (Mercado-Sierra, 1984; Gravesen *et al.*, 1994; Bononi, 1999; Kendrick, 2000). Por outro lado, podem causar danos à saúde do homem e animais, com patologias graves, chamadas micotoxicoses, que podem levar à morte (Gravesen *et al.*, 1994). Além disso, podem atacar folhas, frutos e raízes, reduzindo seu desenvolvimento, causando murchas, necroses e levando os indivíduos à morte (Bergamin Filho *et al.*, 1995).

No acervo de fungos lignocelulíticos da coleção microbiológica do Laboratório de Patologia da Madeira do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – LPM/INPA estão preservados diversos gêneros de fungos anamorfos, dos quais *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Trichoderma* se destacam pela grande incidência na região e por serem fungos com grande interesse econômico e de ampla aplicabilidade. Isolados desses gêneros são utilizados em pesquisas com foco em taxonomia e aplicações biotecnológicas, como nos setores industrial, agrossilvicultural, farmacológico e medicinal (Bononi, 1999; Kendrick, 2000).

Abreu e Tutunji (2004) caracterizam as coleções de culturas microbiológicas como unidades de conservação *ex situ*, ou seja, fora do seu ambiente natural. Canhos *et al.* (2004) descreve padrões a serem seguidos para uma boa caracterização de amostras em coleções, são elas: coletar a cepa, identificá-la e preservá-la em pelo menos três métodos de conservação distintos para que possam ser acessadas sempre que necessário (Gravesen *et al.*, 1994).

Visando a conservação e manutenção de culturas de fungos em coleções de microrganismos, são utilizados vários métodos de preservação e técnicas de manipulação descritas nas literaturas, todavia, todos visam diminuir ou retardar o metabolismo celular (Quinn, 2005). Para que um método seja considerado eficaz é imprescindível assegurar a viabilidade do isolado através da conservação das características genéticas, morfofisiológicas e de virulência do indivíduo (Abreu e Tutunji, 2004; Quinn, 2005).

A escolha do método de manutenção mais adequado deve ser baseada pelas características do microrganismo em estudo, levando em consideração as vantagens e desvantagens de cada técnica a ser aplicada, assim como a disponibilidade da coleção em custear e manipular a técnica escolhida (Sola *et al.*, 2012). Na coleção microbiológica do INPA são utilizadas para preservação de cepas de fungos anamorfos as técnicas de repique contínuo, óleo mineral, água destilada esterilizada (Castellani) e sílica-gel.

No âmbito da preservação das culturas, o objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade de fungos anamorfos preservados nos quatro métodos de conservação utilizados na coleção e identificar as espécies dos gêneros que estão depositados na Coleção Microbiológica – INPA, e realizar um levantamento literário de seus possíveis potenciais. Vale ressaltar que, para confirmar as possíveis aplicabilidades das espécies estudadas neste trabalho, faz-se necessário os testes em laboratório.

## Material e Métodos

Foi realizado um levantamento das linhagens de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Trichoderma* que se encontravam depositadas na Coleção de Culturas de Microrganismos do LPM/INPA. Para a reativação optou-se por utilizar amostras mais atuais (dentro dos métodos de conservação armazenados), com isso, foi retirado um inóculo da amostra selecionada e posto no centro de uma placa de Petri com meio de cultura BDA (Batata Dextrose-Ágar), visando obter culturas puras. As novas amostras foram incubadas à temperatura de 27 °C até o crescimento micelial (5 a 7 dias).

As cepas foram caracterizadas morfológicamente e identificadas de acordo com os critérios estabelecidos (velocidade de crescimento, textura, coloração, presença de pigmentos, entre outros) por Neufeld (1999) e com o uso de literaturas e chaves dicotômicas.

Os microrganismos foram realocados em triplicata na coleção nos mesmos métodos em que estavam depositados. Para o método de repicagem contínua, foi realizada transferência de uma porção fúngica para novos tubos contendo meio de cultura, visando o crescimento micelial. Após o crescimento, as culturas foram mantidas em temperatura ambiente ou baixa temperatura.

Para a manutenção em óleo mineral, foi depositada uma camada de óleo esterilizado, aproximadamente 1 cm sobre a cultura (Costa e Ferreira, 1991; Canhos *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2009).

No método de preservação Castellani (água destilada), discos miceliais (7 mm) foram colocados em microtubos com aproximadamente 4 mL de água destilada (esterilizada) e mantidos em temperatura ambiente (Figueiredo e Pimentel, 1975; Romeiro, 2006; Neufeld e Oliveira, 2008). Por fim, no método de preservação em sílica-gel, foi espalhada uma suspensão de esporos de fungo sobre a sílica-gel e, em seguida, mantidas em temperatura ambiente ou em baixa temperatura (Neufeld e Oliveira, 2008).

## Resultados e Discussão

O total de 273 amostras, referentes aos representantes dos gêneros propostos, foram reativadas, identificadas e realocadas na coleção, e estão divididas em 74 linhagens de *Aspergillus*, 106 de *Penicillium*, 49 de *Paecilomyces* e 44 de *Trichoderma*.

Das linhagens de *Aspergillus*, identificadas em nível de espécie, *A. niger* (46), *A. japonicus* (15) possuem maior representatividade, seguidos por *A. flavus* (9), *A. candidus* (1), *A. nomius* (2) e *A. fumigatus* (1) (Tabela 1).

Entre os representantes de *Penicillium*, foram identificadas a nível morfológico as espécies *P. chrysogenum* (3), *P. commune* (3), *P. fellutanum* (2), *P. griseofulvum* (2), *P. roquefortii* (2), *P. corylophilum* (1), *P. expansum* (2), *P. frequentans* (1), *P. glabrum* (1), *P. melinii* (1) Thom, *P. raistricki* (1) e *P. verruculosum* (4) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Relação dos espécimes identificados de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Trichoderma* reativados e identificados presentes na coleção de Microbiologia do LPM/INPA.

Táxon	Quantidade	Possível aplicabilidade	Referências
<i>Aspergillus</i>			
<i>A. candidus</i> Link	1	Produção de micotoxinas	Pitt (1988)
<i>A. flavus</i> Link	9	Produção alimentícia em frutas cítricas	Klich (2002)
<i>A. fumigatus</i> Fresen	1	Produção de micotoxinas	Pitt (1988)
<i>A. japonicus</i> Saiato	15	Produção de micotoxinas	Pitt (1988)
<i>A. niger</i> Tiegh	46	Produção alimentícia na produção do shoyu	Klich (2002)
<i>A. nomius</i>	2	Produção de aflatoxina	Pitt (1988)
<i>A. candidus</i> Link	1	Produção de micotoxinas	Pitt (1988)
<i>Penicillium</i>			
<i>P. chrysogenum</i> Thom	3	Prod. de enzimas para medicamentos.	Pallu (2010)
<i>P. citrinum</i> Thom	17	Indústria farmacêutica e controle de <i>Aspergillus niger</i> .	Pallu (2010); Damasceno (2012)
<i>P. commune</i> Thom	3	Produção enzimas para medicamentos.	Pallu (2010)
<i>P. corylophilum</i> Dierckx	1	Produção de enzimas.	Pallu (2010)
<i>P. expansum</i> Link	2	Produção de enzimas.	Pallu (2010)
<i>P. fellutanum</i> Biourge	2	Produção de enzimas.	Pallu (2010)
<i>P. frequentans</i> Westling	1	Prod. de enzimas para medicamentos.	Pallu (2010)
<i>P. glabrum</i> (Wehmer) Westling	1	-	-
<i>P. griseofulvum</i> Dierckx	2	Prod. de enzimas para medicamentos.	Pallu (2010)
<i>P. lividum</i> Westling	8	Produção de metabólitos secundários.	Pallu (2010)
<i>P. melinii</i> Thom	1	-	-
<i>P. raistricki</i> Smith	1	Produção de enzimas.	Pallu (2010)
<i>P. roquefortii</i> Thom	2	Produção de queijo.	Pallu (2010)
<i>P. verruculosum</i> Peyronel	4	-	-
<i>Paecilomyces</i>			
<i>P. aeruginus</i> Samson	2	Agente termofílico ou termotolerante	Bagy e Abdel-Mallek (1991)
<i>P. byssochlamydoides</i> Stolk & Samson	1	Agente marcador de imunotoxicidade	Domenech <i>et al.</i> (1999)
<i>P. carneus</i> (Duché e R. Heim) AHS Br. & G. Sm.	2	Promoção de atividades de lacase	Cupul <i>et al.</i> (2014)
<i>P. leycettanus</i> (HC Evans & Stolk) Stolk, Samson e HC Evans	1	-	-
<i>P. niveus</i> Stolk & Samson	1	Biodegradador de insumos petrolíferos	Lemos <i>et al.</i> (2002)
<i>P. variotii</i> Bainier	39	Prod. de enzimas, atividades antagonicas.	EL-Aziz <i>et al.</i> (2015); Ansari <i>et al.</i> (2017)
<i>Trichoderma</i>			
<i>T. atroviride</i> P. Karst.	1	Promoção de crescimento vegetal	Contreras-Cornejo <i>et al.</i> (2009); Gravel <i>et al.</i> (2007)
<i>T. hamatum</i> (Bonord.) Bainier	2	Promoção de crescimento vegetal	Hohmann <i>et al.</i> (2011)
<i>T. koningii</i> Oudem.	1	Agente de biocontrole	Trutmann e Keane (1990)
<i>T. longibrachiatum</i> Rifai	1	Atividade antibacteriana	Ivania <i>et al.</i> (2015)
<i>T. pseudokoningii</i> Rifai	2	Agente de biocontrole	Mei <i>et al.</i> (2012)
<i>T. virens</i> (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx	4	Promoção de crescimento vegetal e controle biológico	Contreras-Cornejo <i>et al.</i> (2009)

*Paecilomyces* encontra-se representado por *P. variotii* (39), *P. aerugineus* (2), *P. carneus* (2), *P. byssochlamydoides* (1), *P. leycettanus* (1) e *P. niveus* (1). Por fim, entre os representantes de *Trichoderma* foram identificadas *T. atroviride* (1), *T. hamatum* (2), *T. koningii* (1), *T. longibrachiatum* (1), *T. pseudokoningii* (2) e *T. virens* (4) (Tabela 1).

A diversidade microbiológica da região Amazônica e a busca pelo desenvolvimento tecnológico e científico elevam o potencial das coleções biológicas, tornando-as responsáveis por um amplo trabalho microbiológico, que visa à conservação da diversidade genética entre os microrganismos e a necessidade de conservação destes recursos (Sola *et al.*, 2012).

O uso das técnicas de preservação visa manter o metabolismo celular ativo, entretanto, de forma reduzida e conseqüentemente a reprodução inibida (Costa e Ferreira, 1991; Canhos *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2009). A técnica de preservação em óleo, quando bem executado, reduz a velocidade de desidratação do meio de cultura e possibilita maior longevidade às linhagens (Canhos *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2009), entretanto, foi observado durante o estudo que a reativação neste método é lenta quando comparada à repicagem periódica.

Dados semelhantes encontrados neste trabalho foram relatados por Figueiredo e Pimentel (1975), Kew (1977), Pimentel *et al.* (1981), Romeiro (2006), Green (2008), que ao utilizar a técnica de repique contínuo foi observado a necessidade da manutenção a cada três ou quatro meses, a fim de evitar o consumo total do substrato, e conseqüentemente a perda das culturas.

Segundo Guimarães (2011), o método Castellani é simples, econômico e mais vantajoso em relação aos outros métodos utilizados na conservação de linhagens de *Aspergillus* e *Penicillium*. Esses dados corroboram com o presente estudo, uma vez que, foi observada a facilidade em reativar microrganismos depositados neste método.

Todos os métodos de preservação apresentam vantagens e desvantagens, e durante a avaliação da viabilidade das cepas em diversos métodos, é possível verificar qual o mais adequado para o grupo de microrganismos estudado. Contudo, para assegurar a viabilidade e a estabilidade celular dos isolados, faz-se necessário a realização da manutenção das cepas periodicamente para evitar contaminações ou perda das características morfofisiológicas (Colauto *et al.*, 2012).

## Conclusões

Todas as linhagens selecionadas foram reativadas e identificadas, e apresentaram características macroscópicas e microscópicas de acordo com o descrito em suas chaves dicotômicas.

As culturas estão preservadas em baixa temperatura, água destilada, sílica gel e óleo mineral, e podem ser acessadas na Coleção de Culturas de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural-INPA para estudos posteriores, processos biotecnológicos e obtenção de novos produtos de interesse econômico.

## Referências

- Abreu MMV, Tutunji VL 2004. Implantação e manutenção da coleção de Culturas de microorganismos do UniCEUB. *Universitas Ciências da Saúde*, 02(2): 236-25.
- Ansari L, Sirchi RV, Bonjar GHS, Moosavi SAA 2017. Screening of antagonistic activity in diferente *Streptomyces* species against *Paecilomyces variotii* and verification of some of the physiological properties of the antagonists. *Intl J Farm & Alli Sci*. 6(6):135-142.
- Bagy MM, Abdel-Mallek AY 1991. Thermophilic and thermotolerant fungi of animals' hair. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 38(2):117-20.
- Bergamin Filho A, Kimati H, Amorim L 1995. Manual de Fitopatologia. São Paulo. Editora Agronômica Ceres, 450p.
- Bononi VLR 1999. Zigomycetes, Basidiomycetes e Deuteromycetes: Noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. In: Grandi, R. A. P. (Ed.). *Taxonomia de deuteromycetos*. Instituto de Botânica, Secretaria do Estado do Meio Ambiente. São Paulo, SP. 1(1):141-160.

- Canhos VP, Umino CY, Manfio GP 2004. Coleções de microrganismos: coleções de culturas de microrganismos. [online]. Brasil, Disponível em: < <http://www.biota.org.br/pdf/v72cap03.pdf> > Acesso em: 20 de abril de 2018.
- Colauto NB, Cordeiro FA, Geronimi KVN, Lima TG, Lopes AD, Nunes RAR, Roratto FB, Tanaka HS, Zagui Junior LL, Linde GA 2012. Viability of *Agaricus blazei* after long-term cryopreservation. *Annals of Microbiology*, 62(2):871-876.
- Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez, Cortés-Penagos C, López-Bicio J 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 149(3): 1579–1592.
- Costa CP, Ferreira MC 1991. Preservação de Microrganismos. *Revista de Microbiologia*, 22(1): 263-268.
- Costa EC, Teixeira MFS, Dantas TVM, Melo VSP, Araujo SAC, Rolim, BN (2009). Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. *Ciência Animal*, 19(2):111-122.
- Cupul WC, Abarca GH, Carrera DM, Vazquez RR 2014. Enhancement of ligninolytic enzyme activities in a *Trametes maxima*-*Paecilomyces carneus* co-culture: Key factors revealed after screening using a Plackett-Burman experimental design. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17(3):114-121.
- Damasceno LC (2012). *Potencial de Penicillium citrinum para controle Aspergillus niger, agente causal da podridão vermelha do sisal*. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do Rêconcavo da Bahia.
- Domenech J, Prieto A, Barasoia I, Gomez-Miranda B, Bernabe M, Leal JA 1999. Galactomannans from the cell walls of species of *Paecilomyces* sect. *Paecilomyces* and their teleomorphs as immunotaxonomic markers. *Microbiology*, 145:2789–2796.
- El-Aziz ABEA, Awad AAE, Zaki GH 2015. Reduction of olive oil mill waste water phenolic compounds and COD using *Paecilomyces variotii*. *Trends in Industrial Biotechnology Research*. 1:1-9.
- Ellis MB 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. X. *Mycological Papers*, 125(1):1-30.
- Figueiredo MB, Pimentel PVC 1975. Métodos utilizados para conservação de fungos na Micoteca da Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico. *Summa Phytopatologica*, 1(1):299-302.
- Gravel V, Antoun H, Tweddell RJ 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry*, 39:1968–1977.
- Gravesen S, Frisvad JC., Samson R.A 1994. Microfungi. *High Tech PrePress*. 23:23-32.
- Green, L H 2008. *Practical handbook of microbiology*. CRC: London, 2 ed.
- Guimarães, LC 2011. *Métodos de Preservação de fungos potencialmente toxicogênicos*. 55 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Gusmão LFP, Grandi RAP, Milanez AI 2000. A new species of *Beltraniopsis* from Brazil, with a key to the known species. *Mycological Research*, 104:251-253.
- Hohmann P, Jones EE, Hill RA, Stewart A 2011. Understanding *Trichoderma* in the root system of *Pinus radiata*: associations between rhizosphere colonisation and growth promotion for commercially grown seedlings. *Fungal Biol*, 115(8): 759–767.
- Ivania MOP, Arthur VS, Marília GSS., Jadson DPB, Renan NB, Dianny CVS, Virgínia MS, Cristina MSM, Laura MP 2015. *Potencial antibacteriano de fungos endofíticos de cactos da Caatinga, uma floresta tropical seca no Nordeste do Brasil*. Disponível em: <http://www.periodicos.ufpb.br/index.php/gaia/article/view/26351>. Acesso em: 02 Jun. 2018.
- Kendrick B 2000. *The Fifth Kingdom*. Focus Publishing, Newburyport. 3 ed. 512 p.
- Kew S 1977. Preservation of fungal cultures. Wallingford: Commonwealth Mycological Institute.
- Kirk PM, Cannon, PF, David JC, Stalpers, JA 2001. Dictionary of the Fungi. 9 ed. CAB International, Wallingford.
- Klich M.A 2002. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. *Mycologia*, 94(1):21-27.
- Lemos JLS, Rizzo AC, Millioli VS, Soriano AU, Sarquis MIM., Santos R 2002. Petroleum degradation by filamentous fungi. In: 9th Annual International Petroleum Environmental Conference.
- Mercado-Sierra, A. Hifomicetes Demaciáceos De Sierra Del Rosario 1984. Cuba. Editorial Academia, La Habana.
- Mei S, Lei C, Xiao-Wei W, Tian Z, Pei-Bao Z, Xiao-Yan S, Cai-Yun S, Xiu-Lan C, Bai-Cheng Z, Yu-Zhong Z 2012. Antimicrobial peptaibols from *Trichoderma pseudokoningii* induce programmed cell death in plant fungal pathogens. *Microbiology*, 158, 166-175.

- Neufeld PM, Oliveira PC 2008. Preservação de dermatófitos pela técnica da água destilada estéril. *Revista Brasileira Análises Clínicas*. 40(3):167-169.
- Neufeld PM 1999. Manual de Micologia Médica: técnicas básicas de diagnóstico. 1a ed. Rio de Janeiro, 240 p.
- Pimentel PVC, Feitosa MI, Chiba S 1981. Contribuição ao estudo da viabilidade e variabilidade de alguns isolados de *Phytophthora* do cacau (*Theobroma cacao* L.). *O Biológico*, 47(6):159-168.
- Pallu APS 2010. Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com cana de açúcar. Piracicaba, Brasil. (Tese Doutorado em Genética e melhoramento de plantas), 130p.
- Pitt JI 1988. A Laboratory guide to common *Penicillium* species. Commonwealth scientific and industrial research organization division of food research. Australia, 182p.
- Quinn PJ 2005. Microbiologia e Doenças Infecciosas. Porto Alegre: Artmed, 512p.
- Romeiro RS 2006. Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas. Material didático, Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa.
- Sola CM 2012. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. *Enciclopédia Biosfera*. 8 (14):390-398.
- Trutmann P, Keane PJ 1990. *Trichoderma konigii* as a biological control agent for *Sclerotinia sclerotiorum* in Southern Australia. *Soil Biology & Biochemistry*, Elmsford, 22(1): 43-50.

## Prospecção de extratos brutos de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. com ação antimicrobiana

Gigliola Mayara Ayres D'Elia<sup>1,2</sup>, Clarice Virginia Santos Goiabeira<sup>1,3</sup>,  
Ormezinda Celeste Cristo Fernandes<sup>1</sup>, Josy Caldas Rodrigues<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMDF/IOC/CRUZ

<sup>2</sup>Universidade do Estado do Amazonas – UEA

<sup>3</sup>Estácio do Amazonas

Emails: gigliolamayara@gmail.com, josy.silva@fiocruz.br, ormezinda.fernandes@fiocruz.br

### Resumo

O uso demasiado de medicamentos tem levado ao crescimento de bactérias multirresistentes, que se multiplicam cada vez mais rápido fazendo com que o uso de drogas para combater tais agentes patogênicos seja ineficaz. Fungos de países de clima tropical ou subtropical como o Brasil têm sido fontes de compostos naturais com atividades biológicas importante para a humanidade, dentre tais fungos podemos destacar os gêneros *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. Este estudo tem como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano de *Aspergillus* e *Penicillium* estocados na Coleção de Fungos da Amazônia – CFAM. Foram selecionadas 50 culturas fúngicas, sendo 25 de *Aspergillus* spp. e 25 de *Penicillium* spp., Para obtenção dos extratos as culturas viáveis foram cultivadas em Ágar Extrato de Levedura Czapeck (YES), a 28°C e, após sete dias, foi feita a extração a frio dos biocompostos em Acetato de Etila. Os biocompostos extraídos foram testados frente à levedura, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas pelo método de “cup plate” e foi obtida a Concentração Mínima e Inibitória – CIM. Dentre os extratos obtidos das 50 culturas fúngicas selecionadas, 29 (58%) apresentaram atividade antimicrobiana comprovada frente a pelo menos 1 microrganismo testado. O extrato 0143 apresentou o melhor resultado dentre os demais, sendo o único com atividade comprovada para inibição de *E. coli* na menor concentração observada no estudo, com 0,156 µg/mL. O gênero *Aspergillus* se destacou em relação ao *Penicillium*, já que o primeiro além de inibir mais de um microrganismo, inibiu-os nas menores concentrações. Os extratos fúngicos estudados apresentam resultados promissores, possibilitando testes futuros tais como a elucidação dos compostos com atividade positiva para o desenvolvimento de novos fármacos de origem microbiana tendo em vista o grande potencial dos fungos na região Amazônica.

**Palavras chave:** Amazônia, bioprospecção, fungos, metabólico secundário.

### Introdução

A prospecção biotecnológica de novos compostos com atividade antimicrobiana a partir da diversidade fúngica, tem sido uma das principais áreas estudadas atualmente no mundo, devido entre outros fatores ao uso irracional de medicamentos, levando ao surgimento de bactérias multirresistentes e a falta de drogas para combater tais agentes patogênicos (Abreu *et al.*, 2015; Clementino *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2016;).

A resistência microbiana é um problema de saúde pública associado a diversos fatores e fasciculado entre os sistemas de saúde de todo o mundo, sendo a resistência bacteriana segundo a *World Economic Forum Global Risks* listada como uma das grandes ameaças à saúde humana (Blair *et al.*, 2015). Cerca de 70% das bactérias que causam infecções hospitalares são resistentes a pelo menos um dos antibióticos recomendados. Tal fator contribui para uma ineficácia no tratamento, limitação de opções para terapia e o uso de drogas que são mais tóxicas ao organismo humano e de maior custo econômico (Neill JO, 2014; Indraningrat *et al.*, 2016).

O estudo do potencial biotecnológico dos fungos provenientes de países de clima tropical e subtropical como o Brasil tem sido fonte para a produção de compostos naturais com atividade biológica importante para a humanidade, devido à diversidade desses microrganismos, às moléculas que eles produzem como resultado do metabolismo primário e secundário e à conservação dos recursos genéticos fornecidas por eles (Teixeira *et al.*, 2011; Celestino *et al.*, 2014; Moraes *et al.*, 2014; Abreu *et al.*, 2018).

Espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, são consideradas de grande importância biotecnológica, por serem produtoras de diversos compostos naturais com ação biológica (Zhuravleva *et al.*, 2012). O gênero *Aspergillus* contém um grande número de espécies que são conhecidas por produzir metabólitos com estruturas variadas e com consideráveis atividades biológicas (Lotfy, 2018). Apesar das espécies de *Aspergillus* serem muito comuns, os constituintes bioativos do gênero não são amplamente explorados.

São conhecidos cerca de 6500 compostos bioativos de origem microbiana, sendo que 30% destes provêm dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. A exemplos de metabólitos fúngicos importantes como a anidulafungina e penicilina, isoladas dos fungos *Aspergillus nidulans* e *Penicillium chrysogenum*, respectivamente. Ressaltando que a partir da descoberta da penicilina, muitas classes de fungos que produzem substâncias de interesse passaram a ser estudadas. (Vanderlinde e Onofre, 2010; Selim, 2012). A variedade de produtos naturais com intrigantes atividades biológicas tem sido isolada de *Aspergillus* sp., como os alcaloides, peptídeos, terpenos e lignanas (Lotfy, 2018).

Considerando a necessidade de novas pesquisas sobre a busca de biomoléculas bioativas, a biodiversidade de fungos ocorrentes na região amazônica e a possibilidade de se obter novos bioprodutos oriundos de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, muito comuns nos ecossistemas terrestres da Amazônia, essa pesquisa tem como objetivo detectar biomoléculas bioativas com ação antimicrobiana provenientes dos extratos brutos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, isolados no bioma Amazônico, através de técnicas rápidas e qualitativas como o método do “Cup Plate”.

## Material e métodos

Para este estudo foram avaliados 25 isolados do gênero *Aspergillus* e 25 de *Penicillium*, preservados em água destilada, cedidos pela Coleção de Fungos da Amazônia-CFAM, do Instituto Leônidas e Maria Deane-ILMD/FIOCRUZ (Tabela 1).

Os processos de reativação das culturas foram realizados de acordo com literatura especializada (Raper e Fennel, 1977; Pitt, 1985; Klich e Pitt, 1988).

As culturas de *Aspergillus* e *Penicillium* viáveis foram cultivadas em Ágar Extrato de Levedura e Sacarose (YES), a 28 °C, e após sete dias foi feita a extração a frio dos biocompostos em 200 mL de Acetato de Etila. Os extratos obtidos após 48 horas de extração foram filtrados e submetidos à concentração em Rotaevaporador e redissolvidos com o solvente extrativo para determinação da atividade antimicrobiana.

Os biocompostos extraídos foram testados frente à *Candida albicans* CFAM 1186, *Staphylococcus aureus* CBAM 0324 e *Escherichia coli* CBAM 0002. Os microrganismos testados foram semeados em placas de Petri (10 mm x 90 mm), contendo ágar Mueller-Hinton para bactérias e ágar Sabouraud para levedura. Desses cultivos foi preparada uma suspensão celular de concentração semelhante à coluna no 1 da escala de MacFarland e destes, 100 µL foram retirados para serem semeados na superfície ágar Sabouraud e ágar Müeller-Hinton, em placa de Petri. Nesses cultivos foram feito três poços de 5 mm de diâmetro e em cada poço foram acrescentado 150 µL do extrato fúngico. Esses cultivos foram incubados em estufa a 28 °C e 37 °C por 24 e 48 horas, respectivamente. Como padrão foi utilizado Itraconazol para a levedura e Cloranfenicol para as bactérias (MERCK, Alemanha, 20 mg. mL<sup>-1</sup>). A atividade antimicrobiana foi avaliada medindo-se o halo de inibição. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (Silva *et al.*, 2010).

A determinação da concentração mínima inibitória dos extratos obtidos foi realizada segundo a técnica de microdiluição em caldo (Telles e Mosca, 2000). O extrato foi solubilizado em DMSO 2% e os inoculos dos microrganismos teste foram preparados em meio por suspensão de culturas e ajustados à escala nº1 de MacFarland. As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação a leitura foi realizada verificando-se o crescimento do microrganismo, indicado pela cor roxa, e inibição, indicada pela ausência da cor roxa. A CIM foi determinada como a menor concentração do extrato fúngico capaz de impedir o crescimento celular. As concentrações utilizadas nesse estudo variaram de 10 à 0,156 µg/µL. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Os dados foram submetidos à análise estatística descritiva no Programa Excel Versão 7.0.

**Tabela 1.** Relação de culturas fúngicas selecionadas dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.

Fungo	CFAM	Fungo	CFAM
<i>P. purpurogenum</i>	0001	<i>A. sydowii</i>	0002
<i>P. fellutanum</i>	0061	<i>A. niger</i>	0010
<i>P. waksmani</i>	0065	<i>A. oryzae</i>	0048
<i>P. spinulosum</i>	0066	<i>A. niger</i>	0050
<i>P. sp.</i>	0071	<i>A. flavus- furcatis</i>	0088
<i>P. citrinum</i>	0079	<i>A. pseudonomius</i>	0143
<i>P. citrinum</i>	0087	<i>A. niger</i>	0205
<i>P. lividum</i>	0091	<i>A. niger</i>	0241
<i>P. citrinum</i>	0107	<i>A. flavus</i>	0313
<i>P. citrinum</i>	0116	<i>A. suboliváceo</i>	0314
<i>P. sp.</i>	0121	<i>A. sp.</i>	0367
<i>P. citrinum</i>	0139	<i>A. oryzae</i>	0391
<i>P. citrinum</i>	0157	<i>A. flavipe</i>	0403
<i>P. citrinum</i>	0183	<i>A. flavus</i>	0527
<i>P. purpurogenum</i>	0214	<i>A. pseudonomius</i>	0555
<i>P. citrinum</i>	0231	<i>A. oryzae</i>	0687
<i>P. citrinum</i>	0262	<i>A. japonicus</i>	0742
<i>P. citrinum</i>	0291	<i>A. oryzae</i>	0959
<i>P. citrinum</i>	0407	<i>A. tamari</i>	1064
<i>P. sp.</i>	0420	<i>A. sp.</i>	1168
<i>P. citrinum</i>	0464	<i>A. oryzae</i>	1188
<i>P. citrinum</i>	0493	<i>A. amoenus</i>	1189
<i>P. sp.</i>	0521	<i>A. sp.</i>	1248
<i>P. wotroi</i>	0581	<i>A. giganteus</i>	1312
<i>P. wotroi</i>	0583	<i>A. aculeatus</i>	1432

## Resultados e Discussão

Pela técnica de *Cup plate*, dos 50 extratos fúngicos obtidos verificou-se que 29 (58%) apresentaram atividade antimicrobiana para pelo menos 1 microrganismo testado, sendo 13 extratos de *Aspergillus* spp. e 16 de *Penicillium* spp., com halos de inibição variando de 2 a 30 mm de diâmetro.

Dentre os 13 (44,82%) extratos do gênero *Aspergillus*, 12 (92,3%) inibiram o crescimento da *S. aureus*, 4 (30,76%) inibiram o crescimento da *C. albicans* e 2 (15,38%) inibiram o crescimento de *E. coli*. Os extratos 0143, 0527 e 1064 inibiram 2 dos 3 microrganismos testados, e o extrato 0687 se destaca por ter inibido todos os microrganismos e 16 extratos de *Penicillium* que apresentaram atividade inibiram apenas o crescimento da *S. aureus* (Tabela 2).

Tanto os extratos de *Aspergillus* como os de *Penicillium* apresentaram ações inibitórias promissoras contra bactérias gram-positivas. Os resultados assemelham-se ao de Clementino (2015) quando em seu estudo com fungos endofíticos observou uma maior atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* do que para *Escherichia coli*. Também corrobora com Neto *et al.* (2017) onde seus extratos fúngicos do gênero *Penicillium* também comprovam atividade contra *S. aureus*.

Entretanto, os extratos fúngicos do gênero *Penicillium* apresentaram ação inferior aos avaliados por Silva (2010) quanto a não inibição do crescimento de *E. coli*, sugerindo assim que haja diferença na ação antimicrobiana de cada espécie (Neto *et al.*, 2017). Demonstrando que os fungos são geneticamente diferentes, pois espécies do mesmo gênero apresentam produção de metabólitos com ação diferente, o substrato de isolamento desses microrganismos também pode influenciar na produção de biocompostos.

Pela técnica de microdiluição em caldo, verificou-se que dentre todos os extratos que apresentaram atividade antimicrobiana positiva no teste de *cup plate*, 13 (44,8%) tiveram positividade na Concentração

Inibitória Mínima frente aos microrganismos testes em diferentes concentrações, tendo como destaque o extrato 0143 pertencente ao gênero *Aspergillus*, que apresentou o melhor resultado dentre os demais, com 0,156 mg/μL de CIM para inibição de *E. coli*. Quanto a *S. aureus*, quatro extratos apresentaram resultados com CIM de 2,5 mg/μL, uma das menores concentrações utilizadas em nossos estudos (Tabela 3).

Os resultados assemelham-se ao de Vanderline e Onofre (2010) quando em seu estudo com os metabólitos produzidos pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* contra *S. aureus* inibiu na mesma faixa de concentração de nosso estudo.

**Tabela 2.** Atividade antimicrobiana dos extratos de *Aspergillus* e *Penicillium* pelo método do “cup plate” com os halos de inibição em mm

Extratos Fúngicos/CFAM	Atividade antimicrobiana (Halos em mm)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
<i>P. purpurogenum</i> 0001	-	5	-
<i>A. sydowii</i> 0002	-	5	-
<i>A. oryzae</i> 0048	-	8	-
<i>P. fellutanum</i> 0061	-	5	-
<i>P. waksmani</i> 0065	-	10	-
<i>P. sp.</i> 0071	-	5	-
<i>P. citrinum</i> 0087	-	5	-
<i>A. flavus-furcatis</i> 0088	-	-	13
<i>P. citrinum</i> 0107	-	8	-
<i>P. citrinum</i> 0116	-	10	-
<i>P. citrinum</i> 0139	-	14	-
<i>A. pseudonomius</i> 0143	14	10	-
<i>P. citrinum</i> 0157	-	8	-
<i>P. purpurogenum</i> 0214	-	10	-
<i>P. citrinum</i> 0231	-	5	-
<i>P. citrinum</i> 0262	-	5	-
<i>P. citrinum</i> 0291	-	7	-
<i>A. flavus</i> 0313	-	5	-
<i>A. oryzae</i> 0391	-	5	-
<i>A. flavipe</i> 0403	-	5	-
<i>P. citrinum</i> 0407	-	5	-
<i>P. citrinum</i> 0464	-	30	-
<i>P. citrinum</i> 0493	-	8	-
<i>A. flavus</i> 0527	-	10	8
<i>A. oryzae</i> 0687	5	4	10
<i>A. japonicus</i> 0742	-	10	-
<i>A. oryzae</i> 0959	-	5	-
<i>A. tamar</i> 1064	-	2	10
<i>A. amoenus</i> 1189	-	12	-

**Tabela 3.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. frente aos microrganismos testes.

Extratos Fúngicos/CFAM	Concentração Inibitória Mínima (CIM) (Concentração em mg/μL)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
<i>A. oryzae</i> 0048	-	10	-
<i>P. fellutanum</i> 0061	-	10	-
<i>P. citrinum</i> 0087	-	10	-
<i>P. citrinum</i> 0139	-	10	-
<i>A. pseudonomius</i> 0143	0,156	5	-
<i>P. citrinum</i> 0157	-	10	-
<i>P. purpurogenum</i> 0214	-	2,5	-
<i>P. citrinum</i> 0231	-	2,5	-
<i>A. flavus</i> 0313	-	10	-
<i>A. oryzae</i> 0391	-	2,5	-
<i>P. citrinum</i> 0493	-	10	-
<i>A. flavus</i> 0527	-	10	5
<i>A. japonicus</i> 0742	-	2,5	-

## Conclusões

Os extratos fúngicos estudados apresentam resultados promissores, principalmente frente a cepa de *Staphylococcus aureus* testada, e dentre os extratos fúngicos, destaca-se a potencialidade dos fungos do gênero *Aspergillus*, por apresentar produção de biocompostos de amplo espectro. Para um resultado mais potente estudos futuros se faz necessários para a elucidação das substâncias com atividade antimicrobiana para o desenvolvimento de novos fármacos de origem microbiana, confirmando assim o grande potencial biotecnológico dos fungos na região Amazônica.

## Referências

- Abreu JAS, Rovida AFS, Pamphile JO 2015. Fungi of Interest: Biotechnological Applications. *Revista UNINGÁ Review*, 21(1): 55-59.
- Abreu JAS, Rovida AFS. Pamphile JO 2018. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. *Revista UNINGÁ Review*, 21(1).
- Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV 2015. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Nature*, 13: 42-51.
- Celestino JR, Carvalho LE, Lima MP, Lima AM, Ogusko MM, Souza JVB 2014. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. *Processes Biochemistry*, 49: 569-675.
- Cheng G, Dai M, Ahmed S, Hao H, Wang X, Yuan Z 2016. Antimicrobial Drugs in Fighting against Antimicrobial Resistance. *Frontiers in Microbiology*, 7: 470.
- Clementino LC, Barbosa CC, Silva FD, Queiroz JCF 2015. Bioprospecção de antibióticos produzidos por fungos da Caatinga. *Evidência*, Joaçaba, 15(1): 37-56.
- Indraningrat AAG, Smidt H., Sipkema D 2016. Bioprospecting Sponge-Associated Microbes for Antimicrobial Compounds. *Marine Drugs*. 14 (87): 1- 66.
- Klich MA, Pitt I 1988. A Laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Australia. 116p.
- Lotfy MM 2018. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, in press. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.02.002>.
- Morais JF, Yoshimoto M, Rhoden SA, Pamphile JA 2014. Bioprospecção de Microrganismos Produtores de Compostos Bioativos com Atividade Antitumoral. *Revista UNINGÁ Review*, 17 (1): 27-34.
- Neto VFM., Lima MS, Nunes APR, Teixeira RHF., Silva RHF 2017. Ação antimicrobiana de extratos produzidos a partir de fungos filamentosos contra *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. *Revista Brasileira de Agrotecnologia (BRASIL)*, 7(2): 198-202.
- O'Neill J 2014. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. Review on Antimicrobial Resistance. Available online: <http://amr-review.org/Publications> (accessed on 15 outubro 2016).
- Pitt JI (1985). A laboratory guide to common PENICILLIUM species. Sydney. CSIRO Division of Food Processing.
- Raper KB, Alexander DF 1945. Preservation of molds by the lyophil process. *Mycology*, 37:499-525.
- Raper KB, Fenell DI 1977. The genus *Aspergillus*. Malabar, Robert and Krieger Malabar.
- Santos SN 2012. Bioprospecção de Biomoléculas isoladas de fungos endofíticos de *Combretum leprosum* do bioma Caatinga/ Suikinai Nobre Santos. Piracicaba.
- Selim K, El-Beih AA, Abdel-Rahman TM, El-Diwany AI 2012. Biology of Endophytic Fungi. Current Research in Environment e Applied Mycology. Doi 10.5943/cream/2/1/3.
- Silva JC 2008. Perfil da viabilidade celular e atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* do acervo da coleção de culturas DPUA. 45 f. Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- Silva JC, Fernandes OCC, Martins MS, Rodrigues JRAC., Teixeira MFS 2010. Atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* mantidas sob duas condições de preservação. *Revista de la Sociedad. Venezolana de Microbiologia* 30: 48-54.
- Teixeira MFS., Silva TA, Palheta RA, Carneiro ALB, Atayde HM 2011. Fungos da Amazônia: Uma riqueza inexplorada (aplicações biotecnológicas). EDUA, Manaus.
- Telles MAS, Mosca A 2000. Avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação de concentração inibitória mínima da isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 59(1/2): 16-19.
- Vanderlinde DG, Onofre SB 2010. Atividade Antimicrobiana de metabólitos produzidos pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* (Linnaeus: Fries) MURRILL. *Revista Saúde e Pesquisa*, 3(1): 11-16.
- Zhuravleva IO, Afiyatulloev SS, Denisenko VA, Ermakova SP, Slinkina NN, Dmitrenok PS, Kim NY 2012. Secondary metabolites from a marine-derived fungus *Aspergillus carneus* Blochwitz. *Phytochemistry*, 80:123-131.

# Identificação de fungos mitospóricos incorporados na Coleção Microbiológica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

Gláucia Rayane Pimentel Melo<sup>1</sup>, Maria Aparecida de Jesus<sup>2</sup>

<sup>1</sup> PPG Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas

<sup>2</sup> Pesquisadora, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Emails: glaucia.rayane@gmail.com, ranhna@inpa.gov.br

## Resumo

Os fungos mitospóricos são filamentosos, sapróbios e despertam grande interesse bioeconômico, devido aos seus potenciais e aplicabilidades biotecnológicas. Assim, objetivo deste trabalho foi identificar por meio da taxonomia clássica as linhagens de mitospóricos depositadas na Coleção de Culturas de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do INPA (CCMIA-INPA). Para isso, um total de 159 linhagens foram reativadas em meio de cultivo BDA (Batata, Dextrose e Ágar) e incubadas em estufa BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a  $\pm 28$  °C, durante 7 dias. Após a obtenção das culturas puras, foram realizadas as identificações das linhagens de acordo com as características macroscópicas e microscópicas das colônias. Desta forma, 100 linhagens foram identificadas em gênero e/ou espécies, distribuídas em: *Paecilomyces variotii* Bainier (19), *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson (14), *Paecilomyces niveus* Stolk & Samson (3), *Paecilomyces* spp. (4), *Aspergillus niger* Van Tieghen (13), *Penicillium citrinum* Thom (13), *Penicillium chrysogenum* Thom (4), *Penicillium implicatum* Biourge (2), *Penicillium lividum* Westling (2), *Penicillium* spp. (12), *Trichoderma harzianum* Rifai (6) e *Trichoderma* spp. (8). Todas estas estão armazenadas em óleo mineral, sílica gel e baixa temperatura e podem ser acessadas para estudos biotecnológicos e taxonômicos. Visto que, várias dessas espécies são descritas nas literaturas por apresentarem importância biotecnológica, agrossilvicultural, fitopatogênica e patogênica.

**Palavra-chave:** Coleção de culturas, Fungos anamorfos; Taxonomia.

## Introdução

Os fungos mitospóricos se diferem dos demais, principalmente, pelo seu modo de reprodução que é assexuada, por mitose, através da produção de conidióforos e conídios (Kendrick, 2000; Kirk *et al.*, 2001). São amplamente distribuídos, podendo ser encontrados em diversos ambientes como solo, ar, água, em matéria orgânica viva ou morta, em produtos produzidos pelo homem, associados a animais, plantas, material vegetal e até parasitando hospedeiros (Gusmão *et al.*, 2000). Despertam grande interesse científico e bioeconômico devido aos seus potenciais ecológico, patológico, fitopatológico e biotecnológico (Kendrick, 2000). Por esses motivos são amplamente utilizados nas indústrias farmacêuticas e alimentícias na produção de vitaminas, enzimas, antibióticos, ácidos orgânicos, fermentação de bebidas e maturação de alimentos (Mercado-Sierra, 1984; Gravesen *et al.*, 1994; Bononi e Grandi, 1999 e Kendrick, 2000).

Dentre os mitospóricos, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Aspergillus* são os gêneros mais representativos, com maior número de linhagens preservadas na CCMIA-INPA. *Penicillium* tem grande importância ecológica, pois atua como decompositor e reciclador de matéria orgânica (Terrasan, 2007), além de produzirem metabólitos secundários bioativos que são fonte de biocompostos de interesse industrial para fármacos, tanto nas áreas agrícola como médica (Elias, 2005). Algumas espécies são utilizadas no controle alternativo de outros fungos patógenos de cultivares e sementes na agricultura (Costa e Jesus 2012). Na área médica são utilizados na produção de fármacos como penicilina, bezentacil e outros antibióticos (Pallu, 2010) e na indústria alimentícia muitas espécies têm valor econômico tais como *Penicillium roquefortii* e *Penicillium camembert* empregados na produção de fermento e de diversos queijos (Rousseau, 1984; Pallu, 2010).

*Trichoderma* é um gênero com representantes de vida livre, comumente natural de solos, mas podem colonizar diversos ecossistemas. Apresentam grande importância na agronomia, uma vez que, várias espécies são utilizadas no biocontrole de doenças e ataques de outros fitopatógenos, graças aos diversos mecanismos que eles desenvolvem quando se associam as raízes das plantas, tais como antibiose, micoparasitismo, competição e indução de resistência. (Bettiol e Ghini, 1995; Harman *et al.*, 2004; Rosa e Herrera 2009; Viterbo e Horwitz, 2010; Consolo *et al.*, 2012). Além da importância agrônômica, *Trichoderma* spp., destacam-se pelo rápido crescimento, esporulação profusa, capacidade de crescimento em diferentes substratos e tolerância a compostos nocivos (Kubicek *et al.*, 2003, Howell, 2003 e Harman *et al.*, 2004).

*Aspergillus* compreende mais de 260 espécies (Varga, 2009). Este gênero é considerado cosmopolita e amplamente distribuído na natureza, o isolamento de espécies em solos e em plantas caídas é muito comum, o gênero possui uma abundância maior em regiões de clima tropical e subtropical (Klich, 2002). *Aspergillus* causa diversas doenças em plantas e degradam produtos vegetais, as espécies mais comuns são *A. niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* e *A. alliaceus* (Perrone, 2007).

*Paecilomyces* é outro gênero que agrega os fungos mitospóricos de ampla distribuição mundial e ocorrem em diferentes substratos lignocelulíticos (Samson, 1974). Também são associados a contaminações, pois podem provocar doenças alérgicas, micoses oportunistas e infecções, tais como úlcera de córnea, ceratite e endoftalmite, causados por uso incorreto de lentes de contato ou cirurgias oculares mal realizadas (ChanTack *et al.*, 1999; Mandarapu, 2015). Atualmente, cerca de 84 espécies estão descritas para *Paecilomyces* (Samson, 1974), com destaque para *P. variotii* Bainer e *P. lilacinus* Samson, diferenciados pela cor da colônia, tamanho e forma dos esporos. Ambas as espécies apresentam grande potencial agrossilvicultural (Samson, 1974).

As cepas de fungos mitospórico depositadas na CCMIA-INPA foram isoladas de diversas espécies florestais de importância econômica, de diferentes substratos lignocelulíticos que foram estudados sobre seu efeito na durabilidade natural de madeira. De modo que a identificação deste grupo de fungos contribui para o conhecimento das diversidades, ocorrência e distribuição de espécies, portanto o propósito deste trabalho foi reativar as culturas e identificar os fungos mitospóricos depositados na CCMIA-INPA, visando listar os possíveis potenciais biotecnológicos das espécies de fungos mitospóricos da coleção.

## Material e métodos

Inicialmente foi realizado um levantamento das linhagens de fungos mitospóricos não identificados depositadas na CCMIA-INPA, com o intuito de conhecer a qualidade das linhagens. Em seguida, estas foram organizadas em ordem crescente de acordo com o número de registro da Coleção e as culturas que apresentaram risco iminente de perda tiveram prioridade na reativação.

Após o levantamento, as linhagens foram repicadas em placas de Petri contendo meio BDA (200 g de Batata, 15 g de Dextrose e 20 g de Ágar (pH inicial 5,0)), em seguida foram incubadas na estufa BOD a  $\pm 28^{\circ}\text{C}$  durante sete dias. Em caso de contaminação, sucessivas repicagens foram realizadas, até a obtenção da colônia pura, visando a identificação e preservação das espécies nos diferentes métodos utilizados na coleção.

Com a finalidade de estimular o crescimento fúngico, após a obtenção da colônia pura, palitos de madeira estéreis de 1,0 a 1,5 cm embebidos com o caldo glicosado, foram colocados em uma placa de Petri, e com auxílio de uma pinça, foram transferidos um a um para a placa de Petri contendo a cultura de fungo. As placas foram mantidas na estufa a  $28^{\circ}\text{C}$  até o crescimento do fungo sobre o palito. Os palitos colonizados foram colocados em uma placa de Petri estéril, a qual foi exposta ao ambiente com  $21^{\circ}\text{C}$  a  $25^{\circ}\text{C}$  para secagem dos mesmos e para verificar se havia qualquer tipo de contaminação, do contrário os palitos colonizados foram colocados nos três métodos de preservação utilizados na Coleção: Repicagem contínua, óleo mineral e sílica-gel

Para a método de repicagem contínua (baixa temperatura) foram colocados palitos colonizados em tubo de ensaio com meio BDA e foram mantidos na estufa a  $28^{\circ}\text{C}$  durante sete dias. Após o crescimento,

sem qualquer contaminação ou descaracterização fenotípica, os tubos com as colônias foram estocados em triplicata em baixas temperaturas (5 a 8°C).

A manutenção em óleo mineral consiste no uso de vaselina esterilizada duas vezes, em dias consecutivos, por 15 minutos e colocados em tubos criogênicos 4mL de óleo com auxílio da pipeta. Foram inseridos em cada criogênico em média cinco palitos colonizados com fungos mitospóricos. Além disso, cinco palitos colonizados foram colocados em três tubos criogênicos esterilizados, contendo 10 g de sílica gel esterilizada a 121°C por 15 minutos por dois dias sucessivos. Tanto as amostras fúngicas preservadas em óleo mineral como em sílica gel, foram guardadas em triplicatas em caixas específicas para os mesmos e mantidas à temperatura ambiente entre 25 a 27 °C

A identificação das linhagens foi feita com base nas características macroscópicas e microscópicas da colônia, conforme as descrições feitas por Bononi e Grandi (1999), Samson (1974), Pallu (2010), Cardoso (1978), Pitt (1995) e nas disponibilizadas nos sites: Mycobank ([www.mycobank.com](http://www.mycobank.com)) e Index fungorum ([www.indexfungorum.org](http://www.indexfungorum.org)).

Como medida de segurança é importante ressaltar que todos os tubos foram devidamente etiquetados com o número do registro da cepa conservada no acervo, como também dados de localização do isolado, com o número da caixa e o localizador da cepa na caixa, a data e o método de preservação, e posteriormente todos estes dados foram colocados no banco de dados da CCMIA-INPA.

## Resultados e Discussão

Na CCMIA-INPA, estavam depositadas 159 linhagens de fungos mitospóricos não identificados que foram conservadas entre os anos de 2004 e 2010. Com este estudo, 100 foram identificadas e estão distribuídas em *Paecilomyces variotii* Bainier (19), *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson (14), *Paecilomyces niveus* Stolk & Samson (3), *Paecilomyces* spp. (4), *Aspergillus niger* Van Tieghen (13), *Penicillium citrinum* Thom (13), *Penicillium chrysogenum* Thom (4), *Penicillium implicatum* Biourge (2), *Penicillium lividum* Westling (2), *Penicillium* sp. (12), *Trichoderma harzianum* Rifai (6) e *Trichoderma* sp. (8) (Tabela 1). Observa-se que a maioria dos isolados é de *Paecilomyces*, *Aspergillus* e *Penicillium*. As espécies *P. variotii*, *P. lilacinus*, *A. niger* e *P. citrinum* se destacam em relação à ocorrência e maior número de isolados depositados no acervo.

Das 159 culturas de fungos mitospóricos que foram avaliadas nesse estudo, 100 linhagens foram identificadas, destas 76 em nível de espécie e 24 em gênero. Todas se encontram viáveis e estão mantidas em 3 métodos de conservação: óleo mineral, sílica-gel e baixa temperatura (repique contínuo) em triplicatas para evitar contaminação e possível perda das culturas.

As demais 59 linhagens foram descartadas pois apresentaram contaminações externas de microrganismos, tais como, bactérias, leveduras e outros fungos (contaminação cruzada) dentre outros, tornando a linhagem totalmente inviável para identificação e manutenção. Estas contaminações podem ter ocorrido por causa do tempo de conservação, que variavam entre os anos de 2008 a 2010, sem que houvesse manutenção periódica das mesmas. Pois, a conservação das culturas de fungos nos métodos de preservação acima citados, não garantem a pureza e estabilidade das características morfológicas, fisiológica e genética o que podem afetar a viabilidade e a estabilidade celular, uma vez que estão limitadas ao método aplicado e tempo de manutenção das culturas (Colauto *et al.*, 2012).

Dentre os *Paecilomyces*, *P. variotii* é um fungo bastante comum, podendo ser encontrado no ar e no solo de ambientes de climas subtropicais e/ou tropicais (Knösel e Rész 1973; Rhee, 2016), sendo comumente usados na agricultura, associado a outros fungos de interesse da agroindústria como proteção das galhas de raízes de café e de tomate (Campos *et al.*, 2001). Além disso, é associado à biodeterioração do óleo de palma, de juta, de papel, e de emulsões farmacêuticas (Samson 1974). Como patógeno, *P. variotii* pode causar infecções em humano tais como doenças cutânea como sinusite, endocardite, peritonite, fungemia e outras (Chan-Tack *et al.*, 1999; Mandarapu, 2015).

**Tabela 1.** Relação das linhagens de fungos mitospóricos identificadas e depositadas na Coleção Microbiológica – INPA, bem como a relação de suas aplicabilidades biotecnológicas.

Táxons	Nº de Linhagens	Aplicabilidades
<i>Aspergillus niger</i> Van Tieghen	13	Fermentação do Shoyu (Klich, 2002)
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson	14	Parasita de nematoides de galhas (Carneiro, 1992; Mizobutsi et al., 2000)
<i>Paecilomyces niveus</i> Stolk & Samson	3	Controle biológico de inseto (Mizobutsi et al., 2000)
<i>Paecilomyces variotii</i> Bainier	19	Proteção de galhas de raízes e biodegradação de óleo (Campos et al., 2001)
<i>Paecilomyces</i> sp.	4	Biocontrole e biodeterioração (Samson 1974; Campos et al., 2001)
<i>Penicillium citrinum</i> Thom	13	Antagonismo de <i>A. niger</i> (Damasceno, 2012)
<i>Penicillium crysogenum</i> Thom	4	Produção de antibióticos (Gravesen et al., 1994; Pallu, 2010)
<i>Penicillium implicatum</i> Biourge	2	Indústria farmacêutica (Silva e Lins, 2008)
<i>Penicillium lividum</i> Westling	2	Indústria farmacêutica (Silva e Lins, 2008)
<i>Penicillium</i> sp.	12	Ecológica, indústrias farmacêuticas e alimentícias (Elias, 2005; Terrasan, 2007 e Pallu, 2010)
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	6	Biofertilizantes (Maçã) (Harman et al., 2004)
<i>Trichoderma</i> sp.	8	Biocontrole de fitopatógenos (Silva 2000; Benitez 2004)
Total	100	

Do gênero *Penicillium*, *P. citrinum* é o mais representativo, com 13 linhagens (Tabela 1). Esta espécie produz micotoxinas responsáveis pela intoxicação de humanos e animais, quando se utiliza desses alimentos contaminados (Silva e Lins, 2008). *P. citrinum* geralmente é encontrado em solos subtropicais e presentes em menor frequência em solos de regiões temperadas (Pitt, 1985). Apresenta antagonismo com *A. niger* inibindo seu crescimento micelial, por isso é usado no controle da população de *A. niger*, patógeno causador da podridão vermelha no sisal (Damasceno, 2012). Outras espécies identificadas que também se destacam são *P. lividum* e *P. implicatum*, produtores de proteases e outras enzimas de interesse industrial que são amplamente utilizadas nas indústrias farmacêuticas para produção de antibióticos da classe Beta lactâmicos penicilina, amoxilina, bezentacil e outros antibióticos (Silva e Lins, 2008).

Um total de 13 linhagens de *Aspergillus* está depositada no acervo. Os fungos deste gênero são economicamente muito importantes, a maioria é utilizada na produção de diversos produtos de interesse biotecnológico e algumas espécies causam desordens em várias plantas, portanto são considerados patógenos oportunistas, entre os mais comuns, *A. flavus* e *A. Niger* (Varga, 2004). *A. niger* contaminam produtos agrícolas em diferentes fases, como pré-colheita, colheitas, processamento e manuseio (Perrone et al., 2007), além disso, causam sérias doenças pulmonares em pacientes imunossuprimidos (Person et al., 2010).

Comparando todas as linhagens dos fungos mitospóricos reativadas nesse estudo, aquelas preservadas em baixa temperatura foram as que mais apresentaram contaminações externas com bactérias, ácaros e principalmente com outros fungos, enquanto que as preservadas em sílica gel foram a mais viáveis, uma vez que este método preserva a cultura por maior tempo e reduz o risco de contaminação (Canhos et al., 2004; Costa et al., 2009).

Tanto a reativação como a identificação das linhagens dos fungos mitospóricos contribuíram com conservação das linhagens em diferentes métodos no acervo. E para o conhecimento da diversidade de pelo menos quatro gêneros: *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Trichoderma* na região amazônica. De modo que a preservação dessas linhagens é de suma importância considerando que a maioria das

espécies identificadas já foram descritas por apresentarem diversos potenciais, tais como: biotecnológico, para indústrias farmacêuticas, alimentícias e agroindustrial (Tabela 1). Assim, as linhagens preservadas na Coleção podem ser acessadas para fins científicos e didáticos (Canhos *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2009)

## Conclusões

O presente trabalho contribuiu para a recuperação e identificação de 100 linhagens de fungos mitospóricos, sendo a maioria identificada como pertencentes aos gêneros *Paecilomyces*, *Aspergillus* e *Penicillium*, com destaque para *P. variotti*, *P. lilacinus*, *A. niger* e *P. citrinum* com maior número de espécimes.

As 100 linhagens identificadas estão preservadas, viáveis e podem ser acessadas para estudos de taxonomia e/ou biotecnologia.

## Referências

- Benítez T, Rincón MA, Limón CM, Codón CA 2004. *Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains*. Department of Genetics, University of Sevilla, 4: 249-60.
- Bettiol W, GHINI R 1995. Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. Ceres. 3 ed. São Paulo.
- Bononi VLR 1999. Zigomycetes, Basidiomycetes e Deuteromycetes: Noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas, p.141-160. In: Grandi RAP. (Ed.). *Taxonomia de deuteromycetos*. v. 1. Instituto de Botânica, Secretaria do Estado do Meio Ambiente. São Paulo. SP.
- Campos, VP, Costa MJN, Pfenning LH, Oliveira DF 2001. Toxicidade de filtrados fúngicos a *Meloidogyne incognita*. *Fitopatologia Brasileira*, 26:749-755.
- Canhos VP, Umino, CY, Manfio GP 2004. Coleções de microrganismos: coleções de culturas de microrganismos. 82-101. Disponível em: < <http://www.biota.org.br/pdf/v72cap03.pdf> > Acesso em: 20 de fev. de 2018.
- Cardoso COM 1978. Fungos, p.58-123. In: Galli F, Tokeshi H, Carvalho PCT, Balmer TL, Kimati H, Cardoso CON, Salgado CL, Kugner TL, Cardoso EJV, Bergamim Filho. (Eds.) *A Manual de Fitopatologia*. v.1. Editora Agronômica Ceres, 2 ed. São Paulo, SP.
- Carneiro RMDG 1992. *Princípios e tendências do controle biológico de nematóides com fungos nematófagos*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 27:113-121.
- Chan-Tack KM, Thio CL, Miller NS, Karp CL, Ho C, Merz WG 1999. *Paecilomyces lilacinus* fungemia in an adult bone marrow transplant recipient. *Med Mycol*, 37:57-60.
- Colauto, NB, Cordeiro, F.A, Geronimi, KVN, Lima, TG, Lopes AD, Nunes, RAR, Roratto, FB, Tanaka, HS, Zagui Junior, LL, Linde, GA 2012) Viability of *agaricus blazei* after long-term cryopreservation. *Annals of Microbiology*; 62, (2): 871-876.
- Costa EC, Teixeira MFS, Dantas TVM, Melo VSP, Araujo SAC, Rolim BN 2009. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. *Ciência Animal*, 19 (2):111-122.
- Costa JS, Jesus MA, Nascimento ATR 2012. *Atividade antagônica in vitro de Xylaria spp. a Trichoderma spp. Isolados da região amazônica*. In: 45º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Manaus. Anais do 45º Congresso Brasileiro de Fitopatologia.
- Consolo VF, Monaco CI, Cordo CA, Salerno GL 2012. Characterization of novel *Trichoderma* spp. isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28:1389-1398.
- Damasceno LC 2012. *Potencial de Penicillium citrinum para controle Aspergillus niger, agente causal da podridão vermelha do sisal*. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.
- Elias BC 2005. *Estudo químico e atividades biológicas de extratos obtidos de culturas de Penicillium verrucosum Dierck*. (MSc Dissertação. Produtos Naturais e Sintéticos, FCF-USP. Ribeirão Preto). 23p.
- Gravesen S, Frisvad JC, Samson RA 1994. Microfungi. *High Tech PrePress*, Copenhagen, 2:43-56.
- Gusmão LFP, Grandi RAP, Milanez AI 2000. A new species of *Beltraniopsis* from Brazil, with a key to the known species. *Mycological Research*, 104: 251-253.

- Harman GE, Petzoldt R, Comis A, Chen J 2004. Interactions between *Trichoderma harzianum* Strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Plant Physiology*, 94 (2);146-153.
- Index Fungorum 2018. (<http://www.indexfungorum.org>). Acesso em: 09 de fev. 2018.
- Howell CR 2003. *Mechanisms Employed by Trichoderma Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts*. Plant Disease Vol. 87 No.1.
- Kendrick B 2000. *The Fifth Kingdom*. 3 ed. Focus Publishing, Newburyport.
- Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA 2001. *Dictionary of the Fungi*. 9 ed. CAB International, Wallingford.
- Klich MA 2002. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. *Mycologia*, 9(1): 21-27
- Knösel D; Rész A 1973. *Enzymatischer Abbau von Pektin und Zellulose durch wärmeliebende Spezies*. 1a ed. Pilze aus Müllkompost, 66p.
- Kubicek CP, Bissett J, Druzhinina I, Kullnig-Gradinger C, Szakacs G 2003. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South East Asian isolates. *Fungal Genetics Biology*, 98:310-31.
- Mandarapu SB, Mukku KK, Raju SB, Chandragiri S 2015. Bem sucedida reinserção cateter em um caso de *Paecilomyces varioti* peritonite em um paciente em diálise peritoneal ambulatorial contínua. *Indian J. Nephrol*, 25:177-179
- Mercado-Sierra A 1984. *Hifomicetes Demaciáceos De Sierra Del Rosario, Cuba*. Editorial Academia, La Habana, 32-45.
- Mizobutsi EH, Ferraz S, Ribeiro RCF 2000. Avaliação do parasitismo de diversos isolados fúngicos em *Heterodera glycines* e *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira*, 24(2):167-172.
- Myco Bank 2018. ([www.mycobank.com](http://www.mycobank.com)). Acesso em 23 de mar. de 2018.
- Pallu APS 2010. *Potencial biotecnológico de fungos do gênero Penicillium e interação com cana de açúcar*. Piracicaba, Brasil. (Tese Doutorado em Genética e melhoramento de plantas). 130p.
- Perrone G 2007. Biodiversity of *Aspergillus* species in some importante agricultural products. *Studies in mycology*, 59:53-66.
- Person AK, Chudgar SM, Norton BL, Tong BC, Stout JE 2010. *Aspergillus niger*: an unusual cause of invasive pulmonary aspergillosis. *Journal of Medical Microbiology*, 59:834-838
- Pitt JI 1985. *A Laboratory guide to common Penicillium species*. Commonwealth scientific and industrial research organization division of food research. Australia. 182p.
- Rheea YJ, Hillierbc S, Gaddad GM 2016. A new lead hydroxycarbonate produced during transformation of lead metal by the soil fungus *Paecilomyces javanicus*. *Geomicrobiology Journal*, 33:3-4.
- Rosa DR, Herrera CJL 2009. Evaluation of *Trichoderma* sp. as biocontrol agents against avocado root rot. *Biological Control*, 51:66-71.
- Rousseau, M 1984. Study of the surface flora of traditional Camembert cheese by scanning electron microscopy. *Milchwissenschaft*, 39:129-134.
- Samson RA 1974. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. *Studies in Mycology*, 6:1-119.
- Silva PRQ 2000. *Transformação de Trichoderma harzianum com os genes da proteína fluorescente verde e de resistência ao fungicida benomil*. Brasília, Brasil. (Tese de doutorado, Universidade de Brasília) 130p.
- Silva RR, Lins GD 2008. *Fungos e Aplicabilidades biotecnológicas*. Programa de posgraduação em Biodiversidade Vegetal do IBT, São Paulo. 20pp.
- Terrasan CRF 2007. Produção e caracterização do complexo Xilanolítico de *Penicillium janczewskii*. Rio Claro, Brasil. (Dissertação Mestrado em Microbiologia Aplicada UNESP). 83pp.
- Varga J 2004. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. *Eupean jornal of Plant Pathology*, 110: 627-640.
- Viterbo A, Horwitz BA 2010. *Mycoparasitism*. In: Borkovich K, Ebbole D (ed.) *Cellular and molecular biology of filamentous fungi*. ASM Press, Washington, DC.

## Potencial antimicrobiano de *Bacillus* spp., contra cepas de importância médica

Veranilse Alves Muniz<sup>1</sup>, Ricardo de Melo Katak<sup>2</sup>, Juan Campos Oliveira<sup>1</sup>, Elerson Matos Rocha<sup>2</sup>, Deidre Machado Serrão<sup>1</sup>, Laura Viana Correa<sup>1</sup>, Wanderli Pedro Tadei<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Mestre em Biotecnologia, Universidade do Estado do Amazonas

<sup>2</sup> Doutorado em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas

<sup>3</sup> Pesquisador, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Emails: veralves2@gmail.com; ricardokatak@hotmail.com; juan\_16\_oliveira@hotmail.com;

elerson.matos@hotmail.com, deidre.machado@hotmail.com; laura\_v.c@hotmail.com; wptadei@gmail.com.

### Resumo

O desenvolvimento de antibióticos oriundos de microrganismos revolucionou o tratamento médico, ocasionando a redução da mortalidade causada por doenças microbianas. Estes medicamentos estão disponíveis para o tratamento de infecções causadas por bactérias, como por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. No entanto, a resistência de bactérias patogênicas aos antibióticos disponíveis dificulta o tratamento de infecções. Assim, bactérias do gênero *Bacillus* mostram ter atividade antimicrobiana contra microrganismos patogênicos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo selecionar bacilos provenientes de ambientes Amazônicos com potencial antimicrobiano frente a cepas patogênicas. Primeiramente, as linhagens bacterianas foram reativadas e submetidas ao teste antimicrobiano pelo método de estrias pareadas, frente às cepas patogênicas *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. Posteriormente foi feita a caracterização morfológica destas bactérias pelo método de Gram e identificação molecular. Os resultados mostram que das 38 linhagens bacterianas, quatro bacilos apresentaram atividade antagônica. Quanto à identificação morfológica e molecular, os resultados mostraram que a maioria das bactérias são bacilos Gram positivo, onde quinze linhagens são pertencentes ao gênero *Bacillus*, e duas são *Serratia* e *Achromobacter*. Conclui-se, desta maneira, que bacilos Amazônicos podem ser úteis na obtenção de antimicrobianos de importância biotecnológica e médica.

**Palavras-chave:** Bacilos, Antibióticos, Cepas patogênicas.

### Introdução

A descoberta dos antibióticos tornou-se muito importante no combate a diversas infecções causadas por microrganismos patogênicos, reduzindo deste modo os casos de morbidade e mortalidade mundial. Estes agentes antimicrobianos têm sua importância na medicina clínica desde a segunda metade do século XX, e, desde então, auxiliam no tratamento de milhares de pessoas com infecção bacteriana. No entanto, houve o surgimento da resistência antimicrobiana por bactérias patogênicas no mundo todo e, a consequente limitação dessa terapia (Chang *et al.*, 2013; Paim e Lorenzini, 2014).

A resistência de bactérias patogênicas a certos antibióticos convencionais leva a redução da eficácia da maioria dos antimicrobianos, limitando o uso destes fármacos no combate a infecções causadas por estes patógenos. Desse modo, o combate destas bactérias resistentes torna-se um problema de saúde pública, desencadeando graves danos à saúde humana (Sumi *et al.*, 2015).

A produção de antibióticos é considerada um passo importante para aumentar a competitividade do organismo produtor em um ambiente com recursos limitados (Grossman *et al.*, 1995). Com isso as bactérias do gênero *Bacillus* em condições desfavoráveis de nutrientes secretam uma variedade de compostos com propriedades antimicrobianas como, por exemplo, polimixinas, surfactinas, bacteriocinas, subtilina, sutilosina peptídeos sintetizados ribossomicamente (Stein, 2005; Wu *et al.*, 2006; Handa e Jain, 2017). Além disso, são linhagens bacterianas de fácil manipulação e crescimento com diversas fontes nutricionais de baixo custo. Considerando o potencial metabólico destas linhagens bacterianas tornam-se necessários estudos e avaliação do potencial antimicrobiano destas linhagens. Portanto, este trabalho teve

por objetivo selecionar bacilos com potencial antimicrobiano frente às cepas patogênicas *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

## Material e Métodos

Foram reativadas 38 linhagens pertencentes à coleção do laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue – INPA, nos meios NA, LB e ISP2, incubadas em B.O.D a 30°C, por 24h, 48h até atingir o nível 2 da escala de Marcfarland (3.108 n° de células). Em seguida foram purificadas pela técnica de esgotamento por estrias cruzadas e submetidas à coloração de Gram (Martinez e Tadei, 2008).

A extração de DNA genômico foi realizada com o produto InstaGene™ – Matrix da BIO-RAD. A quantidade de DNA foi ajustada em 10 ng/μL para a PCR. As reações de amplificação do gene 16S consistiram em um volume final de 25 μL (1,5 μL MgCl<sub>2</sub>; 2,5 μL Tampão 10X; 0,5 μL dNTP; 0,125 μL Taq polimerase; 18,375 μL H<sub>2</sub>O milli-Q; 1 μL DNA e 0,5 μL de cada Primer 8f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') e 1401R (5'- CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG -3') e realizadas em termociclador Thermal Cycler®. O perfil térmico da PCR consistiu de um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 3 min, seguido por 35 ciclos: desnaturação a 94°C por 25 seg, pareamento a 62°C por 25 seg e extensão a 72°C por 1 min e 25 seg. Ao final, um ciclo de extensão a 72°C por 5 min. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose (0,8%, p/v) e corados com solução de brometo de etídio (0,005%, p/v), e as imagens registradas em fotodocumentador. Estes, foram purificados por meio do kit QIAquick™ PCR Purification (QIAGEN) e 200ng do DNA foi usado nas reações de sequenciamento, com o kit BidDye Terminator V 3.1. e 0,5μM do mesmo oligonucleotídeo utilizado para a reação de PCR. As reações foram precipitadas com etanol e inseridas no equipamento ABI 3500 XL para a determinação das sequências, que foram analisadas com o programa CAP3 e comparadas com as sequências bacterianas depositadas na base de dados do NCBI.

As cepas patogênicas *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, foram cedidas do acervo do Laboratório de Tecnologia do DNA da Universidade Federal do Amazonas. Foram reativadas pela técnica de esgotamento por estrias cruzadas em meio de cultivo Sabouraud dextrose Agar e incubadas em estufa por 24h e 48h a 35°C.

Na avaliação da atividade antimicrobiana frente às cepas *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, utilizou-se uma colônia de cada microrganismo reativado, para a realização do teste de estrias pareadas. Neste teste, repicou-se cada microrganismo a ser testado nos respectivos meios de reativação de modo diametral na placa de Petri. Em seguida, foram incubadas em estufa por 48h a 30°C. Posteriormente, o patógeno foi repicado de modo horizontal e incubado por mais 24h a 30°C. Os testes foram realizados em triplicata e as análises feitas por meio da observação da zona de inibição, durante 24h e 48h (Christensen, 1996).

## Resultados e Discussão

Os resultados da análise morfológica mostraram que das 38 linhagens 99, 9% são bacilos são Gram positivos e 0,1% Gram negativos.

A análise molecular pela sequência do gene 16S do rDNA demonstrou que as linhagens bacterianas obtidas no presente estudo pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Achromobacter* e *Serratia* quando comparadas a sequências depositadas no GenBank, onde as linhagens J1NA e RAPANA apresentaram 100% de identidade com a espécie de *Bacillus velezensis*, 38PHA apresentou 98% de identidade com *Bacillus licheniformis* e R13 com *Bacillus subtilis strain*. As linhagens BtAM74 e 2WISP2 mostraram-se semelhante a *Bacillus pumilus*. As linhagens Btam27, LA1LB, 31ISP2, 4MENA e R10ISP2 foram denominados *Bacillus sp.*, BtAm 220, X9NA apresentou identidade com *Bacillus cereus*, K4NA e 15PHA com *Bacillus safensis*. Apesar da maioria das linhagens pertencerem ao gênero *Bacillus*, duas linhagens apresentaram identidade aos diferentes gêneros *Serratia* e *Achromobacter*, sendo identificadas como: BTAM 141 - *Serratia marcescens* e 51 Bt ISP2 - *Achromobacter xylosoxidans* (Tabela 1).

A análise da sequência do gene 16S rDNA tem sido promissora para a identificação bacteriana. Este gene é universal para bactérias e uma grande quantidade de sequências está disponível em bancos de

**Tabela 1.** Relacao das linhagens Identificadas morfológicamente e molecular.

Nº	Origem	Linhagem	Morfologia	Gram	Id. Molecular	Id.
1	Água Parintins	J1 NA	Bacilos	+	<i>Bacillus velezensis</i>	98%
2	Rio Amazonas	RAPANA	Bacilos	+	<i>B. velezensis</i>	99%
3	EJC2 1.2B	38 PHA	Bacilos	+	<i>B. licheniformis</i>	98%
4	Qpf 2 3.3	R13	Bacilos	+	<i>B. subtilis strain</i>	94%
5	Coleção INPA	Btam 74	Bacilos	+	<i>B. pumilus</i>	99%
6	QPR 2.3 isp2	K5NA	Bacilos	-		
7	Solo Puraquequara	Bio 16	Bacilos	+		
8	EJC2 1.3 B	103 PHA	Bacilos	+		
9	Solo UFAM	27 NA	Bacilos	+		
10	Solo INPA	2W ISP2	Bacilos	+	<i>B. pumilus</i>	100%
11	Coleção INPA	BTAM 141	Bacilos	+	<i>Serratia marcescens</i>	99%
12	Solo Puraquequara	Bio03	Bacilos	+		
13	Coleção INPA	BtAM 27	Bacilos	+	<i>Bacillus sp</i>	99%
14	Coleção INPA	BtAM 220	Diplobacilos	+	<i>Bacillus cereus</i>	
15	Anspr1 2.2b isp2	R21	Bacilos	+		
16	Coleção INPA	BtAM 138	Bacilos	+		
17	Q,r isp2	K4NA	Bacilos	+	<i>Bacillus safensis</i>	99%
18	Dg,C.R.1.1.1ISP2	2R6	Bacilos	+		
19	Stsp c.2.2.1	R8 ISP2	Bacilos	+		
20	QPR 2.3 isp2	R14	Bacilos	-		
21	Flor1.1.3b2	61 PHA	Bacilos	+		
22	Lago Aninga	LA1 LB	Bacilos	+	<i>Bacillus sp</i>	99%
23	Coleção INPA	BtAM18	Bacilos	+		
24	EJC2 1.4B	15PHA	Bacilos	+	<i>Bacillus safensis</i>	99%
25	Solo Puraquequara	Bio 11 LB	Bacilos	+		
26	Coleção INPA	BtAM 75	Bacilos	+		
27	Solo INPA	RKA1	Bacilos	+		
28	Solo Puraquequara	Bio 05LB	Bacilos	+		
29	Solo Puraquequara	31ISP2	Bacilos	+	<i>Bacillus sp</i>	100%
30	Solo Macurany	51 Bt ISP2	Bacilos	+	<i>Achromobacter xylooxidans</i>	98%
31	Ghcc1. 2,2 a ISP2	59PHA	Bacilos	+		
32	Solo UFAM	ARISP2	Bacilos	+		
33	Anspr1 2.4b isp2	R23	Bacilos	+		
34	Solo UFAM	X9 NA	Bacilos	+	<i>Bacillus cereus</i>	98%
35	Solo UFAM	BCLBio	Bacilos	+		
36	Dgr1 2.2b aveia	R1	Bacilos	+		
37	Água Puraquequara	4 ME NA	Bacilos	+	<i>Bacillus sp.</i>	100%
38	Ansp R2.1.2	R10ISP2	Bacilos	+	<i>Bacillus sp</i>	99%

Legenda: Nº=Número de isolados; Id. Molecular=Identificação molecular; Id=Identidade

dados, permitindo assim, a comparação das sequências de isolados bacterianos desconhecidos. Assim, as características do gene 16S rDNA, sua função essencial e propriedade evolutiva têm permitido que ele se torne o marcador molecular mais comumente usado na filogenia bacteriana e também em estudos de ecologia microbiana (Case *et al.*, 2007; Souza, 2011). Neste estudo, este gene se estabeleceu como padrão para identificação de diferentes gêneros, onde os resultados mostraram percentual de identidade de 94% a 100% de similaridade das linhagens bacterianas quando comparadas a sequências depositadas no GenBank.

Os resultados do teste antagonismo mostraram que 38 linhagens de bacilos testadas em confronto direto, a maioria das linhagens bacterianas não apresentaram atividade antimicrobiana, pois todas as três cepas patogênicas cresceram. Nas análises, demonstradas na tabela 2, as linhagens K5NA, X9NA, BCLbio e

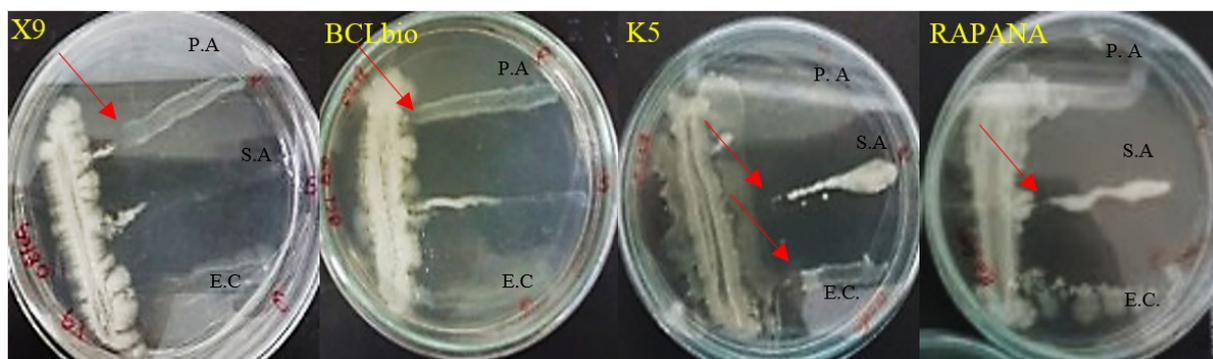
RAPANA apresentaram condições inibitórias de pelo menos dois dos três patógenos testados como pode ser visto na Figura 2, referentes aos testes de estrias pareadas realizados nos meios de cultivo NA, LB e ISP2.

Estudos com bactérias endofíticas da Amazônia realizados por Souza (2016) mostraram que o meio ISP2 foi o que possibilitou maior potencial antimicrobiano pelos microrganismos endofíticos. Entretanto, Kumar *et al.* (2009) mostrou em seu trabalho crescimento máximo e produção de antibiótico por *B. subtilis* em meio TSB. Handa e Jain (2017), avaliou os efeitos dos meios sobre a produção de agentes antimicrobianos por *Bacillus* sp., relatando em seus resultados que a dextrose foi a melhor fonte de carbono e a peptona melhor fonte de nitrogênio para produção de metabólito antimicrobiano por *Bacillus* sp. Estas informações são importantes na análise da influência de fontes nutricionais na produção de antimicrobianos. Em nosso estudo as melhores linhagens que apresentaram o potencial bacteriostático foram cultivadas no meio NA, que também apresenta peptona em sua composição, além de outras fontes como extrato de levedura e extrato de carne. Entretanto, a glicose, que geralmente é uma excelente fonte de carbono para o crescimento bacteriano, interfere na síntese de muitos metabólitos secundários (Sanchez *et al.*, 2010). Estes estudos nos leva a informação da necessidade em testar diferentes meios de cultivo para avaliar a influência na produção de metabólitos por microrganismos, considerando, a importância da disponibilidade da fonte de carbono independente da espécie a ser cultivada.

Os peptídeos antimicrobianos produzidos por microrganismos possuem atividade bactericida ou bacteriostática. Assim, antibióticos podem apresentar duas funções distintas, a inibição do crescimento bacteriano por meio da ação bacteriostática, e eliminação de uma população bacteriana, por uma ação bactericida. A ação bacteriostática impede o crescimento das bactérias patogênicas, mantendo as mesmas na fase estacionária (Pankey e Sabath, 2013). O modo de ação bactericida atua em processos vitais levando à morte celular (Goodman e Gilman's, 2008; Katzung, 2007; Lago, 2011).

Os resultados do presente estudo, mostraram que os as linhagens K5NA, X9NA, BCLbio e RAPANA, inibiram o crescimento das cepas patogênicas, sugerindo uma possível ação bacteriostática. Entretanto, não sabemos quais moléculas podem estar sendo secretadas no meio de cultura e seu efeito sobre as cepas patogênicas. Assim, mais estudos são necessários para avaliar o potencial destas linhagens bacterianas.

Estudos realizados por Souza *et al.* (2015) identificou e avaliou o potencial antagonico *in vitro* de bactérias endofíticas contra cepas patogênicas e fungos fitopatogênicos. Os resultados mostram que as bactérias utilizadas em seu estudo apresentaram atividade antimicrobiana e são pertencentes ao gênero *Bacillus*. As bactérias deste gênero apresentam um grande potencial para produção de diversos antimicrobianos. Além disso, membros do gênero *Bacillus* destacam-se por serem capazes de produzir uma variedade de metabólitos secundários com potencial ainda desconhecido. Metabólitos secundários deste membro de bactéria apresentam diversas atividades como, por exemplo, antifúngica, antibacteriana, inseticida etc., que proporcionam a sobrevivência destas espécies (Stein, 2005). Assim, é importante ressaltar que bactérias do gênero *Bacillus*, são candidatas promissoras na obtenção de novas moléculas antimicrobianas de interesse médico e biotecnológico.



**Figura 2.** Aspecto do confronto direto após 48h em placas de Petri entre bacilos e as cepas patogênicas *S. aureus* (S.A.), *P. aeruginosa* (P.A.), *E. coli* (E.C.). As setas indicam as zonas de inibição.

**Tabela 2.** Atividade antagonista de bacilos a diferentes cepas patogênicas no intervalo de 48h

Linhagem	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
J1 NA	-	-	-
RAPA NA	+	-	-
38 PHA ISP2	-	-	-
R13 ISP2	-	-	-
Btam74 LB	-	-	-
K5NA	-	+	+
Bio 16 LB	-	-	-
103 PHA ISP2	-	-	-
27 NA	-	-	-
2W ISP2	-	-	-
C. 141 ISP2	-	-	-
BIO 03 LB	-	-	-
Btam 27 LB	-	-	-
Btam 220 LB	-	-	-
R21 ISP2	-	-	-
BtAM 138LB	-	-	-
K4NA	-	-	-
2R6 ISP2	-	-	-
R8 NA	-	-	-
R14 ISP2	-	-	-
61 PHA ISP2	-	-	-
LA1 LB	-	-	-
BtAM18 NA	-	-	-
15PHA ISP2	-	-	-
Bio 011 LB	-	-	-
BtAM 75 LB	-	-	-
RKA1 LB	-	-	-
BIO 05LB	-	-	-
31ISP2	-	-	-
51 Bt ISP2	-	-	-
59PHA LB	-	-	-
AR ISP2	-	-	-
R23 NA	-	-	-
X9 NA	-	+	-
BCLbio LB	+	-	-
R1ISP2	-	-	-
4 ME NA	-	-	-
R10 ISP2	-	-	-

Com efeito inibitório (+), sem efeito inibitório (-)

## Conclusões

Trinta e seis linhagens bacterianas isoladas de diferentes ambientes Amazônicos foram caracterizadas como bacilos Gram positivo e apenas duas como bacilos Gram negativo, das quais 17 linhagens foram identificadas pertencentes a três gêneros distintos *Bacillus*, *Acromobacter* e *Serratia*.

Quatro linhagens X9NA, K5NA, BCLbio e RAPANA apresentaram atividade antimicrobiana, sendo que somente a linhagem K5NA apresentou atividade antimicrobiana para duas cepas patogênicas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*).

## Referências

- Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmstrom C, Doolittle WF, Kjelleberg S 2007. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied Environmental Microbiology*, 73(1):278–288.
- Chang RL, Cho IH, Jeong BC, Lee SH 2013. Strategies to minimize antibiotic resistance. *International Journal of Environmental Research Public Health*, 10(9):4274–305.
- Chistensen MJ 1996. Antifungal activity in grasses infected with *Acremonium* and *Epichloe* e endophytes. *Australasian Plant Phythology*, 25:186–191.
- Goodman Gilman's 2008. *Manual of Pharmacology and Therapeutics*. Nova Iorque: McGraw Hill.
- Grossman ME, Papper AS, Garzon MC, Silvers DN 1995. Invasive *Trichophyton rubrum* infection in the immunocompromised host: report of three case. *Journal of the American Academy Dermatology*, 33:315–318.
- Handa J, Jain P 2017. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. jg: isolation, identification and process optimization for the production of antimicrobial metabolite against human pathogens. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6(8):1969–1988.
- Katzung B 2007. *Farmacologia Básica e Clínica* (10<sup>a</sup> ed.). Brasil: McGraw Hill.
- Kumar A, Saini P, Shrivastava JN 2009. Production of peptide antifungal antibiotic and biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. *Indian Journal Experimental Biology*, 47:57–62.
- Lago J 2011. Mecanismos de Resistência e Seleção de Antibióticos. *Lisboa: Jornadas bio Mérieux*.
- Martinez MB, Taddei CR 2001. *Métodos De Diagnóstico*. In: Trabulsi, LR; Pérez-García A, Romero D, De Vicente A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacillus* in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, 22:187–193.
- Paim R, Lorenzini E 2014. Estratégias para prevenção da resistência bacteriana. *Revista Cuidarte*. 5(2):757–64.
- Pankey G, Sabath L 2013. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram positives bacterial infections. *Oxford Journals*, 38:864–865.
- Sanchez S, Chavez A, Forero A, Garcia-Huante Y, Romero A, Sanchez M, Rocha D. Sanchez B, Avalos M, Guzman-Trampe S, Rodriguez-Sanoja R, Langley E, Ruiz B 2010. Carbon source regulation of antibiotic production. *The Journal of Antibiotics*. 63:442–459.
- Souza IF 2016. *Prospecção de substâncias com atividade antagonista a Candida albicans produzida por bactéria endofítica da região amazônica*. Manaus, Brasil (MSc Dissertação. Universidade Federal do Amazonas. UFAM). 78 f.
- Souza RD, Mendonça EAF., Soares M.A 2015. Antagonistic activity to pathogenic microorganisms by endophytic bacteria isolated from *Echinodorus scaber* Rataj. *Summa Phytopathologica*, 41(3):229–232.
- Souza MO 2011. *Caracterização fenotípica e molecular de Bacillus sp. e gêneros relacionados provenientes de análises de produtos farmacêuticos*. Rio de Janeiro, Brasil (MSc Dissertação. Fundação Oswaldo Cruz –: INCQS/FIOCRUZ). 161 f.
- Stein T 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56:845–857.
- Sumi C D, Yang BW, In-Cheo Y, Hahm YT 2015. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(2):93–103.
- Wu S, Zhong J, Huan L 2006. Genetics of subpeptin JM4-A and subpeptin JM4-B production by *Bacillus subtilis* JM4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344:1147–1154.

## Detecção molecular do locus gênico *chi* em linhagens de bacilos amazônicos

Juan Campos de Oliveira<sup>1</sup>, Ricardo de Melo Katak<sup>2</sup>, Elerson Matos Rocha<sup>2</sup>,  
Veranilse Alves Muniz<sup>1</sup>, Deidre Machado Serrão<sup>1</sup>, Laura Viana Correa<sup>1</sup>,  
Jairo da Silva Rocha Filho<sup>3</sup>, Wanderli Pedro Tadei<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Mestre em Biotecnologia, Universidade do Estado do Amazonas

<sup>2</sup>Doutorando em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas

<sup>3</sup>Graduado em Química, Universidade do Estado do Amazonas

<sup>4</sup>Pesquisador, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Emails: juan\_16\_oliveira@hotmail.com, ricardokatak@hotmail.com, elerson.matos@hotmail.com, veralves2@gmail.com, deidre.machado@hotmail.com, laura\_v.c@hotmail.com, jairorocha61@gmail.com, wptadei@gmail.com

### Resumo

Quitinases (EC 3.2.1.14) são enzimas hidrolíticas sintetizadas por uma diversidade de seres vivos eucariotos e procariotos, para utilização em diversas funções como na morfogênese, ciclagem de nutrientes e defesa. Estas enzimas apresentam capacidade de hidrólise das ligações  $\beta$ -1,4 entre as unidades de *N*-acetilglicosaminas do polímero quitina. Considerando a variabilidade de bacilos, membros deste grupo apresentam a capacidade de síntese de diversos metabólitos com amplas aplicações biotecnológicas, como por exemplo, as quitinases. Foram reativadas 38 linhagens oriundas de solo, água, planta e inseto, identificadas por características fenotípicas e moleculares, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores da amplificação do gene 16S rDNA. Na detecção do gene *chi*, o DNA genômico das linhagens foi submetido à amplificação por PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos. De acordo com as características morfológicas, as linhagens foram caracterizadas como bacilos, tipo Gram positivo e negativo. A amplificação e o sequenciamento do gene 16S rDNA de 38 linhagens, identificou quatro gêneros bacterianos: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Serratia* e *Achromobacter*. Considerando os resultados de amplificação do gene *chi* nas linhagens R11 - *Bacillus amyloliquefaciens*, 103 PHA - *B. paramycooides*; BTAM138- *B. pumilus*; BTAM18- *B. wiedmannii*, K2NA - *B. proteolitycus* e BTAM 27- *Bacillus* sp., com tamanho de aproximadamente 2027 pb, torna-se evidente que estas linhagens apresentam em seus genomas, a sequência gênica codante responsável pela via metabólica para a síntese de quitinase. Dessa forma, as linhagens que amplificaram amplicons do gene *chi* apresentam potencial quitinolítico.

**Palavras-chave:** bioprospecção, microbiota amazônica, enzimas hidrolíticas.

### Introdução

A Amazônia Brasileira é uma região rica em biodiversidade com diferentes ecossistemas e potencial inexplorado. Neste ambiente amazônico, existe uma diversidade microbiana com potencial para síntese de diversos metabólitos com funções diversificadas como, por exemplo, reserva de energia, sinalização e catálise. Neste contexto, encontram-se as enzimas da família glicosilhidrolases que hidrolisam ou modificam ligações glicosídicas entre dois ou mais carboidratos ou entre carboidratos e outras biomoléculas (Lombard *et al.*, 2014). Dentre as enzimas hidrolíticas, destacam-se as quitinase (EC 3.2.1.14), expressas pelo locus gênico *chi* (Djenane *et al.*, 2017).

As quitinase são sintetizadas por uma diversidade de organismos eucariotos e procariotos (Boyce *et al.*, 2013; Islam e Datta, 2015). Apresentam tamanhos variados de 20 kDa a 90 kDa, com capacidade de hidrólise entre ligações  $\beta$ -1,4 das unidades de *N*-acetilglicosaminas (GlcNAc) do polímero quitina. Estas foram detectadas em organismos que contêm quitina no exoesqueleto ou na parede celular como, por exemplo, insetos, crustáceos, fungos e também em organismos não quitinolíticos, como bactérias, plantas superiores e vertebrados (Usharani e Gowda, 2011; Boyce *et al.*, 2013).

São classificadas em duas classes principais: endoquitinases, que clivam as ligações  $\beta$ -1,4 da quitina em sítios aleatórios, liberando quito-oligossacarídeos como a quitotetraose, quitotriose; e as exoquitinases, que se dividem em duas subcategorias: quitobiosidases que atuam liberando unidades de di-acetilquitobiose da extremidade não redutora da quitina, e as 1,4- $\beta$ -N-acetilglicosaminidases, que clivam oligômeros sintetizados pelas endoquitinases e quitobiosidases, liberando monômeros *N-Acetilglicosamina* (Sahaikh e Manocha 1993; Duo Chuan, 2006). Também foram descritas as endo-exoquitinases, que apresentam as duas atividades.

Bactérias do gênero *Bacillus* são candidatas para a produção de quitinase e suas utilidades nas diversas aplicações biotecnológicas. Estas enzimas quitinolíticas apresentam relevante potencial para diversas aplicações, em diferentes áreas como, por exemplo; medicina, agricultura, indústria farmacêutica (Ramirez *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2014). Considerando o potencial metabólico dos *Bacillus*, membros deste gênero apresentam potencial para a síntese de diversos metabólitos secundários com aplicações biotecnológicas em diversos setores, como na indústria farmacêutica, alimentícia e bioinseticidas, como por exemplo, as proteínas inseticidas (CRY, VIP, CYT) e outros fatores de virulência e patogenicidade (Bravo *et al.*, 2007; Elleuch *et al.*, 2015).

Dessa forma, o desenvolvimento de pesquisas desta natureza é importante para detectar compostos bioativos oriundos do metabolismo secundário microbiano, tais como, biopesticidas, fungicidas e as enzimas hidrolíticas. Neste sentido, é imprescindível a obtenção de conhecimentos dos recursos genéticos da microbiota amazônica por meio das técnicas de biologia molecular para usos biotecnológicos, como as enzimas hidrolíticas (Oliveira *et al.*, 2017).

## Material e Métodos

Foram reativadas 38 linhagens de bactérias pertencentes à coleção do Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue-INPA, nos meios NA, LB e ISP2, incubadas em B.O.D. a 30°C, por 24h, 48h até atingir o nível 2 da escala de Marcfarland ( $3 \cdot 10^8$  n° de células). Em seguida, foram purificadas pela técnica de esgotamento por estrias cruzadas e submetidas à coloração pelo método de Gram (Martinez e Tadei, 2008).

A extração do DNA genômico foi realizada por meio do kit InstaGene Matrix (Bio- Rad, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A qualidade e quantidade do DNA foram analisadas em Nanodrop™ 2000 /Espectrofotômetros (Thermo Scientific). Na detecção do gene *chi*, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores: ChiF (5'ATG AGG TCT CAA AAA TTC 3') e ChiR (5'CTA GTT TTC GCT AAT GAC 3'), (Barboza e Corona, 2003). Nas reações de amplificação foram usadas as seguintes concentrações dos reagentes: Água (q.s.p) 14,34 mL; MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 0,96 mL; Tampão (10X) 2,5mL; Primer F (10 pmoles) 1,0mL; Primer R (10 pmoles) 1,0 mL; dNTP (2,5 mM) 2 mL; Taq DNA polymerase (0,5U); DMSO 1,0 mL; DNA 2 mL com o volume final de 25mL. Foram realizadas em termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 min; seguido por 30 ciclos: desnaturação a 94°C por 1 min; anelamento a 45°C por 1 min; polimerização em 72°C a 1: 50 min; extensão final a 72°C por 10 min; *hold* 4 °C. Os fragmentos amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose a 1%, em transiluminador ultravioleta e fotografado em aparelho TCL Documentation (Vilberlourmat).

As reações de amplificação do gene 16S consistiram em um volume final de 25  $\mu$ L: (1,5 $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>; 2,5 $\mu$ L Tampão 10X; 0,5 $\mu$ L dNTP; 0,125 $\mu$ L Taq polimerase; 18,375 $\mu$ L H<sub>2</sub>O milli-Q; 1 $\mu$ L DNA e 0,5 $\mu$ L de cada Primer 8f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') e 1401R (5'- CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG -3') e realizadas em termociclador Thermal Cycler®. O perfil térmico consistiu de um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 3 min, seguido por 35 ciclos: desnaturação a 94°C por 25 s; pareamento a 62°C por 25 s ; extensão a 72°C por 1 min e 25 s; extensão final, a 72°C por 5 min; *hold* 4 °C (Boichenko 2000). Os fragmentos amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose (0,8%, p/v) e corados com solução de brometo de etídio (0,005%, p/v), onde o registro das imagens foi feito em fotodocumentador (Eagle EyeII, Stratagene). Em seguida, foram purificados por meio do kit QIAquick™ PCR Purification (QIAGEN), de acordo com as recomendações do fabricante. Uma alíquota de 200ng do DNA purificado foi usada como matriz para as reações de sequenciamento, nas quais foi utilizado o kit BidDye Terminator V3.1. (Life Technologies) e 0,5 $\mu$ M do mesmo oligonucleotídeo utilizado para a reação de PCR.

As reações de sequenciamento foram precipitadas com etanol, inseridas no equipamento ABI 3500 XL (Applied Biosystems) para a determinação das sequências, que foram analisadas com o programa CAP3 e comparadas com sequências bacterianas depositadas na base de dados do NCBI.

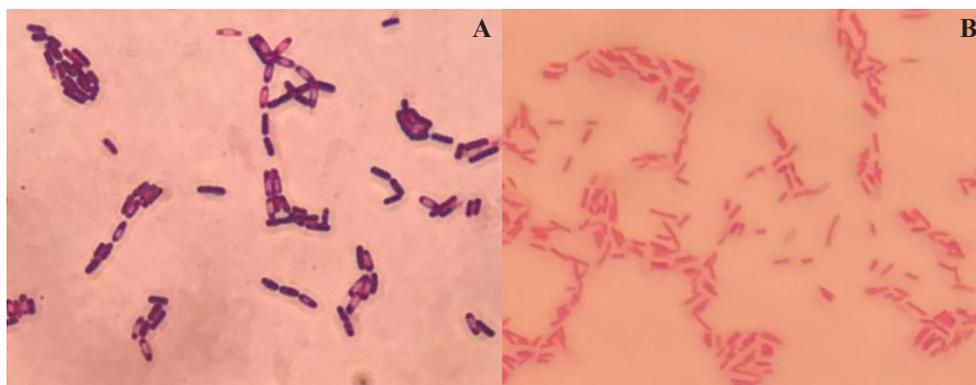
### Resultados e Discussão

Por meio da caracterização morfo-tintorial e visualização em microscopia óptica, foi possível classificar os isolados como sendo (92%) bacilos gram positivos e (8%) bacilos gram negativos (Figura 1). Observações semelhantes foram feitas por Goto *et al.*, (2000), os quais enfatizam que o grupo dos bacilos compreende bactérias cilíndricas em formas de bastonetes, isoladas ou em pares (diplobacilos) ou em cadeias (streptobacillos) com parede celular gram negativa gram ou gram positiva.

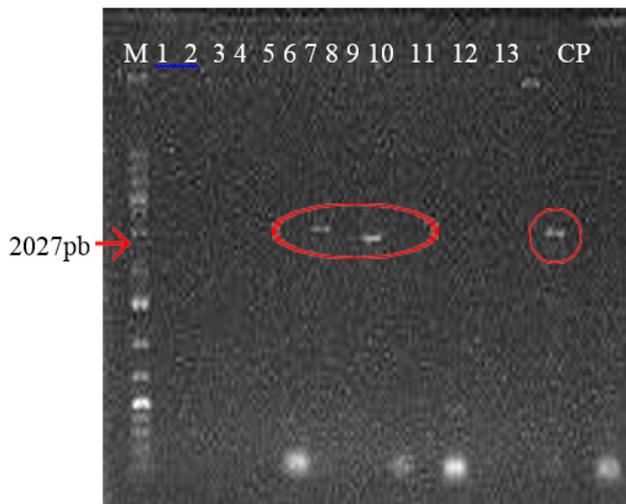
Quanto à detecção do gene *chi*, dentre os 38 isolados 6 (15,7%) linhagens R11 - *Bacillus amyloliquefaciens.*, 103 PHA-B. *paramycooides*; BTAM138- *B. pumilus*; BTAM18- *B. wiedmannii.*, K2NA-B. *proteolitycus* e BTAM 27-*Bacillus sp.* todos bacilos gram positivos, apresentaram amplificação de fragmentos de DNA de aproximadamente 2027 pb, os quais estão discriminados abaixo (Figuras 2,3,4,5), usando eletroforese em gel de agarose 1%.

Considerando a importância do produto expresso pelo gene *chi* (quitinase), estas enzimas despertam interesses industriais devido à capacidade de hidrólise de polímeros insolúveis (Mandigan *et al.*, 2012; Chaiarn, 2013). Dessa forma quitinase bacterianas possuem uma diversidade de aplicações, como por exemplo, na degradação eficiente de resíduos quitinosos, e principalmente no combate de fitopatógenos ou insetos pragas (Suryanto *et al.*, 2011). Nesta premissa, Boera *et al.*, (1998) relataram *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *Streptomyces* produtores de quitinase com ação inibitória no crescimento dos fungos *Fusarium culmorum*, *Mucor hiemalis* e *Phoma exigua*. Enquanto Yan *et al.*, (2011) abordaram uma quitinase sintetizada por *Bacillus subtilis* SL-13 que causou a mortalidade de células de uma colônia do fungo *Rhizoctonia solani*. Em relação ao biocontrole de insetos, Mubbarik *et al.*, (2010) isolaram uma bactéria com parede celular gram positiva, cuja atividade quitinolítica apresentou capacidade de degradação da quitina do exoesqueleto do piolho-do-algodão, *Aphis gossypii*. Chandrasekaran *et al.*, (2012), estudaram uma quitinase de *Bacillus subtilis*, que mostrou capacidade de causar a mortalidade em diferentes estádios de desenvolvimento das larvas de *Spodoptera litura*. Há também um considerável interesse no potencial biotecnológico nos produtos da ação enzimática sobre a quitina, dentre estes, destacam-se os quitooligossacarídeos (Hamid *et al.*, 2013; Kidibule *et al.*, 2018).

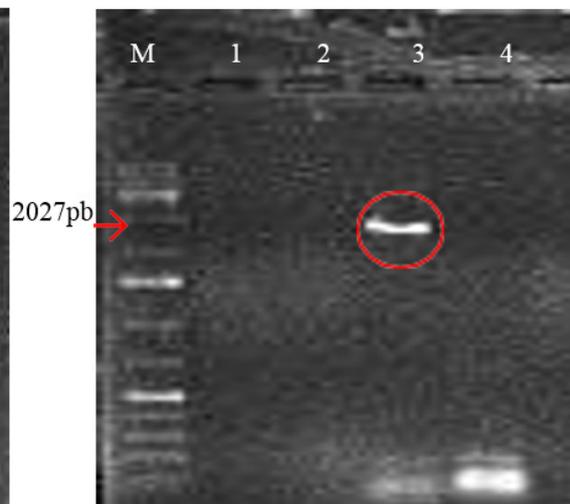
Em relação à identificação molecular por meio da amplificação e sequenciamento do gene 16S rDNA, foi possível identificar as 38 linhagens bacterianas, as quais são representantes de quatro gêneros: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Serratia* e *Achromobacter*. O parâmetro de decisão para proceder com a identificação molecular derivou do alinhamento comparativo entre sequências de DNA de espécies no BLAST assumindo-se o percentual de confiança para identidade (ID) (Tabela 1).



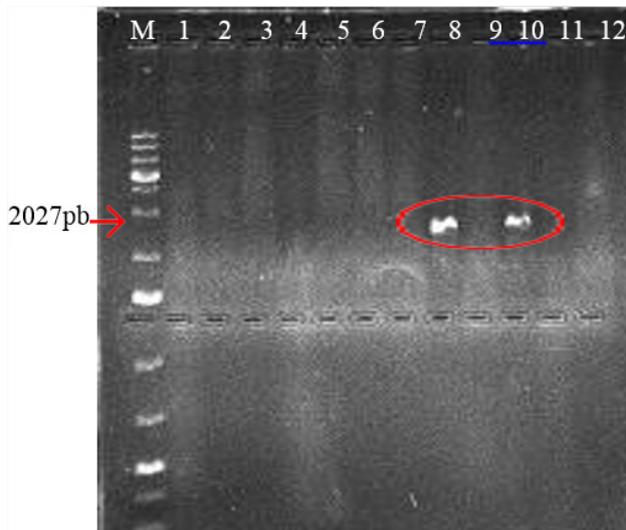
**Figura 1.** Visualização de dois isolados bacterianos em microscopia óptica, (A) bacilos Gram positivo, (B) bacilos Gram negativo. Aumento de 40X.



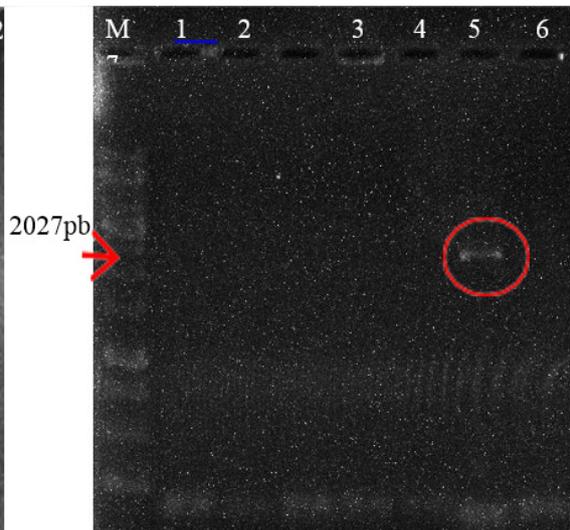
**Figura 2.** (M) Marcador 1 kb; (1)Bio03; (2) Bio16; (3)2WISP2; (4) RAPANA; (5)BTAM141; (6) BTAM27; (7)BTAM220; (8)103PHA; (9)38PHA; (10)BAM138; (11)R8; (12)R13; (13)K4; (CP)



**Figura 3.** (M) Marcador 1 kb; (1)R19; (2) GD02. 6; (3)R11; (4)BCLBIO.



**Figura 4.** (M) Marcador 1 kb; (1)15PHA; (2)RKA1; (3)31ISP2; (4)51BT; (5)59PHA; (6)ARISP2; (7)R10; (8)BTAM18; (9)C39; (10)K2NA; (11)R8; (12)R22.



**Figura 5.** (M) Marcador 1 kb; (1)Bio03; (2)Bio16; (3)2WISP2; (4)RAPANA; (5) BTAM141; (6)BTAM27; (7)BTAM220.

A obtenção de conhecimentos sobre os microrganismos por meio da análise do sequenciamento do gene 16S rDNA é de extrema importância, visto que estes genes apresentam áreas variáveis e conservadas de uma bactéria para outra, assim as espécies podem ser identificadas e classificadas em diferentes grupos filogenéticos, o que possibilita o estudo de suas aplicações (Garcia-Martinez *et al.*, 1999; Boakye *et al.*, 2016). O uso de técnicas moleculares no estudo da sistemática de *Bacillus* e gêneros correlatos, é essencial para uma melhor classificação dos membros Logan *et al.*, (2007). Dessa forma, foi possível identificar as linhagens R11 - *Bacillus amyloliquefaciens*, 103 PHA - *B. paramycoides*; BTAM138- *B. pumilus*; BTAM18- *B. wiedmannii*., K2NA - *B. proteolitycus* e BTAM 27- *Bacillus sp.* todas bacilos gram positivos e com a presença de amplicons do gene *chi* . De acordo com as atividades prospectivas de Kamil *et al.*, (2007) e Mubarik *et al.*,(2010), bactérias quitinolíticas em formato de bacilos foram predominantes, os quais isolaram respectivamente, 5 e 25 bacilos quitinolíticos.

**Tabela 1.** Relacao das linhagens Identificadas morfológicamente e molecular.

Nº	Linhagem.	Id. Molecular	Id.	Nº	Lin.	Id. Molecular	Id.
01	BTAM49LB	<i>B. thuringiensis</i>	97%	20	C25ENA	<i>S. marcescens</i>	100%
02	2WISP2	<i>B. pumilus</i>	100%	21	C38NA	<i>S. marcescens</i>	94%
03	RAPANA	<i>B. velezensis</i>	99%	22	R11ISP2	<i>B. amyloliquefaciens</i>	98%
04	BTAM141LB	<i>S. marcescens</i>	99%	24	82PHAISP2	<i>B. tequelensis</i>	98%
05	BTAM 27LB	<i>Bacillus</i> sp.	99%	25	25MENA	<i>Bacillus</i> sp.	100%
06	BTAM220LB	<i>B. cereus</i>	98%	26	C22ME	<i>B. wiedmannii</i>	100%
07	4MENA	<i>Bacillus</i> sp.	100%	27	54ISP2	<i>Bacillus</i> sp.	96%
08	38PHAISP2	<i>B. licheniformis</i>	98%	28	26 MENA	<i>B. aerius</i>	99%
09	R13ISP2	<i>B. subtilis</i> strain	94%	29	52 MENA	<i>P. barcinonensis</i>	99%
10	K4NA	<i>B. safensis</i>	99%	30	C24ENA	<i>Bacillus</i> sp.	99%
11	BTAM74LB	<i>B. pumilus</i>	99%	31	31 MENA	<i>Bacillus</i> sp.	99%
12	J1NA	<i>B. velezensis</i>	98%	32	C26ENA	<i>S. marcescens</i>	95%
13	LA1LB	<i>Bacillus</i> sp.	99%	33	C39ENA	<i>B. stratosphericus</i>	99%
14	15PHAISP2	<i>B. safensis</i>	99%	34	BD2NA	<i>B.wiedmannii</i>	99%
15	31ISP2	<i>Bacillus</i> sp.	100%	35	X9NA	<i>B.cereus</i>	98%
16	51BTISP2	<i>A. xylofidans</i>	98%	36	2MENA	<i>Bacillus</i> sp.	99%
17	R10ISP2	<i>Bacillus</i> sp.	99%	37	103PHA	<i>B. paramycoides</i>	98%
18	BTAM138	<i>B. pumilus</i>	99%	38	BTAM18	<i>B. wiedmannii</i>	100%
19	K2NA	<i>B. proteolitycus</i>	100%	39	-	-	-

Nº= Números de isolados; Lin= linhagens; Id. Molecular= Identificação molecular; Id=Identidade.

## Conclusões

Trinta e oito linhagens bacterianas da Amazônia foram caracterizadas como bacilos Gram positivos e Gram negativos.

Estas linhagens foram identificadas, as quais são pertencentes a quatro gêneros distintos: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Achromobacter* e *Serratia*.

Seis linhagens R11 - *Bacillus amyloliquefaciens*, 103 PHA - *B. paramycoides*; BTAM138- *B. pumilus*; BTAM18- *B. wiedmannii*., K2NA - *B. proteolitycus* e BTAM 27- *Bacillus* sp apresentaram amplificação do gene *chi*.

Portanto, o presente estudo, com as linhagens oriundas de diferentes ambientes amazônicos, adiciona informações importantes aos conhecimentos já existentes sobre bactérias quitinolíticas, contribuindo para o entendimento da biodiversidade microbiana.

## Referências

- Barboza-Corona JE, Nieto-Mazzocco E, Velazquez-Robledo R, Salcedo-Arnandez R, Bautista M, Jimenez B, Ibarra JE 2003. Cloning, sequencing, and expression of the chitinase gene *chiA74* from *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol.* V.69, p.1023-1029.
- Boakye EY, Lawson IYD, Danso SKA, Offei SK 2016. Characterization and diversity of rhizobia nodulating selected tree legumes in Ghana. *Symbiosis*, v. 69, pp 89-99.
- Boera WD, Paulien JA, Klein GP, Lafebera JD, Janseb BE, Spith JWW 1998. Anti- fungal properties of chitinolytic dune soil bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, Grã- bretanha, v. 30, n. 2, p.193-203.
- Boichenko VA, Klimov VV, Miyashita H, Miyachi S 2000. Functional characteristics of chlorophyll d-predominant photosynthetic apparatus in intact cells of *Acaryochloris marina*. *Photosynth. Res.* 65: 269-277.
- Boyce R, Lenhart A, Kroeger A, Velayudhan R, Robertos B, Horstick O 2013. *Bacillus thuringiensis israelenses* (Bti) for the control of dengue vectors: systematic literature review. *Tropical Medicine and International Health.* V. 18 n. 5 p.564-577.
- Bravo A, Gill SS, Sobéron M 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry e Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49, 423-435.

- Chaihar M, Lumyong S, Hasan N, Plikomol A 2013. Solid state cultivation of *Bacillus thuringiensis* R 176 with shrimp shell sandrice straw as a substrate for chitinase production. *Ann Microbiol.* V.63, p. 443-450.
- Djenane Z, Nateche F, Amziane M, Gomis-Cebolla J, El- Aichar F, Khorf H, Ferré J. 2017. Assessment of the antimicrobial activity and the entomocidal potential of *Bacillus thuringiensis* isolates from Algeria. *Toxins* 9, 139–158.
- Duo-Chuan L 2006. Review of fungal chitinases. *Mycopathologia.* 161:345-360.
- Elleuch J, Tounsi S, Hassen NBB, Lacoix MN, Chandre F, Jaoua S, Zghal RZ 2015. Characterization of novel *Bacillus thuringiensis* isolates against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephridae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 124: 90–97.
- Garcia-Martinez J, Acinas SG, Anton AI 1999. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *Journal of Microbiological Methods*, v.36, n1, p. 55-64, 1999.
- Goto K, Omura T, Hara Y, Sadaie Y 2000. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. *The Journal of General and Applied Microbiology.* v. 46, p. 1-8.
- Hamid R, Khan MA, Ahmad M, Ahmad MM, Abdin, MZ, Musarrat J, Javed S 2013. Chitinases: An update. *J Pharm Bioallied Sci*, v. 5, p. 21–29.
- Han Y, Lim HK, Lee JM, Jang YG 2014. Architecture of the *Saccharomyces cerevisiae* SAGA transcription coactivator complex. *EMBO J* 33 (21): 2534-46.
- Islam R, Datta B 2015. Diversity of chitinases and their industrial potential. *Int. J. Appl. Res.* 1, 55–60.
- Kamil Z, Saleh M, Moustafa S 2007. Isolation and identification of Rhizosphere Soil Chitinolytic Bacteria and their Potential in Antifungal Biocontrol. *Global Journal of Molecular Sciences*, (s.1.), v.2, n.2, p.57-66.
- Kidibule PE, Paloma SM, Elena Jimenez-Ortega, Mercedes Ramirez E, Miquel MC, Francisco JP, Sanz JÁ, Fernandez-Lobato M 2018. Use of chitin and chitosan to produce new chito oligosaccharides by chitinase Chit42: enzymatic activity and structural basis of protein specificity. *Microb Cell Fact.*
- Logan NA, Popovic T, Hoffmaster A 2007. *Bacillus* and other aerobic endospore forming bacteria. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington D.C: ASM Press. pp. 455- 473.
- Lombard V, Golaconda RH, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B 2014. *The Carbohydrate- active enzymes data base (CAZy)* in 2013. *Nucleic Acids Res* 42: D490–D495. doi:10.1093/nar/gkt1178.
- Mandigan M T, Martinko JM, Parker J 2012. (Eds.). *Microbiologia de Brock*. 12ª Edição. Porto Alegre: Editora Artmed.
- Martinez MB, Taddei CR 2008. Métodos de Diagnóstico. In: Trabulsi L R, Nawani N N, Kapadnis B P. Chitin degrading potential of bacteria from extreme and moderate environment. *Indian J. Exp. Biol.* V.41(3), p. 248-54.
- Mubarik NR, Mahagiani I, Anindyaputri A, Santoso S, Rusmana I 2010. Chitinolytic bacteria isolated from chili rhizosphere: chitinase characterization and its application as biocontrol for whitefly (*Bemisia tabaci* Genn.). *Am J Agr Biol Sci* 5:430-5
- Oliveira SM, Silva DF, Santos I N, Corrêa CV, Liberal T C F, Branco FL C, Colares C NJ, Escher, SKS, Ishida JK, Mui TS, Araújo JM, Amorim E L C 2017. Prospecção de enzimas de interesse industrial produzidas por actinobactéria isolado de solo na Amazônia. *Scientia Plena* 13, 031001.
- Ramírez LM, Ramírez SM 2012. Biological Control of Mosquito Larvae by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. *Insecticides – Pest Engineering*. Dr. Farzana Perveen (Ed.), ISBN: 978-953-307-895-3.
- Rebière C 2015. Identificação molecular e fenotípica de bactérias de solo rizosférico com tolerância ao fungicida Mancozeb, em Manaus, Estado do Amazonas, Brasil. *Ver Pan-Amaz Saude*; 6(2): 37-43.
- Sahaikh SA, Deshpande MV 1993. Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 9, p. 468-475.
- Suryanto D, Irawati N, Munir E 2011. Isolation and Characterization of Chitinolytic Bacteria and Their Potential to Inhibit Plant Pathogenic Fungi. *Microbiol Indones*, v. 5, n. 3, p. 144- 148.
- Usharani TR, Gowda TKS 2011. Cloning of chitinase gene from *Bacillus thuringiensis*. *Indian Journal of Biotechnology*. V. 10, p. 264-269.
- Vaidya RJ, Shah IM, Vyas PR, Chhatpar HS 2001. Production of chitinase and its optimization from a novel isolate *Alcaligenes xylosoxydans*: potential in antifungal biocontrol. *World J. Microbiol. Biotechnol.* V.17, p.691-696.
- Yan L, Jing T, Yujun Y, Bin Li, Hui LI, Chun LI 2011. Biocontrol Efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and characterization of an Antifungal Chitinase. *Biotechnology and Bioengineering: Chinese Journal of Chemical Engineering*, [s.l.], v. 19, n. 1, p.128-13.

# Avaliação da influência da preservação por liofilização na viabilidade das propriedades macro morfológicas de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*

Leonardo Calheiros de Oliveira, Juliana Gomes de Souza Oliveira,  
João Vicente Braga de Souza

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA | Av. André Araújo, 2936 - Petrópolis, Manaus - AM, 69067-375  
Emails:leocalheiros7@gmail.com, jugs\_bio@hotmail.com, joaovicentebragasouza@yahoo.com.br

## Resumo

A manutenção dos microrganismos por longos períodos é importante para o ensino, para a pesquisa e para a indústria. Nesse sentido, técnicas de preservação têm sido desenvolvidas, avaliadas e utilizadas. O processo de liofilização é considerado um dos mais adequados para a preservação da viabilidade dos microrganismos. E fundamenta-se na remoção de água intracelular das amostras congeladas. De uma forma geral, esta metodologia proporciona ao microrganismo viabilidade, pouca contaminação e poucas alterações genotípicas e fenotípicas. Além dessas vantagens, a liofilização não necessita de monitoramento contínuo e necessita de pouco espaço para o armazenamento. Apesar desse conhecimento, a literatura dispõe de poucos estudos investigando a influência da liofilização na viabilidade e nas características feno-genotípicas dos fungos de diferentes classes, inclusive com microrganismos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Neste trabalho foi avaliado o efeito da técnica de liofilização na viabilidade, na alteração das características macro morfológicas da colônia (forma, borda, topografia, aspecto de colônia, textura e cor) e na pureza de fungos destes gêneros. Foram submetidas ao processo de liofilização 100 amostras do gênero *Aspergillus* e 50 amostras do gênero *Penicillium*, pertencentes à Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA. As amostras foram incubadas em meio Ágar batata dextrose durante 7 dias, a 28 °C e em seguida foram submetidas à liofilização. Após o armazenamento dos liofilizados a -20 °C por um período de 90 dias, eles foram reativados para avaliação da viabilidade, das características macro morfológicas e pureza das colônias. A técnica de liofilização demonstrou-se eficiente para a preservação de espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, entretanto, para o gênero *Aspergillus*, apesar de todas as amostras apresentarem-se viáveis após o processo, observou-se em 43% alterações morfológicas e 16% estavam contaminadas. Ressalta-se, portanto, a necessidade de escolha do método de preservação de acordo com cada microrganismo, para ter êxito na conservação das características fenotípicas e genotípicas que são imprescindíveis para a manutenção de um acervo microbiano.

**Palavras-chave:** Conservação a longo prazo, fungo filamentosos, coleção de microrganismos.

## Introdução

As coleções biológicas possuem um papel fundamental para a sociedade, pois detêm valiosas informações sobre a biodiversidade (Marinone e Peixoto 2010). O Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia possui notáveis acervos distribuídos sobre a área de maior biodiversidade do planeta: a Amazônia (Uruburu 2003). O acervo das coleções microbiológicas é matéria prima para o avanço da biotecnologia, pois as diversidades genéticas dos microrganismos conferem a eles capacidade de sintetizar diversas substâncias de alto valor científico e industrial (Dellaretti 2014). O potencial de produção de substâncias importantes para o desenvolvimento, nos alerta acerca da importância de estudos que venham caracterizar as melhores condições de preservação e de síntese dos bioativos (Newman e Cragg 2016). Em vista disso, mesmo com muitos desafios que as coleções enfrentam, é imprescindível garantir a qualidade das amostras depositadas (Marinone e Peixoto 2010).

A escolha das técnicas de preservação dos microrganismos é primordial para a manutenção das culturas visando à diminuição da perda da viabilidade celular e das mudanças na integridade fisiológica

e genética (Cavalcanti 2010). Os métodos usualmente administrados na coleção microbiológica para a conservação de fungos são: repique contínuo, preservação em óleo mineral, água destilada, congelamento, liofilização e criopreservação (Sola 2011). O repique contínuo, óleo mineral, água destilada e congelamento são vantajosos devido ao seu baixo custo, porém apresentam como desvantagem o risco de contaminação, perda de viabilidade, espaço de armazenamento e possibilidade de modificações nas características fenotípicas do microrganismo.

Nesse âmbito a liofilização e a criopreservação são técnicas muito eficientes onde o metabolismo microbiano é inativado, diminuindo os riscos de modificações nas características fenotípicas do microrganismo (Uruburu 2003; Dellaretti 2014). Neste método ocorre a remoção da água intracelular das amostras através da sublimação, o que proporciona, de uma forma geral, viabilidade, baixa contaminação e poucas alterações genotípicas e fenotípicas, além de não necessitar de monitoramento contínuo e requerer pouco espaço para armazenamento (Dellaretti 2014). O agente protetor é imprescindível na preparação dos microrganismos para serem submetidos à técnica, afinal, o processo de liofilização pode ser muito agressivo para a célula. O *skim milk* aumenta a osmolaridade da célula, facilita a saída de água intracelular para o meio extracelular, e dificulta assim, a formação de cristais de gelo que poderiam danificar a estrutura fenotípica e genotípica da amostra (Dellaretti 2014).

Apesar desse conhecimento, a literatura dispõe de poucos estudos investigando a influência da liofilização sobre a viabilidade e as características feno-genotípicas dos fungos de diferentes classes, inclusive dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Esses gêneros têm destaque na biotecnologia pela síntese de metabólitos secundários com diversas bioatividades, como por exemplo, as atividades antibacterianas (Lacaz *et al.* 2002). Por isso, esta pesquisa tem por objetivo, contribuir para a composição de um acervo viável e servir para o desenvolvimento de pesquisas de substâncias fúngicas com aplicações biotecnológicas.

## Material e métodos

Foram utilizados 100 fungos do gênero *Aspergillus* divididos em 7 espécies: *A. candidus* (2), *A. clavatus* (3), *A. flavus* (25), *A. fumigatus* (11), *A. niger* (27), *A. ochraceus* (24), *A. sydowi* (8) e 50 fungos do gênero *Penicillium*. Esses fungos foram isolados do ambiente e são pertencentes à Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e apresentam depósitos entre os anos 2008 e 2012. Essas linhagens encontravam-se preservadas em óleo mineral e foram reativadas para a realização da presente pesquisa. Após o crescimento da colônia em tubo de ensaio em meio Ágar Batata Dextrose (BDA), por 7 dias à 28°C, cada fungo foi semeado em uma placa de Petri contendo o meio BDA, e após incubação por 7 dias à 28°C, as colônias viáveis e não contaminadas foram fotografadas e as características morfológicas observadas foram: forma, borda, topografia, textura e cor e aspecto de colônia. Posteriormente os fungos foram submetidos ao processo de liofilização de acordo com Day *et al.* (2007) conforme descrito a seguir:

Em frascos de vidro “penicilina” de 20 mL, foi adicionado 1 mL de *skim milk* (meio de preservação), e então com uma alça de inoculação estéril foi homogeneizado a este meio uma quantidade de biomassa fúngica. Retirou-se a suspensão de esporos do tubo de ensaio, o homogeneizado feito anteriormente, e transferiu-a para tubos tipo penicilina. Na sequência, as amostras foram submetidas ao processo de liofilização, sendo incubadas durante 16 horas na máquina Wizard 2.0, da marca SP Scientific, da linha Advantage Plus. Em condições de vácuo menor que 750 rpm, à -45 °C e + 30 °C nas prateleiras. Após o processo, os tubos foram fechados, ainda em condições de vácuo, com tampa para liofilização e lacrados com lacre de metal, receberam a etiqueta padrão das Coleções de Microrganismos do INPA, e foram armazenados a -20°C.

Foram utilizados dois frascos de vidro tipo “penicilina” para cada amostra, dos quais um permaneceu no acervo da coleção e outro após 90 dias foi utilizado para a reativação. A reativação ocorreu de acordo com Girão *et al.* (2004) e consistiu na adição de 1 mL de água destilada estéril no frasco com o liofilizado, hidratando a amostra que em seguida foi semeada (0,25 µL) em uma placa de Petri com BDA. Para a validação do procedimento realizaram-se os controles de esterilização do meio de cultura, da água e da cabine de biossegurança.

Após o crescimento das colônias, avaliou-se a viabilidade, a pureza e as mudanças macro morfológicas de cada fungo. A avaliação macro morfológica foi realizada analisando as características macroscópicas descritas anteriormente. Com a finalidade de comparação das colônias, as imagens foram capturadas antes e após a preservação. Após o processo de reativação, a viabilidade fúngica (crescimento ou não do fungo preservado) e a presença de contaminantes foram observadas para a realização do cálculo da frequência de cepas viáveis e contaminadas.

## Resultados e discussão

Do total de 100 fungos do gênero *Aspergillus*, apenas 16 (16%) apresentaram contaminação após a reativação. Observou-se que *A. ochraceus* foi a espécie com maiores taxas de contaminação (38%) seguido de: *A. fumigatus* (27%), *A. sydowi* (13%), *A. flavus* (8%), *A. niger* (4%). Os fungos *A. candidus* e *A. clavatus* não apresentaram contaminações após a sua reativação. Como contaminantes encontraram-se bactérias, leveduras e outros fungos filamentosos, sendo mais frequentes as leveduras. Nenhuma amostra do gênero *Penicillium* apresentou contaminação. Na figura 1 encontram-se os percentuais de contaminação e pureza das amostras após a reativação, em cada espécie.

Com base nas fotos e nos dados anotados sobre as culturas pré e pós liofilização, foram avaliadas as diferenças macro morfológicas de cada amostra. A figura 2 demonstra a quantidade de fungos que tiveram a morfologia modificada.

A espécie *A. ochraceus* apresentou o maior índice de alteração morfológica, que foi observada em 17 das 24 cepas (71%). Essas modificações também ocorreram nas amostras de *A. niger* (alteração em 18

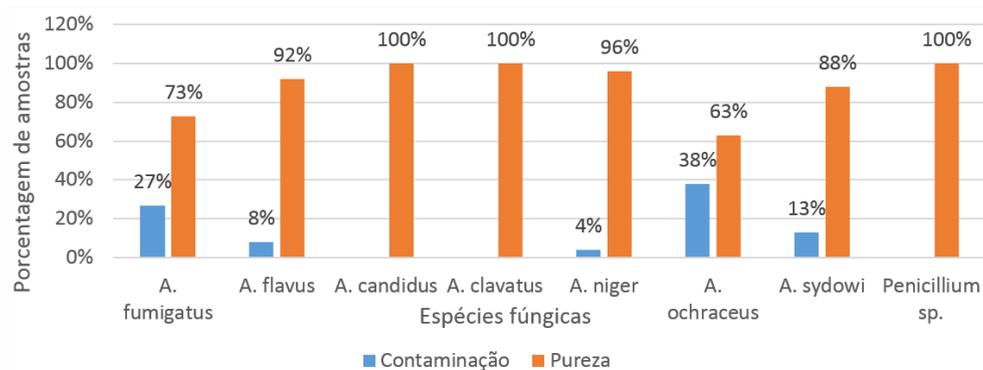


Figura 1. Relação dos fungos contaminantes das amostras após o processo de liofilização

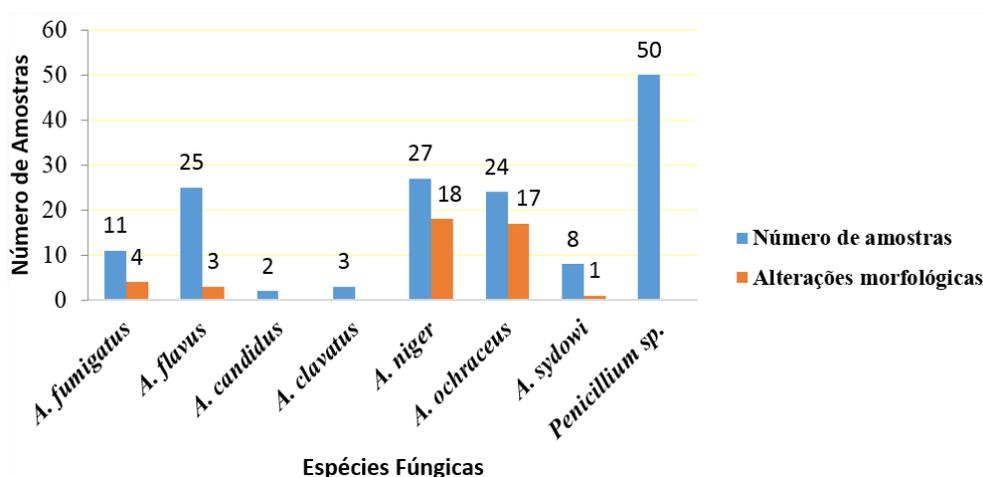


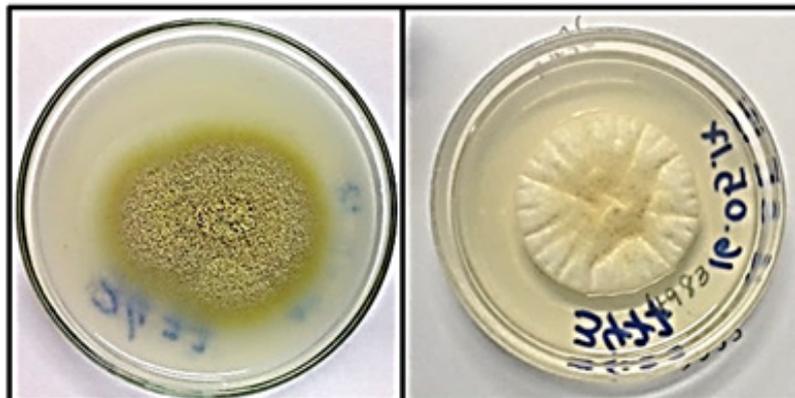
Figura 2. Dados de alterações morfológicas das culturas fúngicas após o processo de liofilização

cepas, do total de 27 amostras), *A. fumigatus* (com alteração em 4 cepas, do total de 11), *A. sydowi* (com alteração em 1 cepa, do total 8 amostras) e *A. flavus* (com alteração em 3 cepas, do total de 25).

Os fungos *A. candidus* e *A. clavatus*, assim com o gênero *Penicillium* sp., não apresentaram mudanças na morfologia.

As maiores mudanças observadas nos fungos *A. ochraceus* foram relacionadas à coloração da colônia, antes com um pigmento amarelo e posteriormente apresentou-se com cor mais clara, se aproximando do branco, e a topografia de plana para crateriforme (Figura 3).

A segunda espécie com maior taxa de alterações na macro morfologia foi *A. niger* (66%) que apresentou mudanças na sua coloração, na textura e topografia (Figura 4).



**Figura 3.** Cultura do fungo *A. ochraceus* em meio BDA: A imagem da esquerda refere-se ao fungo pré-liofilização, e a imagem da direita refere-se ao fungo pós-liofilização.

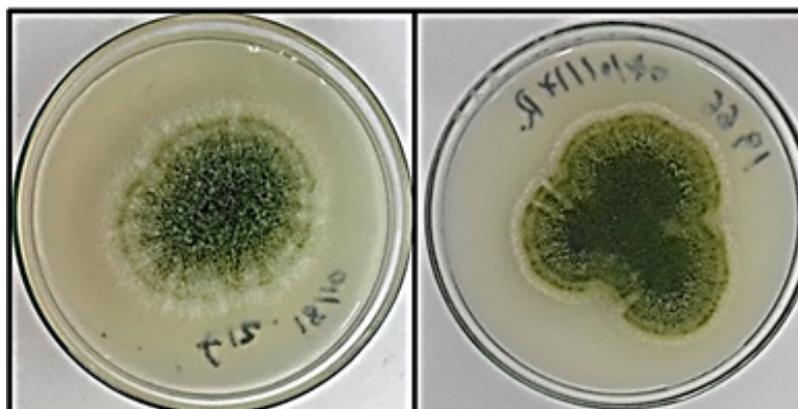


**Figura 4.** Cultura do fungo *A. niger* em meio BDA: A imagem da esquerda refere-se ao fungo pré-liofilização, e a imagem da direita refere-se ao fungo pós-liofilização.

A espécie *A. flavus* demonstrou ser o fungo com maior eficiência do procedimento, apresentando 92% de pureza (figura 5) e 88% de conservação da sua macro morfologia.

Os poucos dados existentes na literatura demonstram que a técnica de liofilização é o método mais apropriado para a preservação de fungos dos gêneros *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., entendendo que por terem esporos resistentes, os gêneros sobrevivem ao processo e mantêm sua morfologia e viabilidade (Pires *et al.* 2012).

Este trabalho traz dados importantes a serem considerados na liofilização principalmente de espécies de *Aspergillus* que apesar de todas as amostras estarem viáveis após a liofilização, observou-se que no gênero *Aspergillus* 16% apresentaram contaminação e em 43% alteração na morfologia, causando



**Figura 5.** Cultura do fungo *A. flavus* em meio BDA: A imagem da esquerda refere-se ao fungo pré-liofilização, e a imagem da direita refere-se ao fungo pós-liofilização.

dificuldade no momento da identificação. Alterações morfológicas pós-liofilização podem ser observadas em fungos, como o descrito por Cavalcanti (2010), que apesar do resultado de 100% de viabilidade celular, nove dentre as 20 amostras de *Candida* sp., apresentaram discordância da morfologia original.

Ressalta-se, portanto que a escolha do método de preservação, é essencial para ter êxito na conservação das características fenotípicas e genotípicas de determinado microrganismo, visto que cada microrganismo reage de maneira diferente para as distintas técnicas (Sola, 2011).

## Conclusão

A técnica de liofilização demonstrou-se eficiente para a preservação de espécies do gênero *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. Entretanto, para o gênero *Aspergillus* sp., apesar de todas as amostras apresentarem-se viáveis após o processo, em 43% observou-se alterações morfológicas e 16% estavam contaminadas.

## Referências

- Cavalcanti SDB 2010. *Aplicação de metodologias de preservação e caracterização de fungos na coleção de culturas do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina.
- Dellaretti, EM 2014. *Preservação de fungos em baixas temperaturas*. São João del-Rei, Brasil Monografia apresentada à Universidade Federal de São João del-Rei do Programa de Graduação de Bacharelado Interdisciplinar em Biosistemas. 36p.
- Day JG, Stacey GN 2007. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. 2nd ed. Totowa, New Jersey, 348p.
- Girão MD, Ribeiro M, Sâmia R, Brilhante N, Cordeiro RA, Monteiro AJ, Gadelha F 2004. *Viabilidade de cepas de Malassezia pachydermatis mantidas em diferentes métodos de conservação*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 37: 229-233.
- Lacaz, CS, Porto, E, Martins, JEC, Heins-Vaccari EM, De Melo NT 2002. *Tratado de Micologia Médica*. 9. ed. São Paulo: Sarvier.
- Marinoni, L, Peixoto, AL 2010. *As coleções biológicas como fonte sobre a biodiversidade*. *Ciência e Cultura*, 62, 3:54-57.
- Newman, DJ, Cragg, GM 2016. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79: 629-661.
- Pires, GCC, Aparecido CC, Finatti D Preservação em Laboratório de fungos filamentosos por longos períodos de tempo. *Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal*.
- Sola MC 2011. *Manutenção de Microrganismos: Conservação e Viabilidade*. Goiânia, Brasil Tese de Doutorado apresentado junto à Disciplina Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. 34p.
- Uruburu F 2003. History and services of culture collections. *International Microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*. 6: 101-3.

## Otimização das condições para a produção de metabólitos no co-cultivo de *Quambalaria cyanescens* e *Paecilomyces* sp.

Débora de Sena Raposo<sup>1</sup>, Joyce Belentani de Souza Maciel<sup>1</sup>, Thiago Fernandes de Sousa<sup>1</sup>, Gilvan Ferreira da Silva<sup>2</sup>, Héctor Henrique Ferreira Koolen<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Discentes da Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas, Escola Normal Superior, Universidade do Estado do Amazonas

<sup>2</sup> Pesquisador da EMBRAPA Amazônia Ocidental

<sup>3</sup> Pesquisador e Docente do Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais, Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas

Emails: deborasenara@gmail.com; hkoolen@uea.edu.br

### Resumo

Fungos apresentam-se como seres vivos diversificados podendo ter em seu reino representantes leveduriformes e filamentosos. Estes, além de possuir importância ecológica, alimentar, e ter alguns representantes atuantes como patógenos humanos, também são importantes produtores de metabólitos secundários com grande utilização na indústria farmacêutica. Tendo em vista o potencial biotecnológico desses organismos e a diversidade de espécies com importância química, este estudo aborda técnicas indutoras de desvios metabólicos (OSMAC) em endófitos amazônicos. O estudo foi conduzido com *Quambalaria cyanescens* e *Paecilomyces* sp., isolados do fruto do açaí-do-amazonas. Evidenciou-se, o potencial químico das cepas, em especial *Q. cyanescens*, bem como do co-cultivo das espécies, o que possibilitou a biossíntese de moléculas potencialmente novas.

**Palavras-chave:** Açaí-do-amazonas; Fungos endofíticos; Metabolismo microbiano; Produtos naturais.

### Introdução

Os fungos são seres vivos eucarióticos com um só núcleo, como as leveduras, ou multinucleados, como os bolores e os cogumelos (Takahashi *et al.*, 2017). Fungos têm uma diversidade de interações fundamentais na natureza, entre elas, a associação mutualista com raízes denominada micorrizas e a degradação de lignina com papel fundamental na reciclagem de nutrientes (Souza *et al.*, 2008). Além de possuir caráter de extrema importância em nível ecológico, fungos estão diretamente relacionados aos seres humanos, servindo como alimento, devido ao seu alto valor nutricional, como é o caso do basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*, e também, sendo fonte de moléculas bioativas, como exemplo, o ascomiceto *Aspergillus terreus* de onde foi descoberto o fármaco lovastatina atuante na redução de colesterol (Singh e Pelaez, 2008).

Pertencente ao filo Basidiomycota, o gênero *Quambalaria* apresenta em suas características morfológicas um grupo de conídios e conidióforos com septos visíveis e posterior brotamento de conídios secundários (Raima *et al.*, 2010) e em suas características macroscópicas produções de diferentes pigmentos. O gênero engloba cinco espécies: *Q. pitereka*, *Q. eucalypti*, *Q. cyanescens*, *Q. coyrecup* e *Q. pusilla* (Stodulková *et al.*, 2015). Representantes deste gênero foram descritos em uma gama de nichos ecológicos, estando presentes no ar, em material vegetal, no solo e até mesmo em insetos (De Hoog e De Vries, 1973). Além disso, *Quambalaria* apresenta espécies produtoras de substâncias bioativas, como por exemplo a *Q. cyanescens* produtora de substâncias bioativas contra células cancerígenas e microrganismos patogênicos, denominadas quambalarinas A e B (Stodulková *et al.*, 2015).

Representantes deste gênero são em sua maioria patógenos de plantas, entretanto, também podem ser encontrados como endofíticos (Padhi e Tayung, 2013). Fungos endofíticos são aqueles que colonizam plantas sem lhes causar sintomas visíveis de infecção (Muvea *et al.*, 2014). Podem gerar benefícios ao hospedeiro, como indução de metabólitos secundários ativos contra patógenos e secreção de fitohormônios. Além disso, são produtores de uma diversidade de substâncias com potencial medicinal, na agricultura e em aplicações industriais (Costa *et al.*, 2012).

Estudos recentes com fungos endofíticos vêm empregando técnicas que permitem a indução de desvios no metabolismo secundário. Uma das vertentes é denominada método OSMAC (do inglês, *one strain many compounds*), a qual consiste em cultivar uma determinada espécie de microrganismo variando-se algumas condições de incubação. Entre os diversos parâmetros que podem ser utilizados estão a alteração da composição e aeração do meio de cultura, o período de cultivo, temperatura, pH, adição de xenobióticos, e por fim o co-cultivo (Saleem *et al.*, 2009). Este último é baseado no cultivo concomitante de duas ou mais espécies fúngicas em uma única fonte de carbono, fazendo com que os microrganismos interajam e disputem os nutrientes limitados produzindo moléculas de ataque e defesa, e assim, produzem novas substâncias (Bertrand *et al.*, 2014). Desta forma, o presente estudo delineou a aplicação da técnica de OSMAC em dois fungos endofíticos dos frutos do açaí-do-amazonas por meio da modalidade de co-cultivo identificando possíveis desvios no metabolismo secundário dos mesmos, bem como otimizando os parâmetros necessário para tal.

## Material e Métodos

O isolamento dos microrganismos foi realizado mediante metodologia previamente descrita (Souza *et al.*, 2004).

A purificação das cepas fúngicas se deu por meio da obtenção de culturas monospóricas. Esta etapa foi feita através de diluições seriadas dos esporos (Petrini *et al.*, 1993). As colônias puras foram preservadas conforme metodologia de Castellani (Petrini *et al.*, 1993) e depositadas na coleção de microrganismos do Grupo de Pesquisa em Metabolômica e Espectrometria de Massas (MMSRG) da UEA, a fim de constituir a micoteca do grupo citado. Para o cadastro, cada linhagem teve suas características morfológicas avaliadas por microscopia ótica, e as estruturas reprodutivas foram utilizadas para formar grupos de isolados. Nesta etapa, apenas uma parte das linhagens foi passível apenas de identificação a nível taxonômico de gênero.

Em seguida, os isolados monospóricos foram crescidos em meio líquido batata dextrose levedura (BDL, batata 200 g/L, dextrose 10 g/L, extrato de levedura 2 g/L) sob agitação à 150 rpm e 28 °C para obtenção de massa micelial. Após a separação das células do caldo fermentado por meio de filtração à vácuo, o ácido desoxirribonucleico (DNA) total foi obtido conforme o protocolo de extração por detergente catiônico 2% (Doyle e Doyle, 1987). A integridade do DNA extraído foi visualizada por meio de gel de agarose 0,8% (m/m) e quantificada em um espectrofotômetro UV-Vis modelo NanoDrop 2000 e logo após diluídas para a concentração de 100 ng/μL.

A identificação molecular dos isolados foi feita com base na região do espaçador interno transcrito e domínios D1/D2 da região 28S do rDNA utilizando-se os primers ITS 1F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') (Arhheim *et al.*, 1990) e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (Carbone e Kohn, 1999). Os amplicons esperados foram fragmentos de aproximadamente 1200 pares de bases, destes, aproximadamente 500 pb correspondem à região ITS e 700 pb correspondem a LSU 28S.

Reações de PCR foram realizadas utilizando 100 ng do DNA total; 0,5 pmol de cada primer; 1X de tampão de reação (100 mM Tris-HCl (pH 8,8 a 25 °C), 500 mM KCl, 0,8% (v/v) Nonidet P40); 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1 mM de dNTPs e uma unidade de Taq DNA polimerase (DNA Express) para um volume final de 25 μL. As condições de PCR foram: desnaturação inicial foi de 94 °C por 3 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento 57 °C por 1 min., extensão de 72 °C por 1,5 min, seguido de extensão final a 72 °C por 5 min. Os amplicons gerados foram visualizados em gel de agarose com auxílio do marcador 1kb para confirmar a amplificação apenas da região de interesse. Os produtos de PCR foram tratados com polietilenoglicol (PEG 20%) e sequenciadas usando o kit BigDye™ Terminator v3.1, no 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™) conforme recomendações do fabricante. A sequência consenso para cada locus foi obtida com base no sequenciamento das fitas *forward* (F) e *reverse* (R) utilizando-se o programa DNA Baser v.4.36 (<http://www.dnabaser.com/>) para montagem de contig. O alinhamento das sequências obtidas foi realizado utilizando-se a ferramenta nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

O cultivo dos fungos para a avaliação do potencial de crescimento e subsequente produção de metabólitos foi realizado em placas de Petri de 8,5 cm. Para a primeira etapa foram testadas fontes de carbono à base de meio BDA, Sabouraud, extrato de carne e Czapek-modificado. Para a segunda etapa apenas de co-cultivo foi utilizado o meio de cultura BDA. Cerca de 10 placas contendo o meio mais indicado foram inoculadas duplamente. O fungo MMSRG-018 foi inoculado do lado esquerdo a 5 mm de distância da borda, ao passo que o fungo MMSRG-024 foi inoculado do lado direito. O crescimento das cepas foi acompanhado a cada 3 dias. Placas controle contendo cultivos individuais das mesmas linhagens foram avaliadas concomitantemente. Ao fim de 21 dias, todo o conteúdo da placa (meio de cultura fermentado e micélio) foi raspado, triturado e macerado com uma mistura de acetato de etila, diclorometano e metanol (5:3:2, v/v). Após filtrado, o solvente contendo os metabólitos foi evaporado por meio de rotoevaporação à vácuo.

As análises químicas foram realizadas em um sistema de LC-MS/MS 6550 iFunnel da Agilent, constituído de um cromatógrafo de alta performance acoplado a um espectrômetro de massas com geometria do quadrupolo tempo de voo (Q-TOF). A técnica de ionização utilizada foi a eletrospray (ESI) e os parâmetros de ionização foram os seguintes: voltagem do capilar, 4000 V; tensão do bocal, 0 V; fragmentador, 100 V; skimmer (capilar de transferência), 65 V; temperatura do gás, 275 °C; vazão de gás, 14 L/min; nebulizador, 45 psi. A temperatura do auto-amostrador foi mantida à 20 °C e o volume de injeção foi de 10 µL.

A separação dos compostos foi realizada em uma coluna Poroshell 120 EC-C18 (Dimensões 50 mm x 4.6 mm, diâmetro da partícula 2.7 µm) utilizando uma fase binária (solvente A: água, solvente B: metanol) para as separações. A eluição em gradiente a 30 °C foi a seguinte: 0-2 min, 5% B; 2-15 min, 5-60% (v/v) B; 15-25 min, 60-70% (v/v) B; 25-35 min, 70-100% (v/v) B; 35-50 min, 100% de B a uma vazão de 0,4 mL/min. As identificações foram realizadas por meio da interpretação manual dos espectros de MS/MS em comparação com a literatura adequada. Os espectros obtidos foram processados utilizando-se o software MassHunter Qualitative Analysis versão B.07.00.

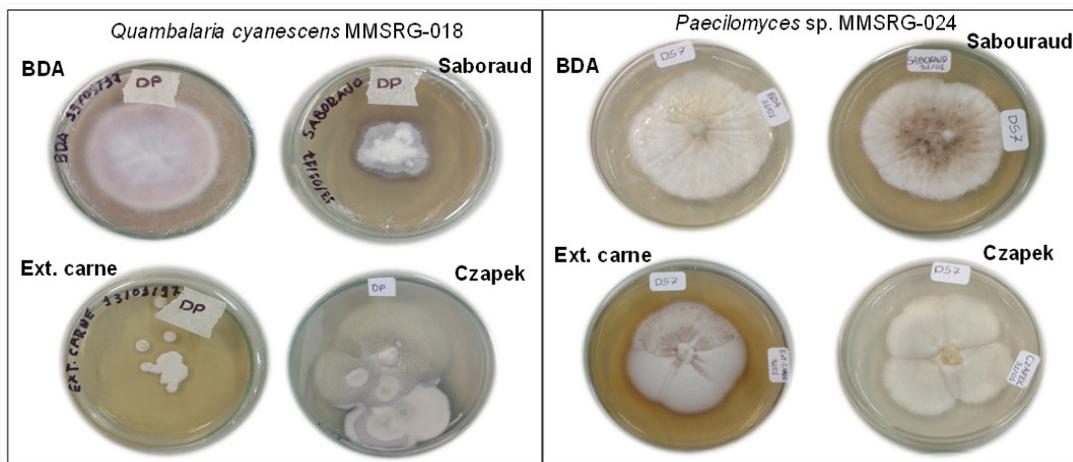
## Resultados e Discussão

Após o sequenciamento, as principais linhagens isoladas dos frutos do açaí-do-amazonas foram identificadas como *Quambalaria cyanescens* MMSRG-018 e *Paecilomyces* sp. MMSRG-024. O gênero *Quambalaria* é de rara ocorrência, sendo sempre associado como um fitopatógeno, especialmente de cultivos de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) (Andrade *et al.*, 2005). Este fungo é classificado como um basidiomiceto com reprodução assexuada. Diferentemente de outros representantes do filo Basidiomycota, este gênero não apresenta basidiocarpo. Por outro lado, fungos do gênero *Paecilomyces* são bem mais recorrentes tendo sido isolados nos mais distintos ambientes (Guo *et al.*, 2007). Membros deste gênero são ascomicetos com diversas potencialidades, especialmente o biocontrole de nematódeos que atacam cultivos de tomates (Guo *et al.*, 2007).

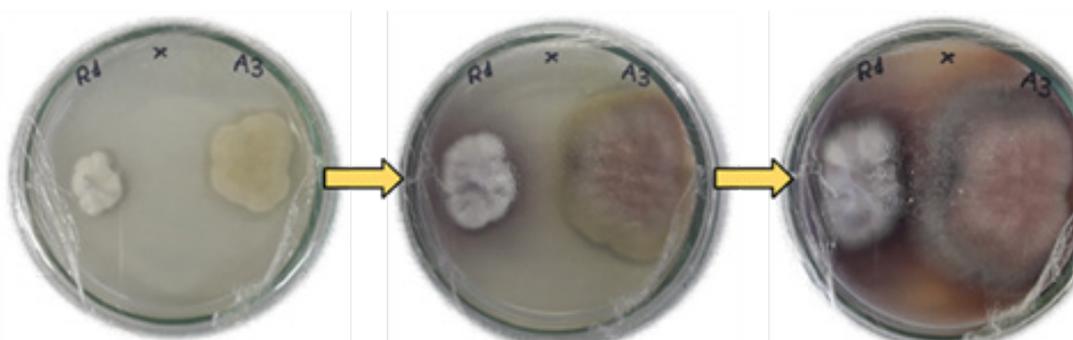
Inicialmente, foram avaliadas as taxas de crescimento das duas linhagens de fungos separadamente. Isto se deu pela necessidade de encontrar uma condição de cultivo propícia para a produção de metabólitos para ambas, bem como na necessidade de que as linhagens crescessem em taxas aproximadas. Os fungos *Quambalaria cyanescens* MMSRG-018 e *Paecilomyces* sp. MMSRG-024 foram avaliados quanto sua taxa de crescimento nos meios BDA, Czapek-modificado, Sabouraud e extrato de carne. O fungo *Q. cyanescens* apresentou a melhor taxa de crescimento em BDA (39,05 mm/dia) e coincidentemente o fungo *Paecilomyces* sp. também preferiu a fonte de carbono de batata crescendo 46.44 mm/dia. Em especial, o fungo *Q. cyanescens* indicou que todas as outras fontes de carbono testadas não eram adequadas para sua nutrição, uma vez que seu crescimento estagnou a partir do quinto dia. Na produção de *Paecilomyces* sp. MMSRG-024 em diferentes meios de cultura após 21 dias de cultivo, metabólitos foram constatados através da coloração, tanto do micélio como do meio de cultura (extrólitos). Porém, novamente, o meio em BDA mostrou-se mais adequado para o propósito deste trabalho (Figura 1.)

Ao serem inoculadas em porções diferentes das placas, observou-se que o *Paecilomyces* sp. cresceu de forma mais acelerada nos primeiros nove dias, enquanto que *Q. cyanescens* cresceu menos. Observou-se que apesar disso, o basidiomiceto passou a excretar seus metabólitos mais rapidamente, comprometendo

seu crescimento. A partir do nono dia, a linhagem de *Q. cyanescens* passou a excretar metabólitos de coloração violeta, o que fez com que o crescimento do ascomiceto *Paecilomyces* sp. fosse retardado. Isto foi observado como um halo de inibição, o que permitiu a posterior retomada do crescimento de *Q. cyanescens* a partir do décimo-quinto dia. Na etapa final do co-cultivo, o fungo *Paecilomyces* sp. passou a excretar seus metabólitos de coloração avermelhada, e desta forma tingiu o restante da placa. Ao final de 21 dias, o conteúdo das placas foi dividido (Figura 2), extraído e os respectivos extratos preparados.



**Figura 1.** Culturas das linhagens de fungos endofíticos *Quambalaria cyanescens* MMSRG-018 e *Paecilomyces* sp. MMSRG-024.

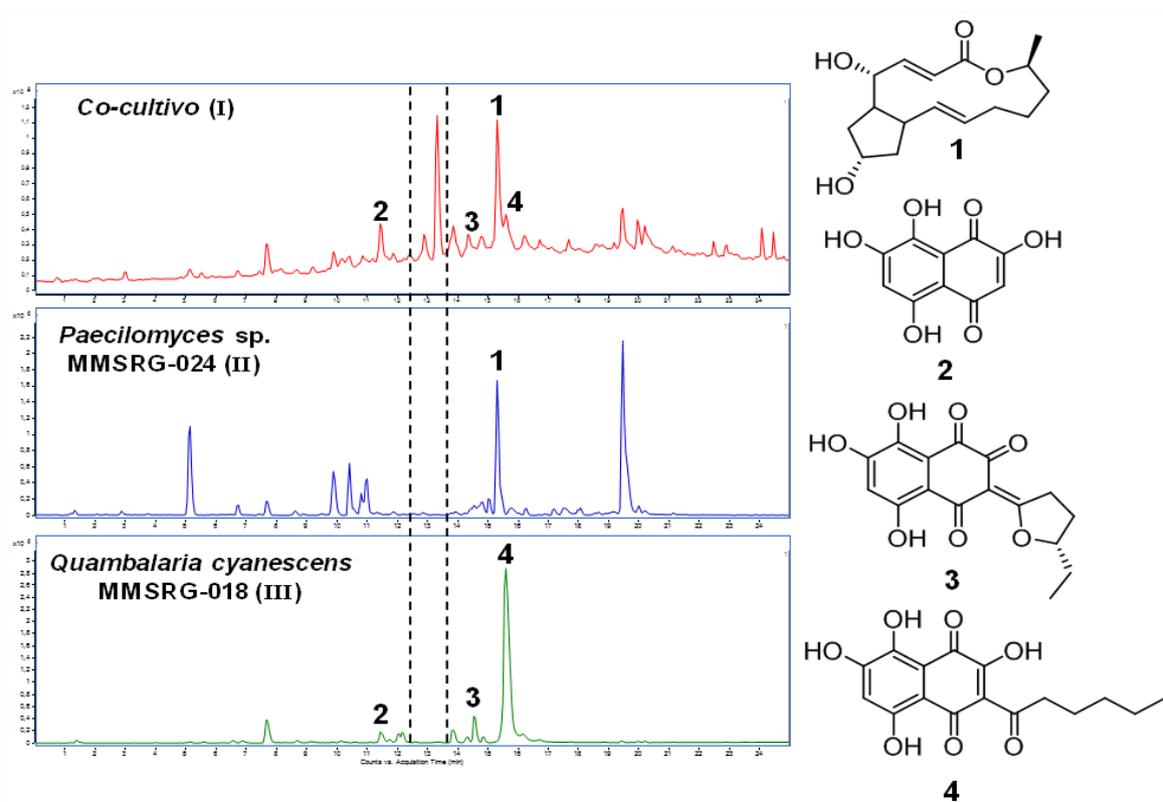


**Figura 2.** Cultivo de *Quambalaria cyanescens* MMSRG-018 (R1) e *Paecilomyces* sp. MMSRG-024 (A3) em meio BDA com 4, 12 e 21 dias, respectivamente.

Os diferentes extratos obtidos foram analisados pela técnica de LC-MS/MS. A comparação dos cromatogramas permitiu identificar os metabólitos produzidos pela cepa de *Q. cyanescens* quando cultivada sozinha, bem como identificar que novos metabólitos são produzidos quando os dois fungos passam a competir pela fonte de carbono. A Figura 3 indica a diferença no metabolismo entre os cultivos isolados e o co-cultivo, onde uma maior complexidade, já esperada, é observada. A principal mudança no metabolismo é constatada pela aparição de dois picos nos tempos de retenção 12,8 e 13,3 minutos. Os compostos eluindo nos referidos tempos apresentaram  $m/z$  375,2591 e 461,2876, respectivamente. A busca na literatura por substâncias fúngicas com as mesmas  $m/z$  não apresentou resultados consistentes, o que nos leva a supor que se tratam de novas moléculas. Adicionalmente, os picos encontrados para os cultivos individuais também foram analisados. Para o fungo *Paecilomyces* sp., apenas o pico 1 foi passível de identificação. A comparação de sua massa exata ( $m/z$  279,1618; M-H) e seu padrão de fragmentação com a literatura permitiu a identificação deste pico como sendo o composto brefeldina A (Wang *et al.*, 2002). Esta substância foi previamente identificada em uma linhagem endofítica de *Paecilomyces* sp. associada à planta *Taxus mairei* (Wang *et al.*, 2002). Para o fungo *Q. cyanescens*, apenas um estudo

prévio relatou alguns de seus metabólitos produzidos (Raima *et al.*, 2010). Por se tratar de um fungo raro e descrito a menos de 20 anos, poucos estudos prévios foram conduzidos até então. As substâncias assinaladas como **2** ( $m/z$  221,0099; [M-H]<sup>-</sup>), **3** ( $m/z$  317,0643; [M-H]<sup>-</sup>) e **4** ( $m/z$  319,0839; [M-H]<sup>-</sup>) foram identificadas como as naftoquinonas mompaína, quambalarina A e quambalarina B, respectivamente (Figura 3) (Stodulková *et al.*, 2015).

Os metabólitos identificados das culturas isoladas possuem diversas potencialidades comprovadas. Destaca-se o potencial antibiótico da brefeldina A (Wang *et al.*, 2002) e as atividades antifúngicas das quambalarinas (Stodulková *et al.*, 2015). Fica claro que o fungo *Q. cyanescens* MMSRG-018 excretou estes metabólitos, e que estes auxiliaram na competição atuando como agentes fungistáticos. Destaca-se também o potencial da substância quambalarina B, recentemente descrita como uma potente substância antitumoral (Grobárova *et al.*, 2016). Os pigmentos identificados tanto no cultivo isolado de *Q. cyanescens* como no co-cultivo indicam que estes compostos desempenham papel vital na ecologia desta espécie. Ressalta-se também, o potencial do fungo *Paecilomyces* sp. que em situação de perigo excretou metabólitos com pigmentação vermelha, estes ainda por terem suas identidades a descobrir.



**Figura 3.** Cromatogramas de LC-MS/MS no modo negativo do co-cultivo (I), cultura isolada de *Paecilomyces* sp. MMSRG-024 (II) e *Quambalaria cyanescens* MMSRG-018 (III), respectivamente. Os picos assinalados foram identificados como brefeldina A (1), mompaína (2), quambalarina A (3) e quambalarina B (4).

## Conclusões

Além da capacidade de produzir diferentes metabólitos da classe das naftoquinonas, neste trabalho evidenciou-se o potencial do fungo *Quambalaria cyanescens* MMSRG-018 em retardar o crescimento de *Paecilomyces* sp. MMSRG-024.

Adicionalmente observou-se que o co-cultivo entre estes dois fungos causa desvios metabólicos que conduzem à produção de duas substâncias não previamente descritas. Os resultados alcançados reforçam a necessidade de estudos visando novas moléculas bioativas de fungos da Amazônia

## Referências

- Andrade GCG, Alfenas AC, Mafia RG, Mafii LA, Gonçalves RC 2005. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha foliar do eucalipto causada por *Quambalaria eucalypti*. *Fitopatologia Brasileira*, 30(5):504-509.
- Arnheim N, White T, Rainey WE 1990. Application of PCR: Organismal and population biology. *BioScience*, 40(3):174-182.
- Bertrand S, Bohni N, Schnee S, Schumpp O, Gindro K, Wolfender JL 2014. Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnology Advances*, 32(6):1180-1204.
- Carbone I, Kohn LM 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3):553-556.
- Costa IPMW, Maia LC, Cavalcanti MA 2012. Diversity of leaf endophytic fungi in mangrove plants of northeast Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(1):1165-1173.
- De Hoog GS, De Vries GA 1973. Two new species of *Sporothrix* and their relation to *Blastobotrys nivea*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 39(1):515-520.
- Doyle JJ, Doyle JL 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1):11-15.
- Grobárova V, Valis K, Talacko P, Pavlu B, Hernychová L, Nováková J, Stodulková E, Flieger M, Novák P, Černý J 2016. Quambalarine B, a secondary metabolite from *Quambalaria cyanescens* with potential anticancer properties. *Journal of Natural Products*, 79(9):2304-2314.
- Guo Z, She Z, Shao C, Wen L, Liu F, Zheng Z, Lin Y 2007. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR signal assignments of paecilin a and b, two new chromone derivatives from mangrove endophytic fungus *Paecilomyces* sp. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 45(9):777-780.
- Muvea AM, Meyhofer R, Subramanian S, Poehling HM, Ekesi S, Maniania NK 2014. Colonization of onions by endophytic fungi and their impacts on the biology of *Thrips tabaci*. *Plos One*, 9(9):1-22.
- Padhi S, Tayung KA 2013. Antimicrobial activity and molecular characterization of an endophytic fungus, *Quambalaria* sp. isolated from *Ipomoea carnea*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 63(2):793-800.
- Petrini O, Sieber TN, Toli L, Viret O 1993. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins*, 1(3):185-196.
- Raima MA, Strobel GA, Vishnevetsky M, Ren Y, Geary B 2010. Biologically active endophytic *Quambalaria* sp. from *Leptospermum junipae* in Australia. *Mycology*, 1(1):67-74.
- Souza AQL, Souza ADL, Filho SA, Pinheiro MLB, Sarquis MIM, Pereira JO 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazonica*, 34(2):185-195.
- Souza HQ, Oliveira LO, Andrade JS 2008. Seleção de basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(1):116-124.
- Saleem TSM, Ravi V, Gauthaman K, Saisivam S 2009. Microbial production and OSMAC study of *Streptomyces* species coded as G-16. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1(2):57-60.
- Singh SB, Pelaez F 2008. Biodiversity, chemical diversity and drug discovery. *Natural Compounds as Drugs*, 65(1):141-174.
- Stodulková E, Císarová I, Kolarík M, Chudícková M, Novák P, Man P, Kuzma M, Pavlu B, Černý J, Flieger M 2015. Biologically active metabolites produced by the basidiomycete *Quambalaria cyanescens*. *Plos One*, 10(2):1-12.
- Takahashi JA, Lima GS, Santos GF, Lyra FH, Silva-Hughes AF, Gonçalves FAG 2017. Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados. *Revista Virtual de Química*, 9(6):2351-2382.
- Wang J, Huang Y, Fang M, Zhang Y, Zheng Z, Zhao Y, Su W 2002. Brefeldin a, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 34(1):51-57.

## Isolamento e identificação de fungos endofíticos de *Passovia stelis* (Loranthaceae)

Sara Simões Silva<sup>1</sup>, Maria Beatriz Silva Costa<sup>2</sup>, Antonia Queiroz Lima de Souza<sup>3</sup>,  
Camila Martins Oliveira<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Bacharel em Química Industrial, Universidade Federal do Amazonas

<sup>2</sup> PG Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, Universidade Federal do Amazonas

<sup>3</sup> Prof. Dra., Universidade Federal do Amazonas

<sup>4</sup> Prof. Dra., Universidade Federal do Mato Grosso

Emails: sarahsimoes94@gmail.com, mariabeatrizsilvacosta@gmail.com, antoniaqlsouza@gmail.com, camilacm@ufam.edu.br

### Resumo

A floresta amazônica é constituída de uma vasta quantidade de matérias-primas, no entanto, os microrganismos endofíticos que a compõem ainda são pouco estudados. Seus metabólitos secundários bioativos possuem aplicações potencialmente úteis na agricultura, indústria e especialmente, no ramo farmacêutico. As plantas da família Loranthaceae, popularmente conhecidas como ervas-de-passarinho, têm sido reconhecidas há muito tempo como portadoras de propriedades terapêuticas, e a espécie *Passovia stelis* é amplamente encontrada na região Amazônica. Assim, o presente trabalho teve por objetivo isolar os fungos endofíticos das folhas e caule de *P. stelis*. As amostras vegetais foram submetidas à assepsia superficial, fragmentadas e inoculadas em placas de Petri contendo meios de cultura BDA, Ágar Aveia e Ágar ISP2 até o crescimento dos fungos, que foram repicados sucessivamente até purificação. Os isolados fúngicos foram analisados macro e micromorfológicamente, e posteriormente preservados em tubos criogênicos, tubos inclinados, palito e água destilada. Foram isolados 104 fungos endofíticos, dos quais 73 foram identificados como pertencentes aos gêneros *Guignardia* sp., *Phomopsis* sp., *Xylaria* sp. e *Colletotrichum* sp. Os resultados obtidos neste estudo apresentam a diversidade de fungos endofíticos existentes nos tecidos vegetais da *P. stelis*, contribuindo para ampliação do conhecimento sobre a microbiota endofítica fúngica de espécies de Loranthaceae.

**Palavras-chave:** Loranthaceae, Microrganismos, Diversidade.

### Introdução

Brasil possui cerca de 20% da biodiversidade global, sendo a floresta amazônica, a maior do mundo, com matérias-primas nas mais diversas áreas. Todavia, as espécies que a compõem e suas interações filogenéticas são pouco compreendidas, inclusive seus microrganismos e suas relações com outros seres vivos (Santos *et al.*, 2013).

Os endófitos (do grego, *endon*: dentro de; *phyton*: planta) (Sudha *et al.*, 2016), são aqueles microrganismos que habitam a parte interna da planta, sendo encontrados em folhas, ramos e raízes, podendo ocupar espaços inter e intracelulares. Em geral, os fungos endofíticos adentram as plantas por meio de lesões naturais e artificiais, e provavelmente estão presentes em todas as plantas, sendo que uma planta pode conter centenas deles (Calderani *et al.*, 2016), e pelo menos um é específico ao hospedeiro (Chapla *et al.*, 2013).

Estes microrganismos são fontes facilmente renováveis e reprodutíveis quando comparados com outras fontes naturais, como plantas e animais (Specian *et al.*, 2014). Os fungos endofíticos, em especial, são fontes promissoras de substâncias naturais novas e são capazes de produzir um grande número de importantes metabólitos secundários bioativos, conhecidos apenas em plantas (Chapla *et al.*, 2013; Soares e Pimenta, 2015).

Os metabólitos secundários são compostos que comumente apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular e atividades biológicas marcantes (Calderani *et al.*, 2016) pertencentes a diversas classes químicas, como policetídeos, alcalóides, terpenos e peptídeos não ribossômicos (Canuto *et al.*, 2012).

As plantas pertencentes à família Loranthaceae têm sido reconhecidas como portadoras de propriedades terapêuticas, que possui uma distribuição pantropical, compreende 73 gêneros e 800 espécies, sendo 12 gêneros e 131 espécies pertencentes à flora brasileira. Os gêneros *Passovia*, *Psittacanthus* e *Struthanthus* são mais diversificados na flora brasileira quando comparados aos de outros países da América do Sul, no entanto, pouco estudada. Quanto à disposição geográfica no Brasil, alguns gêneros são tipicamente tropicais e generalizados, tais como *Passovia*, *Psittacanthus* e *Struthanthus*, enquanto outros têm distribuições restritas, por exemplo, *Cladocolea*, *Gaiadendron*, *Peristethium*, *Phthirusa*, *Oryctanthus*, *Oryctina* e *Pusillanthus*. Esses gêneros são encontrados principalmente na Amazônia, mas *Pusillanthus* e *Oryctina* também habitam Caatinga (Arruda *et al.*, 2012).

A espécie vegetal *Passovia stelis* recebe o nome popular de “erva-de-passarinho” devido ao expressivo número de espécies, cuja dispersão é feita sobretudo por aves, havendo uma estreita relação entre o grupo de plantas e as aves (Vasconcelos e Melo, 2015). As pseudobagas sulcosas atraem-nas e são avidamente ingeridas (Conceição *et al.*, 2010). A semente, após passar pelo trato digestório das aves, é eliminada com as fezes e ao cair sobre a casca de alguma árvore, geralmente, germina. A erva-de-passarinho se fixa nos galhos e troncos da planta hospedeira, se desenvolvendo vigorosamente e ocupando partes localizadas ou quase a totalidade da copa (Caires *et al.*, 2009). A *P. stelis* é utilizada na medicina popular como adstringente para as moléstias uterinas, antidiarreica, abortiva, hemostática, antiasmática, antileucorréica, contra a bronquite, afecções das vias respiratórias, tosses, pneumonia, antidiabética, anti-hemorrágica e cicatrizante (Paes *et al.*, 2010).

Por conseguinte, este trabalho teve como objetivo isolar os fungos endofíticos das folhas e caule de *Passovia stelis*, podendo assim, contribuir para futuras pesquisas sobre o isolamento de fungos endofíticos associados a espécies da família Loranthaceae, sendo justificável pela carência de informações na literatura sobre a espécie em questão e microbiota fúngica endofítica que nela habita.

## Material e métodos

### *Coleta das amostras*

Foram coletados em março de 2017, quatro folhas e um pedaço de caule aparentemente saudáveis da espécie vegetal *P. stelis*, que encontrava-se parasitando uma planta localizada no estacionamento da Universidade Federal do Amazonas - UFAM em Manaus (3°05'26.6"S e 59°57'52.6"W). Em seguida, as amostras foram acondicionadas em sacos plástico e transportadas para o Laboratório de Bioensaios e Micro-organismos da Amazônia – LABMICRA do Centro de Apoio Multidisciplinar – CAM – Central Analítica/UFAM, onde foi realizado todo o trabalho.

### *Desinfecção das amostras e isolamento dos fungos endofíticos*

Após a coleta, as amostras foram lavadas com detergente líquido e água corrente em abundância a fim de remover as impurezas superficiais. Para o isolamento dos fungos endofíticos foi utilizada uma adaptação das metodologias descritas por Maier (1997) e Souza (2006). A remoção dos microrganismos epifíticos foi realizada em câmara de fluxo laminar, mediante a imersão sequencial das folhas em álcool 70% (1 minuto), hipoclorito de sódio 2,5% (1 minuto) e novamente álcool 70% (1 minuto), seguida de lavagem em água destilada estéril. O caule foi imerso sequencialmente em álcool 70% (3 minutos), hipoclorito de sódio 2,5% (3 minutos) e em álcool 70% (3 minutos), seguido também de lavagem em água destilada estéril.

Com o auxílio de um bisturi e uma pinça, ambos estéreis, tanto folhas quanto caule foram cortados em pequenos fragmentos e inoculados na forma de matriz (2 x 2) (4 fragmentos por placa) em placas de Petri contendo meios de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar), Ágar Aveia (aveia, extrato de levedura, extrato de malte, ágar e dextrose) e Ágar ISP2 (amido, extrato de levedura, extrato de malte, ágar e dextrose), acrescidos de ampicilina com tetraciclina (200µg.mL<sup>-1</sup>) e fluconazol, para evitar o crescimento de contaminantes. As placas foram incubadas em estufa BOD à 18 °C por 8 dias e posteriormente, à 26 °C. Durante todo esse período, foi observado o crescimento dos fungos e, conforme estes cresciam nas placas, foram realizados repiques sucessivos até que fosse obtido colônias puras.

Posteriormente, os isolados fúngicos foram agrupados por suas semelhanças macromorfológicas e alguns destes, foram analisados micromorfolologicamente utilizando o lactofenol azul-algodão e microscópio óptico, onde foram observadas as presenças ou ausências das estruturas reprodutivas.

Os fungos endofíticos isolados da *P. stelis* foram preservados em tubos de ensaio contendo meio de cultura inclinado, recoberto com óleo mineral (*slant*); palito dentro de tubo de ensaio, que por sua vez foi inserido em tubo Falcon; água destilada (*Castellani*) e tubos criogênicos contendo glicerol 20%.

## Resultados e discussão

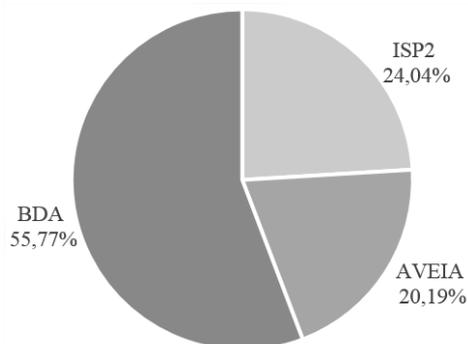
Nesta pesquisa foram isolados 104 fungos endofíticos da espécie vegetal *P. stelis*, dos quais 80 foram obtidos a partir das folhas e 24 do caule.

Na análise dos dados coletados, foi observado que o maior percentual de fungos endofíticos cresceram em meio de cultura BDA (55,77 %), seguido de Ágar ISP2 (24,04 %) e Ágar Aveia (20,19 %) (Figura 1). Semelhantemente a estes resultados, foram expostos no trabalho realizado por Almeida (2014), que isolou 59 %, 29 % e 12 % nos meios de cultura BDA, Ágar ISP2 e Ágar Aveia, respectivamente, de fungos endofíticos das folhas, galhos, caule e raiz de *Gustavia* sp. (Lecythidaceae). Percebe-se em ambos os resultados uma preferência dos endófitos pelo meio de cultura BDA.

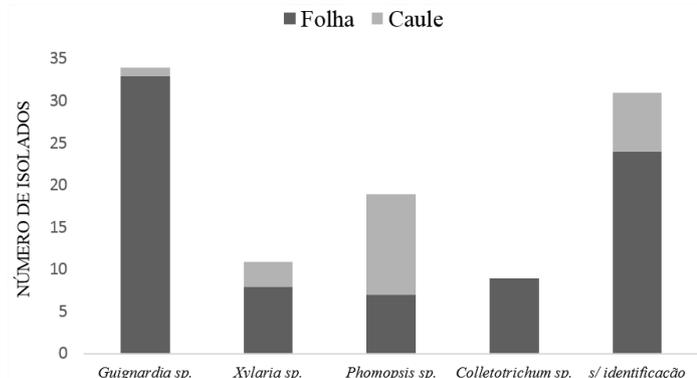
Dos 104 fungos endofíticos isolados das folhas e caule da *P. stelis*, 73 foram identificados como pertencentes aos gêneros *Guignardia* sp., *Phomopsis* sp., *Xylaria* sp. e *Colletotrichum* sp., com destaque para o gênero *Guignardia* sp., o qual apresentou a maior frequência dentre os isolados, seguido de *Phomopsis* sp., *Xylaria* sp. e *Colletotrichum* sp., respectivamente. Os 31 isolados fúngicos restantes não puderam ser macro e micromorfolologicamente identificados devido à ausência de estruturas reprodutivas passíveis de reconhecimento ao microscópio óptico (Figura 2).

De modo geral, a quantidade de isolados fúngicos a partir das folhas foi maior que do caule, reafirmando que dentre os tecidos vegetais, as folhas são mais colonizadas devido aos tecidos mais frágeis e também aos estômatos; possíveis portas de entrada para tais microrganismos (Souza *et al.*, 2004), o que explicaria a diversidade de fungos endofíticos isolados deste órgão vegetal.

Paes *et al.* (2010) avaliaram a microbiota fúngica endofítica existente nas folhas e caules de espécies de *Phthirusa Pyrifolia* (Loranthaceae), que parasitavam *Mangifera indica* L. (mangueira) e *Theobroma cacao* (cacau). Os resultados apontaram, de forma similar ao presente estudo, as folhas como a estrutura vegetal mais habitada pelos endófitos, sendo isolados das folhas, 39% da *P. Pyrifolia* que parasitava *M. indica* e 34% da *P. Pyrifolia* que parasitava *T. cacao*, enquanto que a partir do caule, foram isolados 26% da *P. Pyrifolia* que parasitava *T. cacao* e 27% da *P. Pyrifolia* que parasitava *M. indica*. Quanto aos gêneros isolados, não houveram semelhantes aos gêneros identificados neste estudo, a saber, *Aspergillus*, *Penicillium* e micélio estéril.



**Figura 1.** Percentagem de fungos endofíticos isolados da *Passovia stelis* em relação aos meios de cultura.



**Figura 2.** Distribuição dos fungos endofíticos isolados da *Passovia stelis* segundo tecido vegetal utilizado.

## Conclusões

Um total de 104 fungos endofíticos foi isolados de folhas e caule de *Passovia stelis*, dos quais 73 pertencentes aos gêneros *Guignardia* sp., *Phomopsis* sp., *Xylaria* sp. e *Colletotrichum* sp.

Os endófitos isolados foram codificados e depositados ao acervo de fungos endofíticos do Grupo de Estudos Químicos e Biológicos de Microrganismos da Amazônia – EQUIBIM, podendo ser utilizados para estudos posteriores.

## Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro do Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – INCT BioNat, processo n° 465637/2014-0.

## Referências

- Almeida MFO 2014. *Estudos químicos e biológicos de fungos endofíticos de Gustavia* sp. Manaus, Brasil. (Tese Doutorado. Universidade Federal do Amazonas. UFAM). 195f. Disponível em: < <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/5191> > . Acesso em: 10 abr. 2018.
- Arruda R, Fadini RF *et al.* 2012. Ecology of neotropical mistletoes: an important canopy-dwelling component of Brazilian ecosystems. *Acta Botânica Brasileira*, 26 (2): 264-274.
- Caires CS, Uchô-Fernandes MA, Nicácio J, Strikis PC 2009. Frugivoria de larvas de *Neosilba* McAlpine (Diptera, Lonchaeidae) sobre *Psittacanthus plagiophyllus* Eichler (Santalales, Loranthaceae) no sudoeste de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, Mato Grosso do Sul, 53 (2): 272-277.
- Calderani FA, Orlandelli RC, Pamphile JA 2016. Compostos bioativos com propriedades antitumorais produzidos por fungos endofíticos: a Review. *Revista Uningá*, 25(2):79-86.
- Canuto KM, Rodrigues THS, Olivei FSA, Gonçalves FJT 2012 Fungos Endofíticos: Perspectiva de Descoberta e Aplicação de Compostos Bioativos na Agricultura. *Embrapa Agroindústria Tropical*, Fortaleza. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/951754/fungos-endofiticos-perspectiva-de-descoberta-e-aplicacao-de-compostos-bioativos-na-agricultura>. Acesso em: 08 abr 2017.
- Chapla V. M, Biasetto C. R, Araújo A R 2013. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. *Revista Virtual de Química*, 5(3):421-437.
- Conceição GM, Ruggieri AC. *et al.* 2010. Erva-de-Passarinho: substratos vegetais, uso e aplicações na medicina popular. *Scientia Plena*, Maranhão, 064501. Disponível em: < <https://www.scientiaplena.org.br/sp/article/view/24> > . Acesso em: 08 abr 2017.
- Maier W 1997. Accumulation of sesquiterpenoid cyclohexenone derivatives induced by *Arbuscular Mycorrhizal* fungus in members of the Poaceae. *Planta*, 202(I): 36- 42.
- Paes LS. *et al.* 2010. Levantamento da microbiota fúngica endofítica de *Phthirusa pyrifolia* Kunth com caracterização anatômica dos tecidos colonizados. *Revista Igapó*, 4(1). Disponível em: < <http://200.129.168.183/ojs/index.php/igapo/article/view/224> > . Acesso em: 11 maio 2018.
- Santos TT, Varavallo MA 2011. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, 32(2): 199-212.
- Soares DA, Pimenta, RS 2015. Avaliação da atividade antimicrobiana de pigmentos extracelulares produzidos por fungos endofíticos. *Journal of Bioenergy and Food Science*, Macapá, 2(4) :152-155.
- Souza AQL 2006. *Potencial genético e químico dos endófitos de Murraya paniculata L. (Jack)*. São Carlos, Brasil. (Tese doutorado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de São Carlos. UFSC). 155f. Disponível em: < <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/5364?show=full> > .Acesso em: 10 abr. 2018.
- Souza AQL. *et al.* 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazonica*, 34(2):185-195.
- Specian V *et al.* 2014. Metabólitos secundários de interesse farmacêutico produzidos por fungos endofíticos. *UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde*, 16 (4) : 345-351.
- Sudha V *et al.* 2016. Biological properties of Endophytic Fungi. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, vol. 59: e16150436. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-89132016000100413&script=sci\\_abstract](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-89132016000100413&script=sci_abstract) > .Acesso em: 10 maio 2018.
- Vasconcelos GCL, Melo JIM 2015. Flora of the state of Paraíba, Brazil: Loranthaceae Juss. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, Maringá, 37 (2):239-250.

## Produção de biossurfactantes em amostra de fungos endofíticos isolados de planta da Amazônia *Gustavia hexapetala* (Aubl.) Sm.

Francisca da Silva Ferreira<sup>1,2</sup>, Antonia Queiroz Lima de Souza<sup>1,6</sup>, Ieda Hortêncio Batista<sup>2</sup>, Maria Dolores Pinheiro Fonseca<sup>1</sup>, Renan da Silva Ferreira<sup>3</sup>, Messe Elmer Torres da Silva<sup>1</sup>, Amilcar da Silva Ferreira<sup>4</sup>, Patrícia Melchioma Albuquerque<sup>1,5</sup>, Sérgio Duvoisin Junior<sup>1,5</sup>, José Odair Pereira<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia- Bionorte, Universidade do Estado do Amazonas

<sup>2</sup> Escola Normal Superior - Universidade do Estado do Amazonas

<sup>3</sup> Programa de Apoio a Iniciação Científica (PAIC/UEA)

<sup>4</sup> Secretaria de Estado de Educação e Qualidade do Ensino

<sup>5</sup> Escola Superior de Tecnologia - Universidade do Estado do Amazonas

<sup>6</sup> Faculdade de Ciências Agrárias-Universidade Federal do Amazonas

Emails: fransferreiraeua@gmail.com, antoniaqlsouza@gmail.com

### Resumo

O presente estudo teve por objetivo avaliar a produção de biossurfactantes por oito linhagens de fungos endofíticos isolados de *Gustavia hexapetala* (Aubl.) Sm., por meio de ensaios de emulsificação e testes de tensão superficial. Os experimentos foram realizados utilizando-se óleo de soja como indutor desta produção. Os resultados demonstraram que dentre os fungos testados, um destacou-se por possuir atividade considerada alta, com altura de emulsão de 3,45 cm (88,45%). Nos testes de tensão superficial o meio de cultivo passou de 61,0 mN/m<sup>-1</sup> para 32,8 mN/m<sup>-1</sup> em uma das cepas e 30,1 mN/m<sup>-1</sup> em outras duas, configurando os melhores resultados. Os fungos com melhor produção de biossurfactantes foram identificados como pertencentes ao gênero *Fusarium* sp. Os resultados indicam que as linhagens testadas apresentam potencial para a produção de biossurfactantes.

**Palavras chave:** Biossurfactantes, emulsificação, microrganismos endófitos

### Introdução

As plantas apresentam um grande potencial para a obtenção de compostos biologicamente ativos. Os fungos que habitam, pelo menos por um período do seu ciclo de vida, o interior de um vegetal, sem causar danos ou produzir estruturas externas, podem ser considerados endofíticos (Azevedo *et al.*, 2014). O termo refere-se apenas aos fungos no momento da detecção, sem considerar o futuro status da interação (Azevedo, 1998). As interações dos endófitos com o hospedeiro favorecem a biossíntese de diferentes produtos naturais, os quais têm atraído o interesse da comunidade científica.

Muitos microrganismos produzem moléculas de superfície com baixo peso molecular conhecidas como “biossurfactantes”. Eles possuem alta atividade superficial com alta especificidade e são derivados de recursos renováveis, efetivos sob condições extremas e de natureza não tóxica, quando comparados a sintéticos (Lima *et al.*, 2011).

Os surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas por regiões hidrofóbicas e hidrofílicas que normalmente são distribuídas em interfaces entre fases fluidas de diferentes polaridades (água/óleo e óleo/água) (Rossi *et al.*, 2006). Esta propriedade faz com que os surfactantes sejam adequados para muitas aplicações industriais, como, por exemplo: detergentes, emulsificantes, lubrificantes, agentes espumantes e agentes umidificadores na solubilização e na dispersão de fases. Devido a isso, surfactantes são utilizados em várias indústrias, como: têxteis, cosméticas, farmacêuticas, alimentícias, de papel, polímeros e plásticos (Kitamoto *et al.*, 2002).

A produção dessas moléculas pode ser espontânea ou induzida através da presença de compostos lipídicos, por variações de pH, temperatura, aeração e agitação ou ainda, quando o crescimento celular é mantido sob condições de estresse como baixas concentrações de nitrogênio e alterações nas condições ótimas de pH e temperatura (Úbeda, 2004 apud Pereira *et al* 2017).

Os biossurfactantes podem ser obtidos a partir do metabolismo secundário de uma grande variedade de fungos, bactérias e leveduras. Considerando a massa molecular, podem ser classificados como de baixo ou alto peso molecular. Os biossurfactantes de baixo peso molecular apresentam maior eficiência em reduzir a tensão superficial e interfacial de meios líquidos, enquanto os de alto peso molecular demonstram maior eficiência em estabilizar emulsões óleo/água (Ron e Rosemberg, 2002).

A síntese de biossurfactantes fúngicos ainda é pouco relatada, e a grande maioria dos estudos são voltados para tensoativos produzidos por bactérias, com destaque para os gêneros: *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp. e *Arthrobacter* sp. Entretanto, alguns trabalhos demonstram o potencial uso de fungos na produção destes compostos (Kannahi e Sherley, 2012; Silva *et al.*, 2014, Apud Pereira *et al* 2017).

Levando-se em consideração a enorme biodiversidade vegetal existente no Brasil, ainda há poucas pesquisas envolvendo microrganismos endófitos isolados de plantas tropicais, especialmente da região Amazônica. Portanto, este trabalho objetivou avaliar a produção de biossurfactantes por oito linhagens de fungos endófitos isolados de uma planta medicinal da família Lecythidaceae.

## Material e Métodos

Foram reativadas oito linhagens de fungos endófitos, preservados em Castellani (1939). A reativação foi feita em placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA), e enriquecido com 108 µl de óleo de soja, como fonte indutora da produção de biossurfactantes e mantidos em temperatura de 28° C, por cinco dias.

Após os cinco dias de incubação, foram retirados fragmentos do meio sólido contendo hifas e inoculados em meio líquido acrescido de óleo de soja. Foi produzido inóculo padrão dos fragmentos com o micélio dos fungos endofíticos de *G. hexapetala*, medindo 5 x 5 mm, recortados com auxílio de lâminas de bisturi estéril. Estes inóculos foram transferidos para Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio mineral (MgSO<sub>4</sub> -0,5 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> -3,0 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> -1,0 g/L e extrato de levedura-1,3 g/L e 0,5g/L de óleo de soja) conforme descrito por Jacobucci (2000).

Após autoclavagem do meio mineral, o óleo de soja filtrado em membrana milipore 0,45µm foi adicionado e homogeneizado ao meio de cultura na concentração de 540µL/100mL. Em seguida inoculou-se 05 (cinco) fragmentos contendo micélio dos fungos em cada Erlenmeyer e cultivados durante 10 dias, sob agitação de 170 rpm e 28°C. Foi utilizado como controle, frascos contendo o mesmo meio com o óleo de soja, porém sem a presença de endófitos (Batista, 2009).

Ao final do experimento, o meio metabólico foi filtrado em papel filtro autoclavado com auxílio de bomba a vácuo. Em seguida foi centrifugado por 5 minutos a 4000 rpm, e 4°C. O sobrenadante foi ainda filtrado em membrana milipore 0,45 µm, e acondicionados em tubos falcon de 50 ml. Os meios metabólicos foram utilizados para os testes qualitativo da produção de biossurfactantes: índice de emulsificação (E<sub>24</sub>) e tensão superficial. Os testes foram realizados em triplicata.

A produção de surfactantes foi analisada a partir da análise da atividade de emulsificação do tipo água em óleo (A/O). Para cada 3,5 mL das culturas, foram adicionados 2 mL óleo de soja em tubos de ensaio que por sua vez foram agitados durante 2 minutos em vórtex e deixados 24 h. em repouso. A altura de cada tubo foi medida nos tempos 5 min. e 24 h. (Cooper e Goldenberg, 1987). O teste foi realizado em triplicatas, após esse período, a altura do óleo emulsificado foi medido com auxílio de paquímetro digital. Utilizou-se a convenção adotada para qualificar a atividade emulsificante, que relaciona esta atividade com a altura da emulsão: é considerada alta se apresentar altura igual ou maior que 2 cm, moderada se estiver entre 1 e 1,9 cm e baixa se a altura for menor que 1 cm e calculado segundo a equação abaixo. (Paraszkiwicz, Kanwal, Długonski (2002) e Jackisch-Matsuura *et al.* (2014).

$$E_{24} = \frac{He}{Ht} \times 100$$

Sendo:  $E_{24}$  = Índice de emulsificação após 24 h (%); He = Altura da emulsão; Ht = Altura total

A tensão superficial de cada extrato foi medida utilizando-se um tensiômetro de anel (Krüss), através do método do anel Du Nouy, à temperatura ambiente (22 a 25° C). As análises foram realizadas com os extratos livres de células. O aparelho foi programado para realizar automaticamente cinco medidas para cada extrato e em seguida considerada a média aritmética dos resultados e o desvio padrão das medidas.

A análise macromorfológica foi realizada através da observação dos aspectos de cada fungo endofítico, tais como: forma, coloração e consistência das colônias. Para visualização das estruturas microscópicas foram produzidas lâminas a fresco pela técnica de microcultivo e coloração com azul de lactofenol. As imagens foram ampliadas de 200 a 400 vezes, e comparadas com as imagens de literaturas especializadas (Guerrero e Silveira, 2003; Kiffer e Morelet, 1999; Bononi, 1998; Gilmar, 1959).

Foram submetidos à caracterização molecular os três melhores fungos produtores de biossurfactantes. Os procedimentos de extração de DNA foram realizados no laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas. A PCR e o sequenciamento foram feitos no laboratório de Biologia Molecular da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA - Amazônia Ocidental.

O DNA total foi extraído com kit ZR Fungal/Bacterial DNA MicroPrep™, de acordo com o protocolo do fabricante. A quantificação do DNA genômico foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific) para padronizar o cálculo das diluições das concentrações dos DNAs. Após obtenção do DNA total, foi realizada a amplificação de um fragmento interno de aproximadamente 700 pb das regiões *Its-1* e *2* do rDNA, utilizando os primers *Its1* (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e *Its4* (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE *et al.*, 1990). As reações de amplificação tiveram o volume final de 25 µL (3 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2,5 µL de Tampão 10X, 3 µL de dNTP (1,25 mM), 0,4 µL de Taq DNA polimerase (5U) da Fermentas, 10,1 µL de H<sub>2</sub>O milli-Q, 2 µL de DNA e 2 µL de cada Primer (10 pmol)). A amplificação foi realizada em termociclador Thermal Cycler®. As amplificações da PCR consistiram em: um ciclo inicial a 94°C por 4 min. seguido por 35 ciclos de 94°C por 2 min., 55°C por 2 min. e 72°C por 2 min. Ao final mais um ciclo a 72°C por 10 min. e para finalizar a 4°C, conforme Boichenko *et al.* (2000). A verificação do produto da PCR foi feita através de eletroforese em gel de agarose 1% coradas com brometo de etídio e como marcador foi usado o Ladder de 1 Kb plus da Invitrogen®, após a corrida o gel foi fotodocumentado pelo Sistema de Fotodocumentação L-Pix Touch Locus®, posteriormente os amplicons seguiram para a etapa de sequenciamento.

Os produtos da PCR foram purificados com polietilenoglicol (PEG). Após a quantificação a concentração foi ajustada para 10ng/µL. O sequenciamento foi realizado pelo método Sanger, usando o kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems, Foster City CA, EUA). As sequências obtidas foram analisadas com o Editor de Alinhamento de Sequência BioEdit (versão 7.2.5) e comparadas com sequências depositadas na base de dados do NCBI GenBank (National Center for Biotechnology Information). As sequências que compartilharam 98 - 100% de semelhanças foram identificadas como das mesmas espécies quando os dados foram de acordo com as análises morfológicas e de literatura.

## Resultados e Discussão

As oito linhagens selecionadas foram reativadas e mostraram-se ser viáveis após período de preservação, sendo em seguida submetidas aos testes para produção de biossurfactante em meio líquido (Figura 1 e 2).

Conforme pode ser observado na Figura 3 a produção de biossurfactantes pelos fungos testados pode ser comprovada pelo teste de emulsificação realizado, no entanto, a emulsão formada não apresentou estabilidade após 24 h.

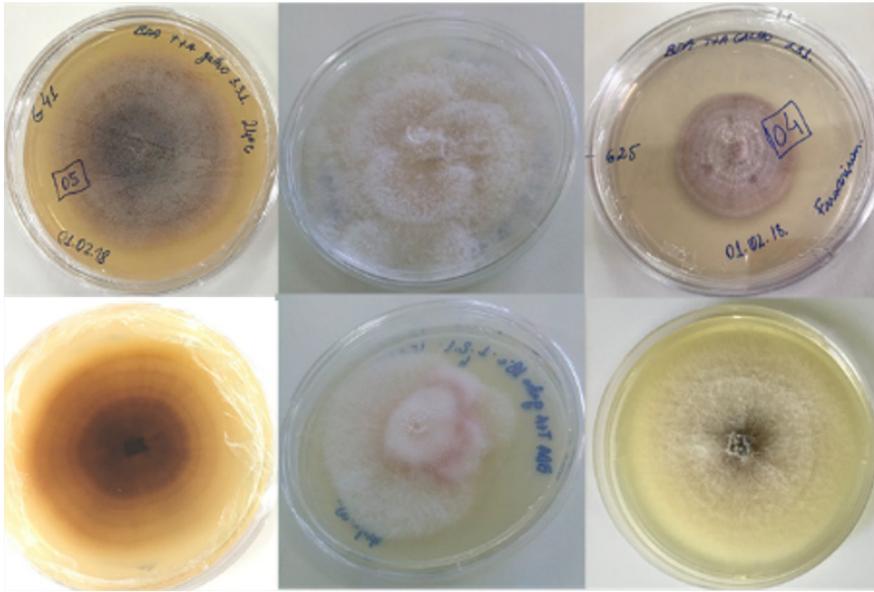


Figura 1. Fungos endofíticos reativados



Figura 2. Fungos cultivados em meio líquido

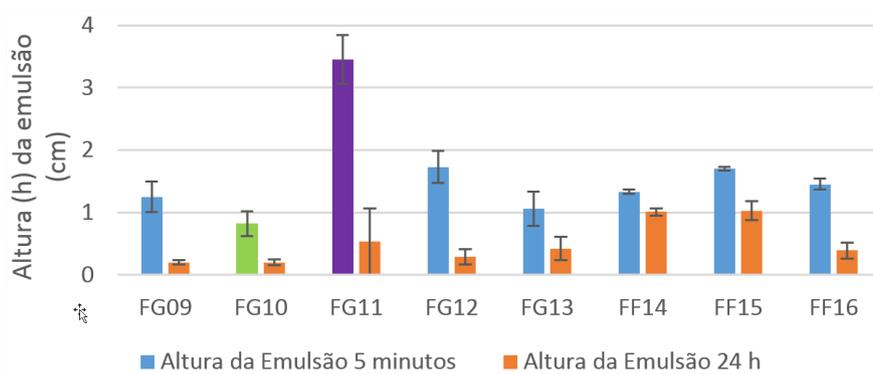


Figura 3. Teste de emulsificação em oito linhagens fúngicas endofíticas. Atividade é considerada como moderada (destaque em azul), atividade baixa destaque em verde) e atividade considerada alta (destaque em lilás). Barras de erro indicam desvio padrão.

Nos ensaios de atividade de emulsificação, ao considerarmos o tempo de mensuração após 5 min. e 24 h o extrato fúngico com melhor atividade de emulsificação foi o FG11 que apresentou h (altura) de 3,45 cm (88,45%) o que é um valor alto considerando a convenção adotada para determinar a atividade emulsificante. As emulsões com menor redução percentual foram as das linhagens FG10 e FG14. A maior redução foi da emulsão de FG09, FG11 e FG12 (Tabela 1).

A determinação da tensão superficial é importante para indicar a presença do biossurfactante no caso de fermentação. Quanto mais eficiente for o biossurfactante, menor o seu valor. Nos testes de tensão superficial o valor inicial foi determinado na solução nutriente utilizada, antes do início dos experimentos. O meio de cultivo passou de 61,0 mN/m<sup>-1</sup> para 32,8 mN/m<sup>-1</sup> com redução de 46,2%, no extrato do fungo FG11, e 30,1 mN/m<sup>-1</sup> nos extratos fúngicos de FG12 e FG15 com redução de 50,6%, configurando os melhores resultados. Foi observado que todos os extratos fúngicos testados obtiveram diminuição da tensão superficial (Tabela 2).

A caracterização morfológica permitiu fazer a identificação preliminar do gênero *Fusarium sp.* para as três linhagens (Figura 04). Essa identificação foi confirmada pela caracterização molecular, que utilizando a região ribossomal ITS1 e 2 permitiu a identificação dos três melhores fungos produtores de biossurfactantes, como pertencentes ao gênero citado (Tabela 3).

Os fungos testados apresentaram resultados positivos para a produção de biossurfactantes. Houve alta produção do fungo *F. babinda* (FG11) com emulsão de 3,45 cm de altura e 88,46% de emulsificação no tempo E<sub>5</sub>, indicando que o referido microrganismo possui alta produção de emulsificante, no entanto, sem apresentar boa estabilidade na manutenção da emulsão formada. Este fato pode ter relação com o

**Tabela 1.** Dados do índice de Emulsificação após 24h

Isolados	HE <sub>5</sub>	HE <sub>24</sub>	Redução % em 24 h
		% -	
FG09	33,33	5,20	84,39
FG10	21,18	5,16	24,36
FG11	88,46	13,58	84,65
FG12	44,58	7,47	83,24
FG13	27,10	10,70	60,52
FF14	34,90	26,50	24,07
FF15	44,15	26,70	39,52
FF16	37,37	10,00	73,24
*(SDS)10 % + óleo de soja	88,85	82,50	6,82

\*Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) Surfactante sintético (controle positivo)

**Tabela 2.** Dados do teste de Tensão Superficial

Isolados	Tensão superficial	Redução da Tensão superficial (%)	Desvio Padrão
FG09	50,0	18,0	0,70
FG10	39,9	34,6	1,54
FG11	32,8	46,2	0,36
FG12	30,1	50,6	0,06
FG13	37,8	38,0	0,69
FF14	39,4	35,4	0,48
FF15	30,1	50,6	0,10
FF16	36,0	40,9	0,08
Meio de cultivo	61,0		0,66

**Tabela 3.** Fungos endofíticos de *G. hexapétala*.

Isolado	Origem	Organismo mais relacionado	Valor E	Identidade	Acesso no Genbank
FG11	Galho	<i>Fusarium babinda</i>	1e-170	90,08%	NR_159861.1
FG12	Galho	<i>F. pseudensiforme</i>	0,0	96,24%	MH863652.1
FF15	Folha	<i>F. pseudensiforme</i>	0,0	96,21%	MH863652.1

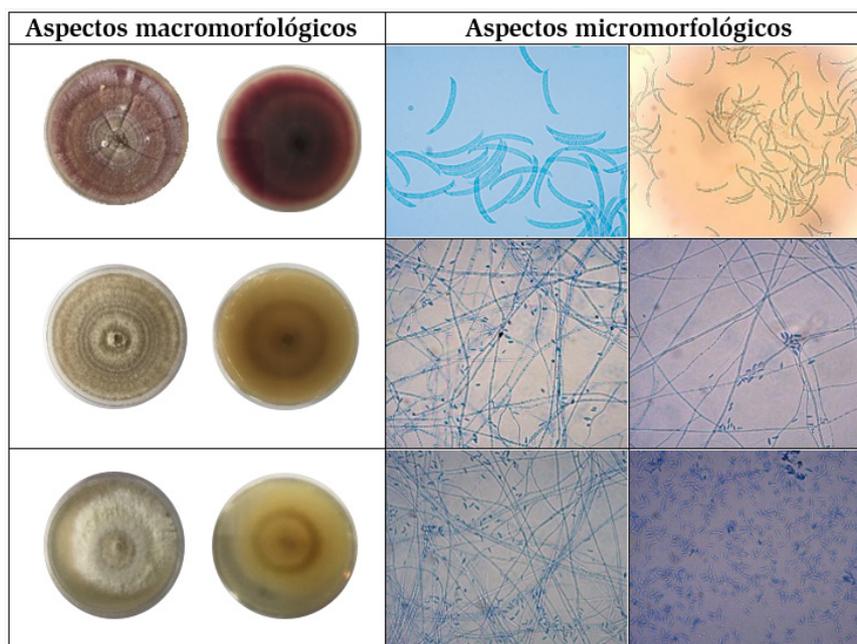


Figura 4. Caracterização macro e micromorfológica dos fungos endofíticos de *G. hexapetala*

peso molecular do metabólito uma vez que quando apresentam alto peso molecular demonstram maior eficiência em estabilizar emulsões óleo/água, enquanto os biossurfactantes de baixo peso molecular apresentam uma maior eficiência em reduzir a tensão superficial e interfacial de meios líquidos (Ron e Rosemberg, 2002).

O resultado no presente estudo mostra-se diferente dos apresentados por Pereira *et al.*, (2017) que obtiveram estabilidade no tempo de  $E_{24}$  na emulsão formada com índice de emulsificação do fungo UEA115 de 62,4 %. Já Lima *et al.* (2016), entre os oito fungos analisados, mostra que *Phoma* sp. (S31) foi eficiente nos testes realizados para selecionar os produtores de biossurfactantes. Souza *et al.* (2016) avaliaram a produção de biossurfactantes por cinco espécies de leveduras em oito diferentes meios de cultivo, e foram utilizadas fontes como, glicose, glicerol bruto, óleo de soja, águas ruças e azeite de oliva, acrescidos de sais e fontes de nitrogênio, em diferentes combinações. A levedura *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 apresentou menor valor de tensão superficial, 32.05 mN/m, em meio contendo azeite de oliva e nenhuma das leveduras avaliadas apresentou atividade de emulsão em nenhum dos meios de cultivo. De acordo com Ilori *et al.* (2005) a maioria dos surfactantes de origem microbiana são específicos, solubilizando ou emulsionando hidrocarbonetos diferentes de forma distinta.

Segundo Haba *et al.* (2000), os microrganismos ditos bons produtores de biossurfactantes são capazes de reduzir a tensão superficial a 40 mN.m<sup>-1</sup> ou menos. Na presente pesquisa a tensão superficial do meio de cultivo passou de 61,0 mN/m<sup>-1</sup> para 32,8 mN/m<sup>-1</sup> no extrato do fungo *F. babinda* (FG11) e 30,1 mN/m<sup>-1</sup> nos extratos fúngicos de *F. pseudensiforme* (FG12 e FG15), configurando os melhores resultados. Para o fungo *F. babinda* (FG11) a redução da tensão superficial foi de 46,2% e para os fungos *F. pseudensiforme* (FG12 e FG15) foi de 50,6%, similar aos valores encontrados em trabalhos realizados por Rufino *et al.*, (2013) que verificou valores para a tensão superficial nos meios de cultivo de *Candida lipolytica* em 50 mNm, alcançando como menor valor 25mNm, durante a fase exponencial após cerca de 16 horas, e permaneceu estável depois desse tempo e por Albuquerque *et al.*, (2015) que observaram a diminuição da tensão superficial para o meio metabólico do fungo Ph IIG de 61,5 para 48,0 mNm<sup>-1</sup> (22% de redução) e de 68,4 para 44,0 mNm<sup>-1</sup> (36%) para o do isolado Ph III 23F.

Pessoa *et al.* (2017) ressaltam a importância do gênero *Fusarium* sp. na produção biotecnológica de interesse industrial. O gênero *Fusarium* sp. tem sido relatado em trabalhos como produtores de biossurfactantes. Destaca-se a pesquisa de Muneer *et al.* 2014, com esse gênero, que relata a diminuição

da tensão superficial do meio de cultivo para  $32 \text{ mN m}^{-1}$ , corroborando com os resultados obtidos no presente estudo onde se obteve os valores de  $32,8 \text{ mN/m}^{-1}$  no extrato do fungo *F. babinda* e  $30,1 \text{ mN/m}^{-1}$  nos extratos fúngicos de *F. pseudensiforme*.

## Conclusões

Conclui-se que os métodos utilizados para avaliar a produção de biossurfactantes pelos fungos endofíticos de *G. hexapetala*. testados foram eficientes uma vez que tanto o índice de emulsificação quanto o teste de tensão superficial apresentaram resultados positivos demonstrando que todos os fungos testados apresentaram redução de tensão superficial e formação de emulsão.

A pesquisa permitiu a descoberta de microrganismos endofíticos do gênero *Fusarium* sp. produtores de biossurfactantes, sendo necessária a continuidade dos estudos para a completa otimização na produção e posterior isolamento destas moléculas, assim como a caracterização da estrutura química de forma a abrir perspectivas para sua aplicação em escala industrial.

## Agradecimentos

À FAPEAM, CNPq, CAPES e CA/UFAM,

## Referências

- Albuquerque PM, Silva MET, Oliveira RL, Duvoisin Jr S 2015. Estudo da produção de biossurfactantes por fungos endofíticos de *Piper hispidum*. XX Simpósio Nacional de Bioprocessos XI simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa. Fortaleza, Ceará, Brasil.
- Azevedo JL 1998. Microrganismos endofíticos. *Ecologia microbiana*, 117-137.
- Azevedo JL 2014. Endophytic Fungi from Brazilian 2 Tropical Hosts and Their Biotechnological Applications. R. N. Kharwar *et al.* (eds.), *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*. DOI 10.1007/978-81-322-1801-2\_2, © Springer India
- Batista IH 2009. Biorremediação de ambientes aquáticos contaminados por resíduos de petróleo: um estudo com bactérias isoladas de *Eichornia crassipes* na Amazônia. Tese de Doutorado (Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, 184p.
- Castellani A 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *J Trop Med Hyg.*, 24:270-6.
- Cooper DG, Goldenberg BG 1987. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and environmental microbiology*, 53(2):224-229.
- Das K, Mukherjee AK 2007. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: some industrial applications of biosurfactants. *Process Biochemistry*, 42(8):1191-1199.
- Gautam KK, Tyagi VK 2006. Microbial surfactants: a review. *Journal of Oleo Science*, 55(4):155-166.
- Haba E, Espuny MJ, Busquets M, Manresa A 2000. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* from waste frying oils. *J. Applied Microbiology.*, 88:379-387.
- Ilori MO, Amobi AC, Odocha AC 2005. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. *Chemosphere*, 61: 985-992.
- Jacobucci DFC 2000. Estudo da influência de biossurfactantes na biorremediação de efluentes oleosos. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Jackisch-Matsuura AB, Santos LS, Eberlin MN, Faria AFD, Matsuura T, Grossman M J, Durrant LR 2014. Production and characterization of surface-active compounds from *Gordonia amicalis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(1):138-144.
- Kannahi M, Sherley M 2012. Biosurfactant production by *Pseudomonas putida* and *Aspergillus niger* from oil contaminated site. *International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences. Sci.*, 3(4):37- 42.
- Kitamoto D, Isoda H, Nakahara T 2002. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants - from energy-saving materials to gene delivery carriers. *Journal Bioscience and Bioengineering*, 94(3):187-201.

- Lima JMS, Pereira JO, Batista IH, Neto PQC, Santos JC, Araújo SP, Pantoja C, Mota AJ, Azevedo JL 2016. Potential biosurfactant producing endophytic and epiphytic fungi, isolated from macrophytes in the Negro River in Manaus, Amazonas, Brazil. *Afr. J. Biotechnol.* 15(24):1217-1223.
- Lima TM, Procópio LC, Brandão FD, Carvalho AM, Tótola MR., Borges AC 2011. Biodegradability of bacterial surfactants. *Biodegradation*, 22(3):585-592.
- Paraszkiewicz K, Kanwal A, Długoński J 2002. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. *Journal of Biotechnology*, 92(3):287-294.
- Pereira DF, Duvoisin Jr S, Albuquerque PM 2017. O estudo da produção de biossurfactantes por Fungos amazônicos. *The Journal of Engineering and Exact Sciences - JCEC*, 03(04):688-695.
- Pessoa MG, Paulino BN, Rodrigues Mano MC, Neri-Numa IA, Molina G, Pastore GM 2017. *Fusarium* species-a promising tool box for industrial biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 101:3493-3511. DOI 10.1007/s00253-017-8255-z.
- Qazi MA, Kanwal T, Jadoon M, Ahmed S, Nighat F 2014. Isolation and Characterization of a Biosurfactant-Producing *Fusarium* sp. BS-8 from Oil Contaminated Soil. Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/btpr.1933.
- Ron EZ, Rosenberg E 2002. Biosurfactants an oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 13:249-252.
- Rossi CGFT, Dantas TNDC, Dantas Neto, AA, Maciel MAM 2006. Tensoativos: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. *Revista Universitária Rural, Série Ciências Exatas e da Terra*, Seropédica, RJ: EDUR, 25(1-2):59-71.
- Rufino RD, Luna JM, Takaki GMC, Sarubbo LA 2014. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988 *Electronic Journal of Biotechnology* 17:34-38
- Silva NRA, Luna MAC, Santiago ALCMA, Franco LO, Silva GKB, Souza PM, Okada K, Albuquerque CDC, Silva CAA, Campos Takaki, GM 2014. Biosurfactant and bioemulsifier produced by a promising *Cunninghamella echinulata* isolated from Caatinga soil in the northeast of Brazil. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(9):15377-15395.
- Souza KST, Gudiña E, Rodrigues L, Schwan RF, Dias DR, Teixeira JA 2016. Avaliação da produção de biossurfactantes por espécies de leveduras. I Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental (CBMAAA). *Ciência & Tecnologia: FATEC-JB, Jaboticabal*, v.8. Número especial (ISSN 2178-9436). Disponível em << <http://www.citec.fatecjab.edu.br/index.php/files/article/view/632/pdf> >>
- Úbeda BT 2004. Estudo da produção de biossurfactante pela bactéria *Kocuria rhizophila*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas/SP, 99f.

## Produção de etanol em sistemas SSF/SSCF em reator de coluna de bolhas com leveduras aclimatizadas

Ana Beatriz Leite Boranelli<sup>1</sup>, Lucas Ramos<sup>1</sup>, Marcelo Holanda Vasconcelos<sup>1,2</sup>,  
Julio Cesar dos Santos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (EEL/USP), Lorena, São Paulo, Brasil

<sup>2</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia (IFRO), Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil

Emails: ana.boranelli@usp.br, lucas.eng12@gmail.com, marcelo.holanda@ifro.edu.br, jsant200@usp.br

### Resumo

Sistemas de sacarificação e fermentação ou co-fermentação simultâneas (SSF/SSCF) são vantajosos em biorrefinarias permitindo a realização de diferentes etapas no mesmo reator e a mitigação de inibição das enzimas por produtos de hidrólise. Avaliou-se a influência da aeração em processos SSF/SSCF em reatores de coluna para a produção de etanol de segunda geração a partir do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por sulfito alcalino e leveduras aclimatizadas. Primeiramente, as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Sheffersomyces stipitis* foram submetidas ao processo de aclimatização progressiva. Em seguida, procedeu-se à produção de etanol nas configurações SSF e SSCF a 40°C em frascos *Erlenmeyer* e em reatores de coluna. O meio de fermentação foi composto por bagaço, solução de celulasas, leveduras e nutrientes. Os processos SSF e SSCF em frascos *Erlenmeyer* resultaram em 15g/L de etanol em 48h usando *S. cerevisiae* e 17g/L de etanol em 72h empregando *S. stipitis*. As vazões de ar foram: 0,3vvm, 0,5vvm e 0,7vvm. Neste caso, as máximas concentrações de etanol obtidas foram 18g/L e 16g/L, respectivamente, empregando as leveduras *S. cerevisiae* e *S. stipitis*. O sistema apresentou potencial para aplicação em biorrefinarias, sendo necessários mais estudos visando a otimização do processo e, conseqüentemente, aumento na concentração final de produto.

**Palavras-chave:** Aclimatização de microrganismos, etanol de segunda geração, sacarificação e fermentação simultânea.

### Introdução

Nos últimos anos, diversas preocupações referentes a aspectos econômicos, ambientais e de segurança energética têm motivado o desenvolvimento de trabalhos de pesquisa visando-se a obtenção de combustíveis alternativos de fontes renováveis. Dentre as opções disponíveis, destaque pode ser dado ao etanol de segunda geração (Cherubini, 2010; Boudet, 2011). Este, que é obtido a partir de materiais lignocelulósicos, apresenta vantagens como a elevada disponibilidade de biomassa no planeta, o elevado potencial de redução na emissão de CO<sub>2</sub> quando se considera o balanço global de carbono e o fato de sua obtenção não implicar na competição com a cadeia de produção de alimentos (BNDES e CGEE, 2008; Gonzalez *et al.*, 2012).

A tecnologia em desenvolvimento para a produção de etanol de segunda geração inclui uma etapa (em geral química) de pré-tratamento do material, a qual tem por objetivo aumentar a digestibilidade enzimática da celulose presente. As outras etapas para obtenção do etanol incluem a hidrólise enzimática e a fermentação, as quais podem ser realizadas em separado – processo SHF (*Separate hydrolysis and fermentation*) ou de forma simultânea – “sacarificação e fermentação simultânea”, SSF (*Simultaneous saccharification and fermentation*). A vantagem desta última configuração de processo está relacionada ao fato da hidrólise da celulose ser inibida por produto e, desta forma, a transformação simultânea da glicose em etanol pode favorecer a produtividade e rendimento da etapa enzimática. Em geral, neste caso, as enzimas e os microrganismos são inoculados no biorreator, sendo que, caso ocorra concomitantemente a transformação de pentoses em etanol, o processo é chamado sacarificação e co-fermentação simultâneas (SSCF, do inglês *Simultaneous saccharification and co-fermentation*) (Van Zyl *et al.*, 2011; Ask *et al.*, 2012).

A hidrólise enzimática e fermentação ou co-fermentação simultânea, no entanto, apresenta limitações com relação às condições do processo, uma vez que as celulasas atuam em uma faixa de temperatura mais elevada em comparação às leveduras empregadas. Diferentes alternativas têm sido avaliadas e, no presente trabalho leveduras foram aclimatizadas para condução do processo a 40°C, conforme metodologia descrita por Edgardo *et al.* (2008). A condição de estresse do microrganismo devido à exposição progressiva a elevadas temperaturas pode causar mudanças estruturais e/ou mudanças metabólicas que atuam como ativador da expressão de genes envolvidos na síntese de compostos específicos que protegem o microrganismo, aumentando sua resistência e favorecendo a fermentação em temperatura elevada (Edgardo *et al.*, 2008). Avaliou-se no presente trabalho, o potencial de uso de reator de coluna de bolhas para o processo, sendo avaliadas diferentes condições de aeração. Bagaço pré-tratado por sulfito alcalino foi empregado como matéria prima e processos SSF com *Saccharomyces cerevisiae* e SSCF com *Scheffersomyces stipitis* foram conduzidos em frascos Erlenmeyer e no reator.

## Material e Métodos

O bagaço de cana-de-açúcar foi gentilmente doado pela Usina Ipiranga Agroindustrial – Unidade Descalvado, localizada no município de Descalvado/SP. O bagaço foi seco por exposição à luz solar e em seguida triturado em moinho de martelo, sendo classificado em peneiras padrão série Tyler, empregando-se nos experimentos a fração que passou por uma malha de 200 mesh. Amostras do bagaço moído e classificado foram analisadas com relação a sua composição em termos de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas.

O pré-tratamento foi realizado em um reator de coluna com 460mm de altura e 220mm de diâmetro interno, seguindo a metodologia estabelecida por Mendes *et al.* (2013).

Os microrganismos utilizados foram *Saccharomyces cerevisiae* IR2 (para processos SSF), uma levedura flocculante, e *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y7124 (para processos SSCF), ambos disponíveis no Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena-Universidade de São Paulo e armazenados em Ágar extrato de malte a 4°C.

Para aclimatização, as leveduras foram submetidas a uma elevação gradual de temperatura (aclimatização progressiva) para seu uso em processos fermentativos a 40°C, conforme metodologia adaptada de Edgardo *et al.* (2008). Inicialmente, as leveduras foram incubadas em incubadora orbital a 150rpm e 36°C, em frascos Erlenmeyer de 250mL carregados com 100mL de meio contendo 50g/L de glicose (para *S. cerevisiae*) ou xilose (para *S. stipitis*), 5g/L de extrato de levedura, 1g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,3g/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e 2g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Durante a etapa de aclimatização, as leveduras foram centrifugadas a 2000g por 15min e transferidas para novo meio de cultivo com a mesma composição. Nesta etapa, a temperatura foi aumentada em 1°C a cada 24h nos quatro primeiros dias, até atingir 40°C, sendo a partir de então elevada 0,5°C a cada 12h por mais dois dias, atingindo 42°C. Posteriormente, as células foram recuperadas por centrifugação a 2000g por 15min, lavadas e ressuspensas em água destilada para obtenção de uma suspensão com elevada densidade celular, sendo os microrganismos transferidos para placas de Petri com meio YMA (20g/L de Ágar, 10g/L de glicose, 3g/L de extrato de malte, 3g/L de extrato de levedura e 5g/L peptona). As placas foram incubadas a 37°C, 40°C e 42°C, sendo mantidas 72h em cada uma destas temperaturas.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* aclimatizada foi incubada em agitador rotativo por 24h a 40°C e 150rpm, sendo utilizados frascos Erlenmeyer de 500mL com 200mL de meio de cultura contendo 50g/L de glicose, 5g/L de extrato de levedura, 1g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,3g/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e 2g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . O cultivo do microrganismo *Scheffersomyces stipitis* aclimatizado, por sua vez, foi realizado em agitador rotativo por 48 h a 40°C e 200rpm, utilizando-se frascos Erlenmeyer de 500mL com 200mL de meio de cultura contendo 50g/L de xilose, 5g/L de extrato de levedura, 1g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,3g/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e 2g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . As células foram recuperadas por centrifugação a 2000g por 15min, lavadas e ressuspensas em água destilada para obtenção da suspensão celular foi utilizada nas fermentações em quantidade adequada para concentração inicial de biomassa de 1g/L.

O processo SSF ou SSCF foi conduzido em agitador rotativo a 150rpm e 40°C em frascos Erlenmeyer de 125mL com 50mL de meio contendo bagaço pré-tratado em quantidade correspondente a um teor inicial de sólidos de 9% m/m. O meio foi composto também de nutrientes (5g/L de peptona bacteriológica, 5g/L de extrato de levedura, 1g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,3g/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e 2g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) e enzimas, com uma carga enzimática de 10 FPU (celulases de *Trichoderma longibrachiatum*, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e 10UI ( $\beta$ -Glicosidase, NS50012, Novozymes Latin America Ltda., Araucária, PR, Brasil) por grama de bagaço pré-tratado. Durante o processo de fermentação, o qual foi realizado em triplicata, foram retiradas alíquotas periódicas para quantificação de açúcares e etanol.

Empregou-se reator de coluna com volume de 160mL e diâmetro interno de 30 mm, o qual foi carregado com bagaço pré-tratado, enzimas e nutrientes, conforme descrito na seção anterior. Para a fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*, o processo foi mantido por 72h, enquanto que o processo com *Scheffersomyces stipitis* estendeu-se por 96h. Em ambos os casos, os experimentos foram realizados em duplicata e houve retiradas periódicas de alíquotas para quantificação de açúcares e etanol.

Para a determinação da umidade do bagaço de cana-de-açúcar, utilizou-se uma balança de infravermelho Mark M163 (BEL Engineering, Piracicaba-SP). A caracterização do bagaço foi realizada antes e após o pré-tratamento, seguindo a metodologia padrão NREL - National Renewable Energy Laboratory (Sluiter *et al.*, 2011). As concentrações de etanol, açúcares e ácido acético foram medidas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent Technology 1200 series (Agilent, Estados Unidos), conforme Medina (2013). Determinou-se a concentração celular por gravimetria.

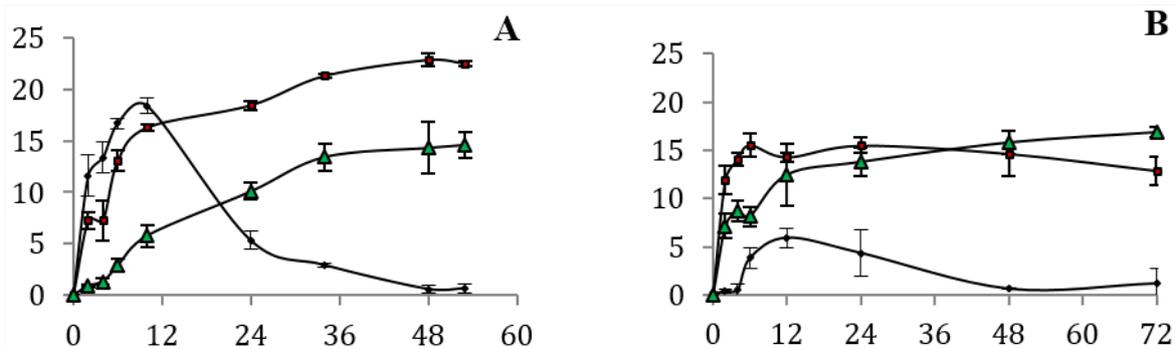
## Resultados e Discussão

Inicialmente, os microrganismos foram aclimatizados para uso em temperaturas elevadas de fermentação. Após o procedimento com elevações progressivas de temperatura, observou-se crescimento da levedura *S. cerevisiae* na faixa de 37 a 42°C, enquanto que a levedura *S. stipitis* cresceu apenas entre 37 e 40°C. O comportamento observado para *S. cerevisiae* já havia sido relatado por Edgardo *et al.* (2008). Estes autores estudaram a aclimatização (progressiva e por choque térmico) de diferentes cepas de leveduras, entre as quais a *Saccharomyces cerevisiae* IR2, que foi capaz de crescer e fermentar a 40°C e também a 42°C, com um rendimento na produção de etanol de aproximadamente 70% do valor teórico. Para a levedura *Scheffersomyces stipitis*, entretanto, não foram encontrados relatos prévios na literatura sobre sua aclimatização para uso em elevadas temperaturas. Seu uso em processos simultâneos, no entanto, pode ser vantajoso, uma vez que é capaz de metabolizar pentoses e hexoses.

Após a aclimatização, avaliou-se o uso das leveduras para produção de etanol em processos SSF e SSCF em frascos Erlenmeyer e em reator. Nestes experimentos, empregou-se como fonte de carbono o bagaço pré-tratado por sulfito alcalino. Este apresentava, antes do pré-tratamento, a seguinte composição: 41,4% de glucana, 19,7% de xilana, 3,8% de arabinosil, 0,5% de acetil, 23,2% de lignina e 3,2% de cinzas. Após o pré-tratamento, a composição obtida foi: 47,1% de glucana, 23,3% de xilana, 2,9% de arabinosil, 0,2% de acetil, 13,2% de lignina e 3,6% de cinzas. Pode-se observar que o pré-tratamento foi eficaz na redução do teor de lignina do material, o que, associado a outras modificações composicionais e estruturais promovidas pelo cozimento com solução de sulfito alcalino, favorece a hidrólise enzimática na etapa posterior (Mendes, 2013).

Os resultados obtidos em frascos Erlenmeyer com relação ao consumo de açúcares e produção de etanol são apresentados na Figura 1. Conforme pode ser observado, ambos os microrganismos foram capazes de produzir etanol nas condições empregadas no processo.

Como esperado, a levedura *S. cerevisiae* consumiu apenas glicose (Fig. 1a), cuja concentração no processo SSF aumentou nas primeiras 12h de fermentação, reduzindo-se a valores próximos de zero em 48h. Neste caso, obteve-se 14,6g/L de etanol em 53h de processo, correspondendo a uma produtividade volumétrica de 0,28g/(L.h). Observou-se também liberação de xilose no meio (Figura 1). De fato, a hemicelulose também foi hidrolisada, liberando xilose no meio de cultivo, o que pode ser atribuído à presença de xilanases em preparações comerciais de celulases.



**Figura 1.** os e produção de etanol nas fermentações realizadas em frascos Erlenmeyer empregando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (a) e *Scheffersomyces stipitis* (b) aclimatizadas. (●) Glicose; (■) xilose; (▲) etanol. Os valores apresentados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão.

Tendo por base a quantidade inicial de xilana no bagaço pré-tratado e a quantidade de xilose liberada no meio no processo com *S. cerevisiae* (que não consome pentoses), pode-se calcular que 96% da xilana inicialmente presente foi hidrolisada.

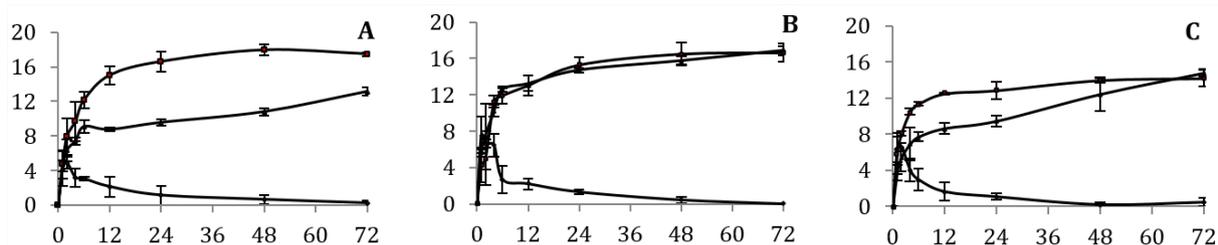
Com relação à hidrólise da glucana, não foi possível fazer o mesmo cálculo, uma vez que a glicose é simultaneamente gerada e consumida no processo. De qualquer forma, caso toda a glucana presente no material pré-tratado tivesse sido transformada em etanol por *S. cerevisiae* com rendimento teórico, 24g/L de etanol teriam sido produzidos no sistema. Assim, o processo resultou em produção de etanol correspondente a 61% de seu potencial teórico. Embora sejam necessários experimentos de otimização, estes resultados indicam o potencial da linhagem microbiana avaliada. Realmente, a levedura *S. cerevisiae* IR2 apresenta características interessantes, correspondendo a uma cepa floculante e termotolerante (Edgardo *et al.*, 2008).

Com relação à levedura *Scheffersomyces stipitis*, os resultados apresentados na Figura 1b mostraram consumo de glicose e xilose, embora esta tenha sido metabolizada apenas parcialmente até 72h de processo. O perfil de consumo de açúcares também parece indicar diauxia, pois a queda na concentração de xilose foi observada principalmente após o esgotamento da glicose (Nakamura *et al.*, 2001). Neste experimento, 17,4g/L de etanol foram produzidos em 72h de processo, correspondendo a uma produtividade volumétrica de 0,24g/(L.h).

Tendo sido demonstrado o potencial das leveduras aclimatizadas para produção de etanol em processos SSF e SSCF em frascos Erlenmeyer, avaliou-se o potencial de uso de reatores de coluna de bolhas. Foram testadas diferentes condições de aeração, e os resultados obtidos com a levedura *S. cerevisiae* são apresentados na Figura 2.

Pode-se observar que, também neste caso, não há indicação de consumo de xilose pelo microrganismo. Esta pentose foi liberada ao longo do processo, resultando em concentrações finais de 13,5g/L a 17,0g/L, o que, conforme explicado anteriormente, corresponde a uma hidrólise de 57% a 71% da xilana presente no material pré-tratado. Os valores, neste caso, foram inferiores aos obtidos nos frascos Erlenmeyers, o que pode estar relacionado a limitações na homogeneização do reator. A glicose liberada, por sua vez, parece ter sido totalmente metabolizada para todos os valores de aeração empregados, com consumo mais rápido observado no experimento com 0,7vvm.

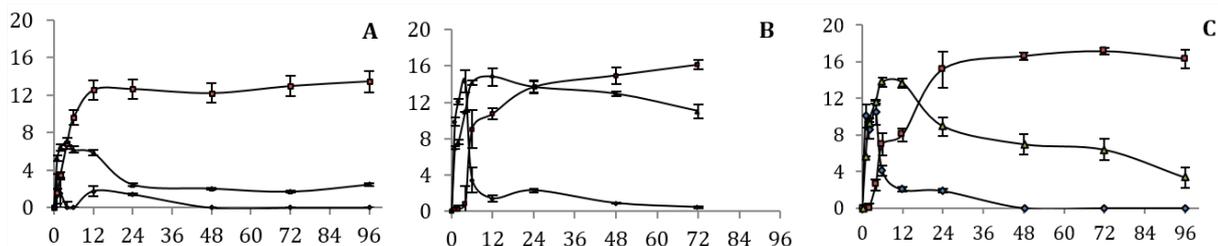
Pode-se observar também na Figura 2, que a aeração influenciou na produção de etanol, sendo a maior concentração deste álcool obtida com vazão de ar de 0,3vvm. Neste caso, obteve-se 15,21g/L de etanol em 12h de fermentação, correspondendo a 1,27g/(L.h) de produtividade volumétrica. Em 48h de processo, 18,35g/(L.h) de etanol foram produzidos, correspondendo a uma produtividade volumétrica de 0,38g/(L.h). Com relação ao máximo teórico de etanol que poderia ser obtido a partir da glucana disponível no sistema, obteve-se, em 12h e 48h de processo, respectivamente, 63% e 76%.



**Figura 2.** Perfil cinético de consumo de substratos e produção de etanol nas fermentações realizadas sob diferentes condições de aeração em reatores de coluna empregando as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* aclimatizada. (A) 0,3vvm (B) 0,5vvm e (B) 0,7vvm. (—●—) Glicose; (—▲—) xilose; (—■—) etanol. Os valores apresentados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão.

A levedura *S. stipitis* aclimatizada também foi avaliada para a produção de etanol em processo SSCF em reator de coluna de bolhas. Os resultados são mostrados na Figura 3. Pode-se observar que a aeração influenciou fortemente no processo SSCF, resultando em diferentes perfis cinéticos de acúmulo e consumo de açúcares e produção de etanol.

Os dados da Figura 3 mostram que os maiores valores de concentração de etanol foram obtidos com aeração de 0,5vvm e 0,7vvm. Com aeração de 0,5vvm, 14,7g/L de etanol foram obtidos em 48h de processo, correspondendo a uma produtividade volumétrica de 0,31g/ (L.h). Neste mesmo experimento, 13,7g/l de etanol haviam sido produzidos em 24h de fermentação, correspondendo a uma produtividade volumétrica de 0,57g/(L.h). Quando a vazão de ar empregada foi de 0,7vvm, 15,1g/L de etanol foram obtidos em 24h de processo, resultando em uma produtividade volumétrica de 0,62g / (L.h). O perfil de consumo de açúcares e produção de etanol observado nos experimentos realizados com 0,5vvm e 0,7vvm indicam que, nesta faixa de aeração, maior vazão de ar resultou em um metabolismo mais rápido dos açúcares produzidos. A vazão de ar de 0,3vvm, no entanto, apresentou um perfil diferenciado, com um consumo de xilose aparentemente mais rápido, porém com menor concentração final de etanol, cuja concentração atingiu 12,54g/L em 12h de processo e permaneceu praticamente constante até o final do processo, mesmo com a continuidade do consumo de açúcares. A produtividade volumétrica, neste caso, foi elevada, correspondendo a 1,04g/(L.h).



**Figura 3.** Perfil cinético de consumo de substratos e produção de etanol nas fermentações realizadas sob diferentes condições de aeração em reatores de coluna empregando a levedura *Scheffersomyces stipitis* aclimatizada. (A) 0,3vvm (B) 0,5vvm e (C) 0,7vvm. (—●—) Glicose; (—▲—) xilose; (—■—) etanol. Os valores apresentados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão.

A variação na aeração influencia fortemente o metabolismo de açúcares por *S. stipitis*, sendo que, dependendo das condições empregadas, pode-se favorecer a via respiratória e o crescimento celular ou vias de manutenção e fermentação (Nakamura *et al.*, 2001). No caso específico do metabolismo de pentoses, a influência da aeração está relacionada também à recuperação de cofatores nas vias fermentativa e respiratória e nas velocidades relativas das enzimas iniciais do metabolismo de xilose (Kruger *et al.*, 2003).

## Conclusões

A aclimatização progressiva das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* IR2 e *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y7124 foi satisfatória, possibilitando seu uso na produção de etanol em processos SSF e SSCF a 40°C.

A quantidade de etanol produzida pela levedura *S. cerevisiae* correspondeu a uma concentração máxima de 15g/L e uma produtividade de 0,31g/(L.h). Com a levedura *S. stipitis*, obteve-se 17g/L de etanol, correspondendo a uma produtividade de 0,24g/(L.h).

A aeração influenciou na produção de etanol pelas leveduras aclimatizadas em sistemas SSF/SSCF nos processos conduzidos em reator de coluna de bolhas.

Para a levedura *S. cerevisiae*, menor aeração favoreceu a produção de etanol, com 15,21g/L de álcool produzidos em 12h de fermentação aerada com 0,3vvm, correspondendo a 1,27g/(L.h) de produtividade volumétrica.

O processo SSCF com *S. stipitis*, por sua vez, também foi fortemente influenciado pela aeração, cuja variação resultou em modificação nos perfis cinéticos de consumo de açúcares e produção de etanol.

A maior concentração de etanol nestes experimentos de SSCF foi obtida com 0,5vvm, correspondendo a 16g/L de álcool produzidos em 72h de fermentação.

## Agradecimentos

À Usina Ipiranga Agroindustrial – Unidade Descalvado, pela doação das amostras de bagaço de cana-de-açúcar. À FAPESP (processo 2014/06923-6), CAPES, ao Programa PUB-USP pelo apoio financeiro e ao programa PIQ-IFRO.

## Referências

- Ask M, Olofsson K, Di Felice T, Ruohonen L, Penttilä M, Lidén G, Olsson L 2012. Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated *Arundo donax* revealed by a comparison between SHF and SSF. *Process Biochemistry*, 47(I):1452-1459.
- BNDDES e CGEE 2008. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro, Brasil: BNDDES.
- Cherubini F 2010. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 51(I):1412-1421.
- Gonzalez R, Daystar J, Jett M, Treasure T, Jameel H, Venditti R, Phillips R 2012. Economics of cellulosic ethanol production in a thermochemical pathway for softwood, hardwood, corn stover and switchgrass. *Fuel Processing Technology*, 94(I):113-122.
- Edgardo A, Carolina P, Manuel R, Juanita F, Jaime B 2008. Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(I): 120-123.
- Kruger NJ, Schaewen AV 2003. The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organization. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(I) 236-246.
- Mendes FM, Laurito D F, Bazzeggio M, Ferraz A, Milagres AMF 2013. Enzymatic digestion of alkaline-sulfite pretreated sugar cane bagasse and its correlation with the chemical and structural changes occurring during the pretreatment step. *Biotechnology Progress*, 4(I): 890-895.
- Medina KJD 2013. *Produção de bioetanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras Scheffersomyces (Pichia) stipitis NRRL Y-7124 e Candida shehatae UFMG HM 52,2 visando à aplicação em bioprocessos com campo eletromagnético*. Lorena, Brasil. (Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, USP). 191p.
- Nakamura Y Sawada T, Inoue E 2001 Mathematical model for ethanol production from mixed sugars by *Pichia stipites*. *Journal of Chemical Technology a Biotechnology*, 76 (I): 586-592.
- Sluiter A, Hames B, Ruiz R O, Scarlata C, Sluiter J. Templeton, D, Energy D 2004. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. *Biomass Analysis Technology Team Laboratory Analytical Procedure*, 1-14.
- Terán-hilares, RT, Jenny, JV, Marcelino, PF, Ahmed, MA 2017. Ethanol production in a simultaneous saccharification and fermentation process with interconnected reactors employing hydrodynamic cavitation-pretreated sugarcane bagasse as raw material. *Bioresource technology*, 243(I): 652-659.
- Van Zyl WH, Chimphango AFA, Den Haan R, Görgens JF, Chirwa PWC 2011. Next-generation cellulosic ethanol technologies and their contribution to a sustainable Africa. *Interface focus*, 1(I):196-211.

## Actinobactéria isolada de solo amazônico: uma promissora fonte de enzimas de aplicação industrial

Felipe Lima Corrêa Branco<sup>1</sup>, José Jeosafá de Sousa Júnior<sup>1</sup>, Sara Freitas de Sousa<sup>1</sup>, Raphael Carlos Ferrer de Santana<sup>2</sup>, Janete Magali de Araújo<sup>2</sup>, Tsai Siu Mui<sup>3</sup>, Silvia Katrine Rabelo da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Oeste do Pará

<sup>2</sup> Pesquisador, Universidade Federal de Pernambuco

Emails: felipe.bsn@gmail.com, josejeosafajrstm@hotmail.com, sara\_freitas\_stm@hotmail.com, raphaell.ferrer@gmail.com, janetemagali@yahoo.com.br, tsaicena@gmail.com, katrinerabelos@gmail.com

### Resumo

A indústria brasileira produz uma grande quantidade de resíduos sólidos poluentes que podem ser degradados por enzimas de origem microbiana. Além disso, essas enzimas que são naturalmente produzidas em grande parte por bactérias, entre elas o gênero *Streptomyces*, podem ser amplamente empregadas na indústria têxtil, farmacêutica e alimentícia. Nesse estudo foi avaliado a capacidade de uma actinobactéria isolada da rizosfera de *Aniba parviflora* (macacaporanga) em produzir enzimas de interesse industrial. A actinobactéria foi isolada em meio de cultura Arginina Levedura Agar a partir do cultivo de uma suspensão microbiana de solo rizosférico, seguido de identificação morfológica e molecular a partir do gene RNAr 16S. A prospecção das enzimas bacterianas lipase, esterase, amilase, proteases, pectinase, hemolisina e L-glutaminase foi realizada através de métodos qualitativos em meio sólido, utilizando os respectivos substratos indutivos. A actinobactéria isolada foi identificada com 99% de similaridade com o gênero *Streptomyces cinereus*, e produz enzimas de interesse para a indústria de alimentos como lipases (IE = 3,4), pectinases (IE = 2,2) e esterases (IE = 2,0), além da produção de hemolisina e L-glutaminase, enzimas de aplicação farmacêutica. Estes dados revelam a presença deste grupo de bactérias no bioma amazônico, bem como o seu potencial na produção de enzimas de interesse biotecnológico.

**Palavras-chave:** Streptomyces, Biotecnologia, Amazônia.

### Introdução

Compostos bioativos de origem microbiana podem ser obtidos a partir do metabolismo secundário de diversos microrganismos, incluindo fungos e bactérias. Dentre eles, as actinobactérias merecem destaque, visto a diversidade de metabólitos secundários produzidos por este grupo, os quais apresentam atividade biológica variada como inseticidas, antitumorais, antibióticos, vitaminas e enzimas de interesse biotecnológico utilizadas na indústria alimentícia, detergentes, têxteis, papel e celulose como L-glutaminase, xilanases, lipases, celulasas, pectinases, proteases, amilases e quitinases (Balagurunathan *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012; Rahman *et al.*, 2014; Rashad *et al.*, 2015).

As actinobactérias compõem uma diversidade de bactérias Gram-positivas com alto teor de guanina e citosina em seu DNA, e morfologia filamentosa semelhante aos fungos, pois os esporos se desenvolvem em forma filamentosa, formando micélio com hifas ramificadas no seu crescimento vegetativo (Adegboye *et al.*, 2012). A formação destas hifas é característica neste grupo, sendo que o micélio vegetativo se desenvolve no interior do substrato, o qual é responsável pela sustentação e adsorção de nutrientes, portanto, local de maior atividade enzimática, degradando compostos utilizados na nutrição bacteriana (Lima *et al.*, 2013).

Este grupo de bactérias apresenta versatilidade metabólica, podendo crescer em temperaturas elevadas e sobreviver em ambientes hostis, o que possibilita a sua ampla distribuição nos diversos ecossistemas (Silva *et al.*, 2015). A maioria das actinobactérias é aeróbias, heterotróficas e habitam naturalmente o solo e se adaptam às diversas condições do ambiente, produzem diversos metabólitos secundários e são capazes de colonizar a rizosfera e tecidos internos das plantas.

As actinobactérias ocorrem com maior abundância em solos secos e quentes, e raros em solos turfosos e encharcados, são saprófitas, porém algumas espécies são patogênicas ao homem, animais ou plantas. No solo estas bactérias realizam funções importantes no processo de ciclagem de nutrientes, degradando compostos complexos de difícil decomposição como lignocelulose, lignina, celulose e outros materiais recalcitrantes, devido à sua capacidade em produzir diversas enzimas hidrolíticas e lipolíticas. Atuam também na fixação de nitrogênio dentro das raízes de plantas lenhosas não leguminosas, como ocorre no gênero *Frankia* (Madigan *et al.*, 2004).

Dos 23.000 metabólitos secundários descritos produzidos por microrganismos cerca de 10.000 são metabólitos bioativos produzidos por actinobactérias, sendo obtido do gênero *Streptomyces*, mais de 70% destes compostos (Arasu *et al.*, 2009). O gênero *Streptomyces* é o de maior importância biotecnológica dentro deste grupo, pois é responsável por sintetizar metabólitos com atividades antibióticas, herbicidas, pesticidas, antiparasitários, além de produzirem enzimas de interesse industrial como amilases, celulasas, lipases, xilanases (Rodrigues *et al.*, 2006).

Pouco se conhece sobre a ocorrência de actinobactérias no bioma Amazônia, o qual detém a maior floresta tropical úmida do mundo, rica em plantas e animais com ampla diversidade genética. Dentre as espécies vegetais com alta distribuição na floresta amazônica, a família *Lauraceae* compreende 49 gêneros e cerca de 3.000 espécies, constituída em sua maioria por árvores e arbustos. Exemplares desta família podem ser encontradas em regiões tropicais e subtropicais, com alta diversidade de espécies no norte da América do Sul, sudeste da Ásia e Madagascar (Madriñán, 2004).

Cerca de 22 gêneros e 390 espécies de plantas da família *Lauraceae* ocorrem no Brasil, com alta diversidade nas florestas pluviais, nas restingas e no cerrado. O gênero *Aniba* se destaca por apresentar espécies aromáticas de valor econômico, como as espécies *Aniba rosaeodora* (pau-rosa), *Aniba canelilla* (casca preciosa) e *Aniba parviflora* (macacaporanga), por fornecerem óleos essenciais e alcaloides empregados na perfumaria e fabricação de fármacos (Barroso, 1991; Marques, 2001).

Com o objetivo de contribuir com o conhecimento do potencial biotecnológico deste grupo de bactérias autóctones do bioma Amazônico, este estudo descreve a capacidade de uma actinobactéria do gênero *Streptomyces* sp., isolada da rizosfera de *Aniba parviflora* *Syn fragans* (macacaporanga) em produzir enzimas de aplicação industrial.

## Material e Métodos

A actinobactéria alvo do estudo pertence ao acervo da Bacterioteca do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Oeste do Pará, e foi isolada a partir de solo rizosférico de *Aniba parviflora* *Syn fragans* (macacaporanga), coletado em zona de transição entre floresta ombrófila densa e uma área com características de cerrado (Latitude 20 28' 01.28"S de Longitude 54 49' 45.32"O), no município de Santarém, PA. A actinobactéria foi isolada a partir de 100 µL de uma suspensão de 10g de solo rizosférico preparada em tampão fosfato (PBS 1x) (pH 7,2), a qual foi inoculada pela técnica de esgotamento em placas de Petri (15mmx90mm) contendo o meio de cultura Arginina Levedura Ágar (ALA) (Nonomura e Ohara, 1969) acrescido de Nistatina (100µg/mL). As placas foram mantidas em estufa a 37°C durante 14 dias para crescimento bacteriano, e posteriormente, a colônia de actinobactéria foi previamente selecionada e submetida a sucessivos repiques em meio ALA até a obtenção da cultura pura.

Foram determinadas as características macromorfológicas, fisiológicas e bioquímicas da actinobactéria isolada, tomando como parâmetro o aspecto rígido da colônia sobre o meio de cultura e a formação de micélio aéreo. O isolado bacteriano foi cultivado nos meios ISP – International *Streptomyces* Project (Shirling e Gottlieb, 1966; Williams *et al.*, 1989; Petrova e Vlahov, 2013) para determinação da cor do micélio aéreo e vegetativo e produção de pigmentos.

A identificação da actinobactéria foi realizada por meio de métodos clássicos e moleculares, sendo a morfologia da cadeia de esporos foi determinada a partir do microcultivo em meio ISP2 (Williams *et al.*, 1989; Holt *et al.*, 1994) e análise por microscopia óptica de luz comum (400x) e microscopia eletrônica de varredura (LEO 5410LV) em 10 kV.

O DNA bacteriano foi extraído conforme descrito por Stirling (2003) a partir da biomassa bacteriana precipitada resultante do cultivo durante 72h em 5 ml de meio líquido ISP2 a 30°C. O completo sequenciamento RNAr 16S foi realizado utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores 341-357F (CCTACGGGAGGCAGCAGCAG), 685-704f (GTAGSGGTGAAATACGTAGA) e 1099-1114f (GCAACGAGCGCAACCC) (Lane, 1991). O sequenciamento Sanger foi realizado em sequenciador ABI PRISM 3730 DNA ANALYZER, Applied Biosystems/Hitachi no Laboratório de Genômica e Elementos de Transposição (GaTE) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (<http://gate.ib.usp.br/GateWeb-new/>).

A caracterização bioquímica foi realizada segundo o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Parte *et al.*, 2012). Foi verificada a capacidade de fermentação de carboidratos, produção de gás carbônico e sulfeto de hidrogênio. Para a determinação da utilização de fontes de carbono e nitrogênio foi realizado o cultivo das actinobactérias em meio ISP9 suplementado com diferentes fontes de carbono e nitrogênio, e analisado o crescimento bacteriano após cultivo em estufa a 30°C por 15 dias (Williams *et al.*, 1983; Cook e Meyers, 2003; Ventura *et al.*, 2007).

A prospecção de enzimas de interesse industrial foi realizada em placas de Petri contendo meio sólido aditivado com o respectivo substrato indutor. A produção de lipase e esterase foi determinada segundo (Sierra, 1957), em meio mineral contendo Tween 80 e Tween 20. As placas foram incubadas a 30°C por 10 dias e o aparecimento de um halo branco difuso contendo oleato de cálcio, indicou a produção das enzimas.

A produção de amilase foi determinada conforme descrito por (Conn *et al.*, 1957) modificado a partir do cultivo em meio Ágar-amido a 30°C por 10 dias. O teste foi revelado com 10 mL de solução de lugol 1% e a descoloração do meio em torno da colônia evidenciou a hidrólise do amido.

A atividade proteolítica foi avaliada utilizando os substratos caseína e gelatina. A degradação da caseína foi determinada em meio à base de: Solução 1 (10g leite desnatado, 90 ml água destilada) e Solução 2 (3g Ágar, 97 mL água destilada), mantidas à 30°C por 7 dias. A formação de uma zona clara ao redor da colônia indicou a produção da enzima. A degradação da gelatina foi avaliada em tubo de ensaio contendo o meio Agar nutriente aditivado com 12% de gelatina, 0,5% de peptona e 0,3% de extrato de carne, 5g Peptona, 1000 mL água destilada. Após incubação a 30°C durante 20 dias, a manutenção da consistência líquida após incubação a 4°C por 24h indicou a produção de gelatinase.

A produção de pectinase foi avaliada após o cultivo a 30°C por 7 dias em meio Ágar Triptona Soja (TSA) (1,5 g triptona, 0,5 g peptona de soja, 1,5 g NaCl, 1,5 g de ágar, pH 7,3) suplementado com 1% de pectina cítrica. O aparecimento de halo transparente em volta das colônias após adição de 10 mL de solução de lugol 1% indicou a hidrólise da pectina.

A produção de hemolisinas foi verificada após cultivo em meio Ágar Sangue suplementado com 5% de sangue desfibrinado a 30°C por 7 dias. A presença de um halo claro ao redor das colônias indicou a produção da enzima.

A produção da enzima L-glutaminase foi avaliada segundo (Balagurunathan *et al.*, 2010) após cultivo em ágar glutamina. As placas foram incubadas a 28°C por 7 dias e a produção da enzima foi indicada por meio da mudança da cor amarelo para rosa.

O índice enzimático (IE) foi determinado para os testes semi-quantitativos por meio da seguinte equação:  $IE = Dh/Dc$ , sendo que Dh corresponde ao diâmetro em mm do halo de hidrólise e Dc o diâmetro em mm da colônia das actinobactérias (Stamford *et al.*, 1998). Foi considerado com potencial enzimático índice enzimático acima de 1,5.

Para a realização das análises, adotou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado com três repetições, e os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando o *software* Assistat 7.7

## Resultados e Discussão

A actinobactéria foi isolada após 28 dias de cultivo em meio ALA e previamente nomeada como MPO6. Foi observado o bom desenvolvimento de colônias bacterianas nos meios ISP1, ISP2 e ISP5,

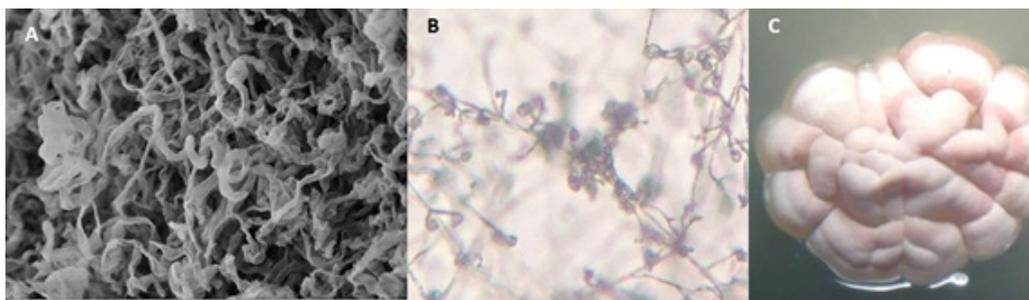
apresentando colônias ásperas, convexas, circulares e com borda irregular (Figura 1). O micélio aéreo formado no meio ISP2 evidenciou coloração predominantemente branca, tendendo ao róseo após 168h de cultivo, bem como a produção de pigmento solúvel de cor âmbar somente neste meio.

A análise do fragmento de 821 pb do RNAr 16S obtido, contendo 56.03% de G + C apresentou 99% de similaridade com o filo Actinobacteria, espécie *Streptomyces cinereus*.

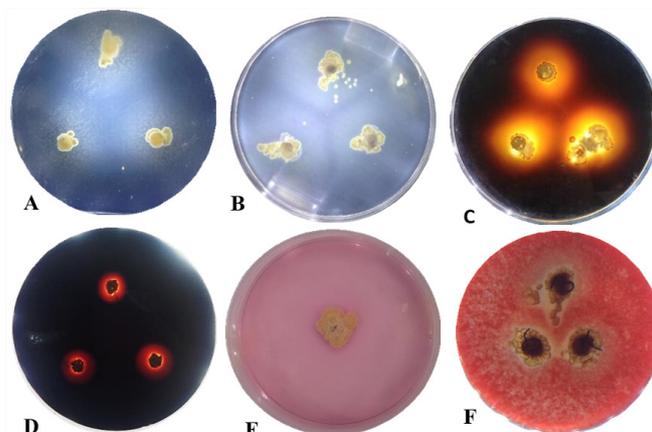
*Streptomyces cinereus* apresentou capacidade de crescimento nos meios contendo a maioria das fontes de carbono e nitrogênio testadas (Tabela 1), resultado este já esperado devido a descrições frequentes na literatura sobre a adição de diversas fontes de carbono e nitrogênio em meios de cultura tanto para isolamento como para manutenção de colônias de actinobactérias. Desse modo, os resultados evidenciam a capacidade dessas bactérias em produzir enzimas que atuam sobre todos estes substratos, sendo que a glicose foi a fonte de carbono preferencialmente utilizada. *Streptomyces cinereus* utiliza 12 das 14 fontes de carbono testadas, com desenvolvimento moderado do micélio aéreo, exceto L-arabnose e D-xilose.

Foi verificada a tolerância as concentrações de 3 a 7% de NaCl, produção de catalase, porém não houve produção de Urease, H<sub>2</sub>S, Indol, CO<sub>2</sub>. A maioria dos gêneros pertencentes ao grupo das actinobactérias é aeróbia, porém, existem também as anaeróbias facultativas (Araujo, 1998). Devido a este fato a produção da catalase é uma característica da maior parte dos representantes do grupo das actinobactérias, como observado no gênero *Streptomyces*, pois apresentam a enzima citocromo oxidase a, b e c.

*Streptomyces cinereus* produz as enzimas gelatinase e L-glutaminase e, as quais foram avaliadas de forma qualitativa, bem como, as enzimas lipase (IE = 3,4), pectinase (IE = 2,2), esterase (IE = 2,0), amilase (IE = 1,3), hemolisina (IE = 1,2) (Figura 2). Visto a produção de diversas enzimas, a actinobactéria isolada apresenta possibilidade de aplicação para diversos bioprocessos como na obtenção de enzimas de interesse alimentar, farmacêutico e ambiental, no tratamento de resíduos oriundos de processos orgânicos.



**Figura 1.** Morfologia de *Streptomyces cinereus*. A. Cadeia de esporos em Microscopia Eletrônica de Varredura (Escala = 2µm). B. Cadeia de esporos em Microscopia Luz Comum (Escala: 400x). C. Aspecto velutino do micélio aéreo formado nas colônias bacterianas em cultivo em meio ISP2.



**Figura 2.** Potencial enzimático de interesse biotecnológico de *Streptomyces cinereus*. A. Lipase; B. Esterase; C. Amilase; D. Pectinase; E. L-glutaminase; F. Hemolisina.

**Tabela 1.** Caracterização bioquímica de *Streptomyces cinereus*.

Testes	Valores
Pigmento de melanina	+
Tolerância a diferentes concentrações de NaCl (%)	3 – 7
Catalase	+
Urease	-
Utilização de Citrato	+
Produção de H <sub>2</sub> S	-
Produção de enzimas de interesse industrial	
Gelatinase	+
Caseinase	-
Amilase	+
Lipase	+
Esterase	+
Pectinase	+
Hemolisina	+
L-glutaminase	+
Utilização de fontes de carbono	
D-Glucose	+
D-Manitol	+
Frutose	+
Sacarose	+
Celulose	+
D-Sorbitol	+
L-Arabinose	-
D-Manose	+
Inositol	+
D-Glicose	+
D-Lactose	+
D-Melezitose	+
D-Rhamnose	+
Trealose	+
D-Xilose	-
Utilização de fontes de nitrogênio	
L-Asparagina	+
L-Arginina	+
L-Tirosina	+
L-Cisteína	+
L-Fenilalanina	+
L-Histidina	-
L-Glutamina	+
L-Metionina	-
L-Ornitina	+
L-Serina	+
L-Treonina	+
L-Valina	+

+ = positivo, - = negativo.

O micélio aéreo formado aproximadamente após cinco dias de cultivo no meio ISP2, confirma o aspecto peculiar ao grupo das actinobactérias, visto que as colônias têm crescimento lento, necessitando em torno de 7 a 10 dias para desenvolver o micélio aéreo (Srinivasan *et al.*, 1991; Hopwood, 1999; Flardh e Buttner, 2009). A morfologia da cadeia de esporos simples espiralada observada indica que a actinobactéria isolada apresenta características do filo Actinobactéria e do gênero *Streptomyces* sp. (Figura 2A e 2B).

O filo Actinobactéria é reconhecido pela capacidade de produzir uma diversidade de enzimas como estratégia para a obtenção de fontes de carbono e nitrogênio para seu desenvolvimento (Korn-Wendisch *et al.*, 1992). Logo, a comprovação da produção de enzimas hidrolíticas como lipases, amilases e proteases podem ser uma alternativa para o tratamento de esgotos e efluentes de indústrias de doces, sorvetes, laticínios e carnes, uma vez que para este fim não é necessário a etapa de purificação, diminuindo, portanto os custos de aplicação (Rigo *et al.*, 2008).

O uso de lipases produzidas por microrganismos vem crescendo consideravelmente nos últimos anos nas indústrias químicas e farmacêuticas. A produção de lactonas sintéticas por lipases constitui outra importante aplicação destas enzimas na indústria farmacêutica. Lactonas naturais (octalactinas) isoladas de *Streptomyces* spp. apresentam atividade citotóxica contra células de melanoma e de tumor de cólon (Ferraz, 2007).

O interesse pelas lipases microbianas se amplificou devido à estabilidade ampla em pH e facilidade de obtenção em comparação com as de origem animal (Hasan *et al.*, 2006). Nos microrganismos, as lipases podem apresentar atividade fosfolipídica, pois são utilizadas como mecanismo de defesa, visto que quando secretadas, facilitam a digestão dos lipídeos e os ácidos graxos auxiliando na adesão tecidual célula-célula e célula-hospedeiro (Stehr *et al.*, 2003)

A pectinase, enzima que também foi produzida pela actinobactérias isolada de *Aniba parviflora* Syn Fragans (macacaporanga), também têm atraído a atenção por sua aplicação como catalisador biológico em diversos processos industriais, com grande aplicação na indústria alimentícia para a fabricação de sucos (Kashyap *et al.*, 2000) e na produção de vinho como clarificador e estabilizador de cor do vinho tinto (Revilla e José, 2003).

A capacidade de produção da enzima L-glutaminase, indica outra possibilidade e aplicação, agora na indústria farmacêutica, visto suas propriedades antitumorais, principalmente contra leucemia linfocítica aguda (LLA) (Koibuchi *et al.*, 2004) e atividade antiviral contra HIV (Plnsn *et al.*, 2014). É também utilizada na indústria de alimentos, tendo sua aplicação na intensificação de sabor, uma vez que aumenta o teor de ácido glutâmico nos alimentos em decorrência da hidrólise da glutamina.

## Conclusão

*Streptomyces cinereus* isolado de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn Fragans (Macacaporanga) produz enzimas extracelulares de interesse industrial, sendo descritos neste estudo preliminar a produção de enzimas hidrolíticas, lipolíticas e antitumorais.

## Referências

- Adegboye MF. *et al.* 2012. *Analysis of Streptomyces spp. Native to Mahikeng Soils in South Africa. Journal of Pure and Applied Microbiology*, 6(3):1001-1010. ISSN 0973-7510.
- Arasu, MV. *et al.* 2009. *In vitro antimicrobial activity of Streptomyces spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, 19(1):22-28. ISSN 1156-5233.
- Araujo J 1998. *Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos*. Ecologia microbiana. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p. 351-367.
- Balagurunathan R. Radhakrishnan M. Somasundaram S 2010. *L-Glutaminase producing actinomycetes from marine sediments-selective isolation, semi quantitative assay and characterization of potential strain. Aust J Basic Appl Sci*, 4(5):698- 705.
- Barroso G 991. *Sistemática de angiospermas do Brasil*. Vol 2 Imprensa Universitária UFV. Rio de Janeiro.
- Conn H, Jennison M, Weeks O 1957. *Routine tests for the identification of bacteria. Manual of microbiological methods*, v. 6, p. 140-188.
- Cook AE, Meyers PR 2003. Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(6):1907- 1915, ISSN 1466-5034.
- Flardh K. Buttner M J 2009. *Streptomyces morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. Nat Rev Microbiol*, 7(1):36-49. ISSN 1740-1526.

- Holt J *et al* 1994. *Gram-positive cocci*. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore: Ed. Williams e Wilkins, p. 544-51.
- Hopwood DA 1999. *Forty years of genetics with Streptomyces: from in vivo through in vitro to in silico*. *Microbiology*, v. 145 (9):2183-202. ISSN 1350-0872 (Print)1350- 0872.
- Kashyap D, Chandra S, Kaul A, Tewari R 2000. Production, purification and characterization of pectinase from a bacillus sp. Dt7. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16(3):277-282.
- Kim BY *et al*. 2012. *Streptomyces cocklensis sp. nov., a dioxamycin-producing actinomycete*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 62(2):279-83. ISSN 1466-5026.
- Koibuchi K, Nagasaki H, Yuasa A, Kataoka J, Kitamoto K 2004. Glutaminase, its gene and a method of producing it. In: *Google Patents*, (2004).
- Korn-Wendisch F, Kutzner H, Balows A, Truper H, Dworkin M, Harder W, Schleifer K 1992. The family streptomycetaceae. *The Prokaryotes*.2:921-995.
- Lane D 1991. *16S/23S rRNA sequencing*. Nucleic acid techniques in bacterial systematics, p. 125-175.
- Lima SMDA, Silva TGDO, Araújo JMDC 2013. *Avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de metabólitos secundários produzidos pela actinobactéria ACTMS-9H isolada da rizosfera de Paulinia cupana Kunth*.
- Madigan MT *et al*. 2004. *Microbiologia de Brock*. Artmed. ISBN 8536323302.
- Madriñán S 2004. *Rhodostemonodaphne (Lauraceae)*. *Flora Neotropica*, p. 1-102. ISSN 0071-5794.
- Marques CA 2001. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. *Floresta e Ambiente*, (1):195-206.
- Nonomura H. Ohara Y 1969. *The distribution of actinomycetes in soil*. VI. A selective plate culture isolation method for Microbispora and Streptosporangium strains Part I. *J. Ferm. Technol*, v. 47, p. 463-469.
- Parte A. *et al*. 2012. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria*. Springer Science & Business Media. ISBN 0387682333.
- Petrova D, Vlahov S 2013. *Taxonomic characterization of the thermophilic actinomycete strain 21E producer of thermostable Collagenase*.
- PLNSN SD, Siddalingeshwara K, Karthic J, Pramod T, Vishwanatha T 2014. *Antitumour property l-glutaminase on from aspergillus oryzae through submergrd fermentation*. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3(3):819-823.
- Rahman MA *et al*. 2014. *A novel low molecular weight endo-xylanase from Streptomyces sp. CS628 cultivated in wheat bran*. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 173, n. 6, p. 1469-80, ISSN 0273-2289.
- Riaz, M, Aamer AS, Abdul H, Fariha H 2010. "Characterization of lipase produced by *Bacillus* sp. FH5 in immobilized and free state." *Annals of Microbiology*, 60 (1):169-175.
- Rashad FM. *et al*. 2015. *Isolation and characterization of multifunctional Streptomyces species with antimicrobial, nematocidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt*. *Microbiol Res*, 175:34-47, ISSN 0944-5013.
- Rodrigues AAC, Bezerra NE, Coelho RS 2006. *Indução de resistência a Fusarium oxysporum f. sp. tracheiphilum em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada*. *Fitopatologia Brasileira*, 31(5):492-499.
- Shirling ET, Gottlieb D 1966. *Method for characterization of Streptomyces species*. *Int. J. Syst, Citeseer*.
- Sierra G 1957. *A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 23, n. 1, p. 15-22. ISSN 0003-6072 (Print) 0003-6072.
- Silva VMA. *et al*. 2015. *Atividade Enzimática de Actinobactérias do Semiárido (Enzymatic activity of actinobacteria from semiarid)*. *Revista Brasileira de Geografia Física*, v. 8, p. 560-572. ISSN 1984-2295.
- Stamford, NP, Santos, C 2008 (Ed.). *Microorganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura*. Guaíba: Agrolivros. p. 277-296.
- Stirling, D 2003. DNA extraction from fungi, yeast, and bacteria. *Methods Mol Biol*,226:53-54.
- Srinivasan MC, Laxman RS, Deshpande M 1991. *Physiology and nutritional aspects of actinomycetes: an overview*. *World J Microbiol Biotechnol*, 7(2):171-84.
- Ventura M. *et al*. 2007. *Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 71(3):495-548.
- Williams S. *et al*. 1983. *Numerical classification of Streptomyces and related genera*. *Microbiology*, 129(6):1743-1813.
- Williams S, Sharpe M, Holt J 1989. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 4. Williams and Wilkins, London.

## Enzimas extracelulares produzidas por *Colletotrichum* spp. isolados de frutíferas tropicais

Kelven Wladie dos Santos Almeida Coelho<sup>1</sup>, Pedro de Queiroz Costa Neto<sup>1,2</sup>, José Odair Pereira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>PPGCAN/UFAM – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Amazonas

<sup>2</sup>FCA/UFAM – Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas

Emails: kelvenwladie@gmail.com, senaneto16@yahoo.com.br, joseodairpereira@yahoo.com.br

### Resumo

Enzimas são compostos biológicos com função de catabolizar reações, ligadas diretamente com o metabolismo, de quaisquer que sejam os organismos. As de origem microbianas são de fácil aquisição, uma vez que se sabem as características de cultivo do micro-organismo do qual se busca isolar determinada enzima, este será uma ótima fonte de produção da mesma. O objetivo do estudo foi avaliar a produção de enzimas extracelulares por trinta fungos do gênero *Colletotrichum*, endófitos de frutíferas tropicais, sendo elas mangueira, cajueiro e goiabeira. As enzimas avaliadas foram lacase, pectinase, protease, celulase e amilase em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Foi realizada análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Foi observada atividade enzimática extracelular de protease em 29 isolados, celulase em 28, lacase em 20 e atividade mínima de pectinase em três isolados. Não foi observada atividade extracelular de amilase em nenhum isolado. Os melhores halos de degradação enzimática foram expressos pelos isolados M3 de mangueira, C10 de cajueiro, G2, G4, G6, G9 e G10 de goiabeira, todos para lacase.

**Palavras-chave:** Excreção, lacase, metabólitos.

### Introdução

A utilização de microrganismos para a produção de compostos orgânicos de interesse industrial e biotecnológico vem se desenvolvendo significativamente ao passar dos anos. Seguindo essa linha, fungos endofíticos de diversas espécies vegetais tomam a frente, por apresentarem grande potencial em diversas áreas da Biotecnologia; uma delas é a tecnologia de enzimas.

As enzimas são proteínas essenciais para o sistema metabólico de todos os organismos vivos e têm um papel importante na degradação da matéria orgânica, na infecção do hospedeiro e na deterioração dos alimentos. Nas vias metabólicas, agem em sequências organizadas de rotas catabólicas e anabólicas (Lehninger, 2002).

A utilização de enzimas nas indústrias é indispensável, pois através do seu emprego, pode-se aperfeiçoar a qualidade de um produto ou tornar mais fácil a produção do mesmo. Isso se deve ao fato de que as enzimas atuam diretamente nas substâncias que compõem um determinado produto, onde cada uma tem um substrato de atuação específico (Lima *et al.*, 2001).

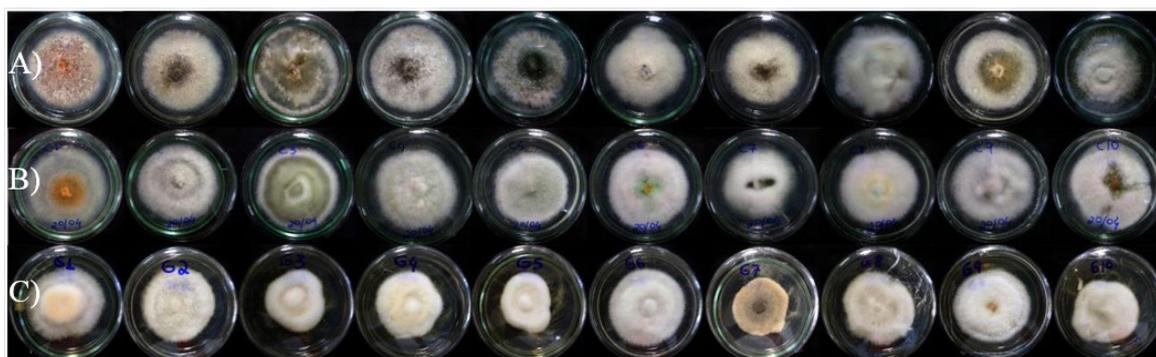
Os microrganismos são a fonte mais recorrida para a obtenção de enzimas por apresentarem baixo custo na produção, além de ser possível produzi-las em larga escala (Pandey *et al.*, 2005).

Microrganismos endofíticos, que colonizam tecidos das plantas, produzem enzimas hidrolíticas extracelulares como mecanismos de resistência para ultrapassar as defesas do hospedeiro que impedem a invasão microbiana e/ou para obter nutrientes do solo (Tan e Zou, 2001). Dentre essas enzimas, podemos citar pectinases, esterases, celulases, lipases dentre outras (Petrini *et al.*, 1982). Estudos de microrganismos endofíticos de plantas tropicais têm recebido muita atenção, devido à diversidade e grande potencial como fonte de compostos bioativos e pelos benefícios que podem proporcionar às plantas (Photita *et al.*, 2001).

O objetivo deste trabalho foi avaliar qualitativamente a produção de enzimas extracelulares por fungos endofíticos do gênero *Colletotrichum* isolados de mangueira, cajueiro e goiabeira através de ensaio em meio sólido e indicar os melhores produtores das enzimas avaliadas.

## Material e Métodos

Foram utilizados trinta fungos endofíticos de folhas de mangueira, cajueiro e goiabeira. Os fungos foram reativados (Figura 1) em meio de cultivo BDA (infusão de 200 g de batata, 15 g de dextrose e 15 g de ágar, diluídos em água destilada para 1 L – pH 6,8) acrescido do antibiótico cloranfenicol (50 µg/mL), para inibir o crescimento de bactérias, mesmo meio de cultivo que foi utilizado para o isolamento. As placas de Petri foram incubadas em estufa B.O.D. por sete dias. Todos os fungos utilizados pertencem à Coleção de Culturas do Laboratório de Princípios Bioativos de Origem Microbiana da Faculdade de Ciências Agrárias da UFAM.



**Figura 1.** Aspectos das colônias dos fungos endofíticos após sete dias de cultivo em meio BDA, onde na fileira A) endófitos de mangueira; B) endófitos de cajueiro; e C) endófitos de goiabeira.

Para avaliar a atividade de lacase foi utilizado o protocolo descrito por Santos (2007), com modificações. O meio de cultivo para avaliação dessa atividade foi composto por 20 g de ágar acrescido de 0,5% (p/v) de ácido gálico, 15 g de extrato de malte e 1 g de peptona em 1 litro de água destilada. As placas foram incubadas a 25 °C por cinco dias, no escuro. A atividade da enzima lacase foi detectada pela formação de um halo marrom ao redor das colônias.

A atividade de pectinase foi avaliada conforme a metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis (1975). Os isolados foram repicados para meio de cultura sólido composto de 500 mL de solução mineral (2 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 mg de  $\text{CaCl}_2$ , 10 µg de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 10 µg de  $\text{MnSO}_4$ , 70 µg de  $\text{ZnSO}_4$ , 50 µg de  $\text{CuSO}_4$ , 10 µg de  $\text{MoO}_3$ ) mais 500 mL de solução de pectina (1 g de extrato de levedura, 15 g de ágar, 5 g de pectina cítrica) com pH 7. As colônias foram incubadas por cinco dias a 25 °C, no escuro. Após esse período, o halo de degradação formado por uma região translúcida ao redor da colônia foi revelado com aplicação de vermelho de metila (2%).

Para avaliar a atividade da protease foi adotada a metodologia de Hankin e Anagnostakis (1975), modificado. Os isolados foram repicados para placas de Petri contendo meio solidificado composto por 5 g de peptona, 3 g de extrato de levedura, 1 g NaCl, 15 g de ágar, 0,4 g gelatina e 1 litro de água destilada, com pH 6. As colônias foram incubadas por 72 horas a 25 °C, no escuro. Após este período, o halo, caracterizado por uma região amarelada ao redor da colônia, foi revelado por meio da aplicação de 10 mL de vermelho de metila (2%) em cada placa.

A atividade da celulase foi avaliada a partir do cultivo em placas de Petri contendo ágar carboximetilcelulose (1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,5 g de asparagina, 0,5 de KCl, 0,2 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g de  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 g de extrato de levedura, 10 g de carboximetilcelulose, 20 g de ágar, 1 litro de água destilada). As colônias foram incubadas por cinco dias a 25 °C, no escuro, e em seguida submetidas a choque térmico por 16 horas a 50 °C. Após esse período, foi adicionado 10 mL de solução corante de vermelho

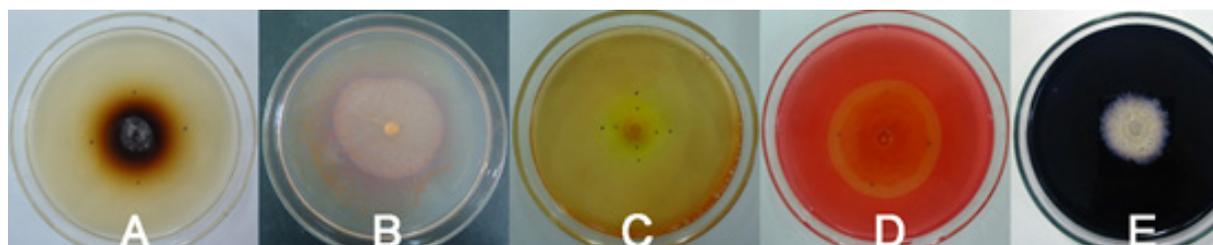
congo (2,5 g/L) em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8. Após 30 minutos a solução foi descartada e as culturas lavadas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M neste mesmo tampão, visando revelar o halo claro e estreito de degradação da celulose ao redor da colônia (Pereira, 2009).

A atividade da amilase foi avaliada a partir do cultivo em placas de Petri contendo meio mínimo, no qual a glicose foi substituída por amido (6 g de NaNO<sub>3</sub>, 1,5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g de KCl, 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,01 g de FeSO<sub>4</sub>, 0,01 g de ZnSO<sub>4</sub>, 10 g de amido, 15 g de ágar, 1 litro de água destilada, pH 6,8). As colônias foram incubadas a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 horas. Após cinco dias de cultivo foi aplicado em cada placa 2 mL de solução lugol (5 g de KI, 1 g de iodo, 100 mL de água destilada), sobre a superfície do meio de cultura. Após dez minutos, a solução lugol foi descartada e avaliada a atividade amilolítica, caracterizada pela formação de halo claro circundado por uma zona azulada ao redor da colônia (Pereira, 2009).

Os halos de atividade enzimática foram mensurados perpendicularmente. O delineamento estatístico para avaliação da atividade enzimática foi o inteiramente casualizado (DIC) com três repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância e foi aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação das médias.

## Resultados e discussão

Entre os endófitos de mangueira (Tabela 1), o isolado M3 apresentou o maior halo (Figura 2) para lacase, com 16,08 mm. Para pectinase, apenas três endófitos apresentaram atividade mínima, variando de 4,25 a 5,08 mm. O maior valor encontrado para protease foi de 6,25 mm, expressado pelo M1, enquanto os demais ficaram com média de 5,0 mm. Para celulase, foram observados valores variando de 1,0 a 4,4 mm. A atividade amilolítica foi observada de forma intracelular, ou seja, não houve halo enzimático, porém, foi observada atividade da enzima na área interna da colônia.



**Figura 2.** Halos de atividade enzimática expressos pelos isolados M3, M4, M1, M8 e M1 endófitos de mangueira, respectivamente em A) lacase; B) pectinase; C) protease; D) celulase e E) amilase

**Tabela 1.** Médias dos halos enzimáticos (mm) dos endófitos de mangueira

Endófitos	Lacase	Pectinase	Protease	Celulase	Amilase
M1	-	-	6,25 a	1,60 cd	*
M2	-	-	5,75 a	4,00 ab	*
M3	16,08 a	5,00 a	4,33 a	2,75 bc	*
M4	-	5,08 a	5,58 a	3,91 ab	*
M5	-	-	5,66 a	1,08 d	*
M6	7,0 b	4,25 a	5,00 a	3,75 ab	*
M7	-	-	5,50 a	4,41 a	*
M8	6,69 b	-	5,83 a	4,33 a	*
M9	10,25 b	-	5,83 a	3,41 ab	*
M10	-	-	-	-	*
CV (%)	18,07	16,64	15,35	14,01	nd

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

(-) Não houve atividade; (\*) Não houve atividade extracelular; (nd) Não determinado

Entre os endófitos de cajueiro (Tabela 2), os isolados C10, C8, C3 e C2 se destacaram na produção de lacase com 15,75, 14,08, 13,87 e 12,91 mm, respectivamente. Não foi observada atividade pectinolítica. A atividade proteolítica apresentou os maiores halos enzimáticos (Figura 3), o C1 apresentou halo de 33,13 mm, enquanto os demais variaram de 25,06 a 29,38 mm, indicando o potencial biotecnológico destes endófitos para produção desta enzima. Para celulase os valores variaram de 2,66 a 3,42 mm. A atividade observada para amilase também foi intracelular.

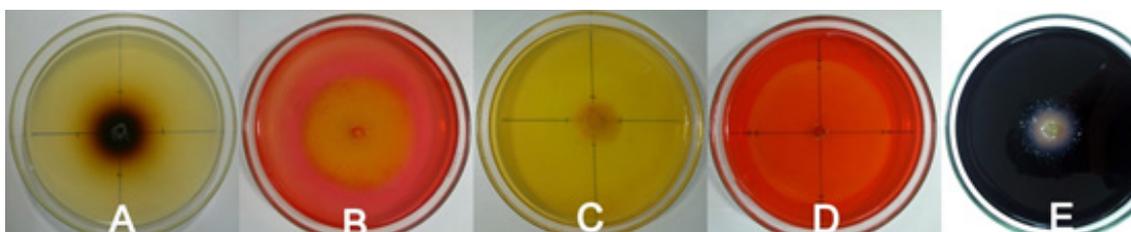
Dos endófitos de goiabeira (Tabela 3), nove apresentaram halo para lacase variando de 11,25 mm ao maior produzido pelo isolado C9 com 19,0 mm. Não houve atividade pectinolítica. A atividade celulolítica variou de 0,83 a 4,08 mm enquanto para protease, o maior halo (Figura 4) foi observado para o isolado G4 com 21,83 mm. Também foi observada apenas atividade intracelular para amilase.

**Tabela 2.** Médias dos halos enzimáticos (mm) dos endófitos de cajueiro

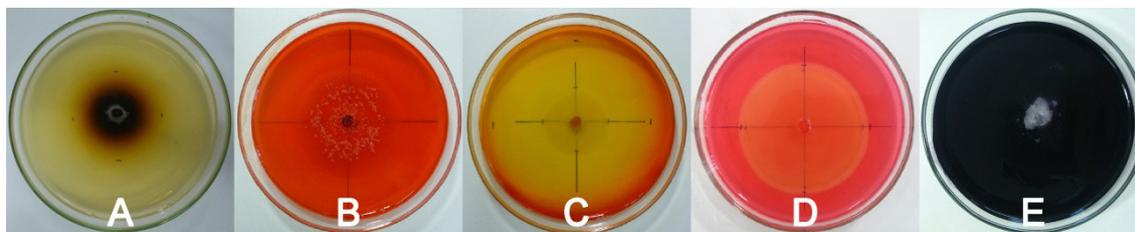
Endófitos	Lacase	Pectinase	Protease	Celulase	Amilase
C1	-	-	33,13 a	-	*
C2	12,91 a	-	29,38 b	3,41 a	*
C3	13,87 a	-	25,66 c	3,41 a	*
C4	9,50 b	-	27,07 bc	3,00 a	*
C5	-	-	26,48 bc	3,50 a	*
C6	-	-	26,49 bc	3,08 a	*
C7	6,25 c	-	28,27 d	2,83 a	*
C8	14,08 a	-	26,28 bc	2,75 a	*
C9	-	-	26,86 bc	2,66 a	*
C10	15,75 a	-	25,79 c	3,16 a	*
C.V. (%)	9,06	-	4,66	13,47	nd

As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

(-) Não houve atividade; (\*) Não houve atividade extracelular; (nd) Não determinado



**Figura 3.** Halos de atividade enzimática expressos pelos isolados C10, C1, C1, C2 e C1 endófitos de cajueiro, respectivamente em A) lacase; B) pectinase; C) protease; D) celulase e E) amilase



**Figura 4.** Halos de atividade enzimática expressos pelos isolados G9, G1, G4, G1 e G1 endófitos de goiabeira, respectivamente em A) lacase; B) pectinase; C) protease; D) celulase e E) amilase

**Tabela 3.** Médias dos halos enzimáticos (mm) dos endófitos de goiabeira

Endófitos	Lacase	Pectinase	Protease	Celulase	Amilase
G1	16,50 a	-	12,75 b	4,08 a	*
G2	15,50 a	-	4,25 c	2,58 cde	*
G3	4,66 ab	-	12,33 b	2,00 de	*
G4	16,58 a	-	21,83 a	2,95 bcde	*
G5	11,25 bc	-	13,16 b	3,33 abc	*
G6	19,83 a	-	13,75 b	1,91 e	*
G7	4,91 c	-	10,16 b	0,83 f	*
G8	13,91 ab	-	14,58 b	3,33 abc	*
G9	19,00 a	-	13,75 b	3,00 bcd	*
G10	18,25 a	-	13,33 b	4,00 ab	*
C.V. (%)	18,23	-	13,25	13,10	nd

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

(-) Não houve atividade; (\*) Não houve atividade extracelular; (nd) Não determinado

Os fungos do gênero *Colletotrichum* são frequentemente citados como produtores de enzimas extracelulares. Sunitha *et al.* (2013) isolaram fungos deste gênero das plantas medicinais *Alpinia calcarata* Roscoe, *Calophyllum inophyllum* L., *Bixa orellana* L., e *Catharanthus roseus*, onde observaram atividade de amilase, celulase, pectinase, protease, lipase e lacase. Num estudo realizado por Patil *et al.* (2015) utilizando *Colletotrichum* sp. isolado de *Piper betle*, não foi observada atividade qualitativa para amilase, protease e lipase, porém foi detectada atividade mínima em ensaio quantitativo.

No estudo executado por Toghueo *et al.* (2017) avaliando três espécies de *Colletotrichum*, foi observada atividade em apenas duas para amilase, celulase e lipase, enquanto que a atividade de lacase não pode ser determinada. No estudo realizado por Silva *et al.* (2006), que avaliaram a produção de protease, amilase, celulase e lipase, foi observada apenas atividade lipolítica expressa por dois *Colletotrichum* sp. isolados de pinha e graviola. Lima (2000) observou que um período de incubação superior a dez dias favoreceu a atividade de amilase em todos os isolados de *C. graminicola* testados, o que pode ter influência no presente estudo, onde o período de incubação foi de apenas cinco dias.

Neste trabalho, foi observada maior frequência de atividade para protease. Couto (2002) também verificou que *C. musae* obtidos de bananeira demonstraram maior atividade para protease. Para celulase, as linhagens endofíticas investigadas apresentaram atividade mínima, corroborando com Tozze Júnior (2012) que observou atividade mínima de celulase em 92 dos 93 isolados testados. Cruz (2014) observou atividade pectinolítica em todos os isolados; diferenciando-se deste trabalho onde apenas três endófitos de mangueira apresentaram atividade mínima.

É preciso considerar os diversos fatores que podem influenciar na excreção de enzimas extracelulares por fungos endofíticos, uma vez que o substrato pode influenciar na produção de determinada enzima por ser de fácil ou difícil degradação. Outros fatores como pH, temperatura, luminosidade e tempo de incubação também podem influenciar.

## Conclusão

Os fungos endofíticos do gênero *Colletotrichum* isolados de mangueira, cajueiro e goiabeira produzem enzimas de interesse biotecnológico, visto que apresentaram os melhores valores para lacase e protease, e também que possuem um potencial a ser melhorado em trabalhos futuros na busca por metodologias que otimizem ao máximo a produção destas enzimas.

## Agradecimentos

À FAPEAM e ao CNPq pelo apoio à pesquisa.

## Referências

- Couto EF 2002. *Estudo comparativo de isolados de Colletotrichum musae através de caracteres patogênicos, enzimáticos, fisiomorfológicos e molecular*. (Dissertação de Mestrado). Recife. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 87p.
- Cruz AV 2014. *Características morfo-culturais e moleculares de isolados de Colletotrichum guaranicola Albuquerque, procedentes do Estado do Amazonas*. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 106p.
- Hankin L, Anagnostakis, SL 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67(3): 597-607.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM 2002. *Princípios de Bioquímica*. 3a Ed. São Paulo: Sarvier, 975p.
- Lima MLF 2000. *Caracterizações patogênica, fisiológica e enzimática de isolados de Colletotrichum graminicola (Ces) G.W. Wilson, agente causal da antracnose do milho, Zea mays L.* Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco, 87p.
- Lima UA, Aquarone E, Borzani W, Schmidell W 2001. *Biotechnology industrial: Processos fermentativos e enzimáticos*, v. 3, Ed. Edgar Blücher, São Paulo, 593p.
- Pandey A, Webb C, Soccol CR, Larroche C 2005. *Enzyme technology*. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc. 760p.
- Patil MG, Pagare J, Patil SN, Sidhu AK 2015. Extracellular enzymatic activities of endophytic fungi isolated from various medicinal plants. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(3): 1035-1042.
- Pereira WV 2009. *Caracterização e identificação molecular de espécies de Colletotrichum associadas à antracnose da goiaba no Estado de São Paulo*. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 79f.
- Petrini O, Stone J, Carroll FE 1982. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: A preliminary study. *Canadian Journal of Botany*, 60(6): 789-796.
- Photita W, Lumyong S, Lumyong P, Hyde KD 2001. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. *Mycological Research*, 105(12): 1508-1513.
- Santos ES 2007. *Microrganismos promissores para degradação de compostos fenólicos presentes em bagaço de cana de açúcar, iodo e águas residuais de agroindústrias sulcro-alcooleiras*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 112p.
- Silva RLO, Luz JS, Silveira EB, Cavalcante UMT 2006. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: Isolamento, caracterização enzimática e promoção de crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). *Acta Botânica*, 20(3): 649-655.
- Sunitha VH, Nirmala Devi D, Srinivas C 2013. Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. *World Journal of Agricultural Sciences*, 9(1): 01-09.
- Tan RX, Zou WX 2001. Endophytes: A rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*, 18(4): 448-459.
- Toghueo RMK., Zabalgoceazcoa I, Vázquez ABR, Boyom FF 2017. Enzymatic activity of endophytic fungi from the medicinal plants *Terminalia catappa*, *Terminalia mantaly* and *Cananga odorata*. *South African Journal of Botany*, 109(3): 146-153.
- Tozze Júnior HJ 2012. *Antracnose do abacateiro: Danos pós-colheita, caracterização do agente casual, quantificação de parâmetros da pré-penetração e monocíclicos e controle químico*. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 124p.

## Identificação do *Streptomyces* CBA-61 usando o gene 23S e 16S rRNA

Maylle Rebelo Marcolino<sup>1</sup>, Ingrid Reis da Silva<sup>2</sup>, Rudi Emerson de Lima Procópio<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Escola Superior de Ciências da Saúde, Pós-Graduação em Biotecnologia E Recursos Naturais, Av. Carvalho Leal 1777 Manaus- Amazonas, Brasil

<sup>2</sup> Centro de Biotecnologia da Amazônia- CBA, Av. Danilo Areosa 690 Manaus- Amazonas, Brasil  
E-mail: mrm.med16@uea.edu.br

### Resumo

O gênero *Streptomyces* é composto por bactérias gram-positivas extremamente importantes para a área da saúde devido a produção de antibióticos, antitumorais, anti-hipertensivos, além de produzir outros compostos bioativos como as enzimas. Este gênero é responsável pela produção da maior parte dos antibióticos utilizados atualmente. O isolado CBA-61 do gênero *Streptomyces*, foi caracterizado como um importante produtor de antibiótico, com ampla atividade contra bactérias Gram positivas e *Mycobacterium*. Por isso, sua identificação correta em nível de espécie, para comparação com outros *Streptomyces* produtores de antibiótico é importante. Este gênero, por ser complexo, faz com que sua identificação taxonômica necessite de pelo menos dois genes e por isso, foram usados os genes 16S e 23S rRNA. Ambas as sequências indicaram que o isolado CBA-61 está filogeneticamente próximo ao *S. collinus* Tü 365 que é uma estirpe de *Streptomyces*, produtora do antibiótico kirromicina, um inibidor da biossíntese de proteínas interagindo com o fator de alongação EF-Tu, bloqueando a síntese de proteína.

**Palavras-chave:** *Streptomyces*; antibiótico; identificação; 23S rRNA

### Introdução

O gênero *Streptomyces* é composto por bactérias gram-positivas, extremamente importantes para a área da saúde devido a produção de antibióticos, antitumorais, anti-hipertensivos, além de outros compostos bioativos, principalmente através dos seus metabólitos secundários. Este gênero tem sido analisado há muitos anos e são responsáveis pela produção da maior parte dos antibióticos utilizados (Procópio *et al.*, 2012). Com o passar do tempo, a resistência bacteriana tem aumentado e se faz necessária a produção de antibióticos mais eficazes. Essas bactérias são amplamente estudadas e apresentam uma distribuição complexa, considerando seu comportamento biológico diferente de outras gram-positivas (Omura *et al.*, 2001). Como forma de estudá-las, faz-se necessário sua correta divisão taxonômica. Muitos estudos têm sido feitos sobre a filogenia desse gênero, no entanto, ainda faltam muitos dados para a formação de uma árvore robusta e bem elaborada para o gênero *Streptomyces* (Chaves *et al.*, 2017). A forma tradicional de classificação tem sido a utilização do gene 16S de rRNA, mas é considerada pouco realista quanto às relações entre as espécies (Alam *et al.*, 2010). O antibiótico produzido pelo isolado CBA-61 do gênero *Streptomyces* foi caracterizado apresentando ampla atividade contra bactérias Gram positivas e *Mycobacterium smegmatis* de acordo com Silva (2016), mas ainda necessita de uma identificação correta a nível de espécie, para comparação com outros *Streptomyces* produtores de antibióticos. Os métodos de identificação de microrganismos utilizados apresentam grande limitação, principalmente para o gênero *Streptomyces*. Estudos demonstram uma perspectiva positiva quanto ao uso do gene 23S para o estudo filogenético deste gênero (Chaves *et al.*, 2017). O 23S tem se mostrado excelente para a identificação de *Streptomyces*. Por isso este trabalho tem por objetivo identificar o isolado CBA-61 por técnicas moleculares, utilizando o gene 23S rRNA e comparar com o 16S rRNA, para a identificação mais correta destas importantes bactérias.

### Material e métodos

O trabalho foi realizado no laboratório de biotecnologia do Programa do Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (PPGMBT) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA). Na Escola Superior de Ciências da Saúde (ESA), localizada na Av. Carvalho Leal, 1777, bairro Cachoeirinha.

O isolado CBA-61 foi inoculado em 5 mL de Caldo Triptona Soja – TSB (Himedia) e incubado por 18 horas a 28 °C. Após esse período, a cultura bacteriana foi colocada em tubo de 1,5 mL, centrifugada por 5 min a 9700 g, e em seguida o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuscitado em 500 µL de TE (10mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA pH 8,0) sendo adicionados 30 µL de SDS 10%, mais 0,5 g de sílica com agitação no “bead beating” (Biospec products) por 30 seg. Após a agitação foi adicionado 500 µL de fenol saturado, homogeneizado e centrifugado (9700 g por 10 min). A fase superior foi transferida para um novo tubo e acrescido de 6 µL de RNase (RNase 10 mgmL<sup>-1</sup> em 10mM Tris-HCl pH 8,0; 15mM NaCl), sendo incubado por 30 min a 37 °C. A esta suspensão foram adicionados 200 µL de fenol e 200 µL de clorofórmio, homogeneizando-a por inversão e posteriormente centrifugada a 9700 g por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 0,1 volume de NaCl 5M e 0,6 volume de isopropanol, incubado por 5 min a temperatura ambiente e em seguida centrifugado por 10 min a 9700 g. O sobrenadante foi descartado, o DNA lavado com 400 µL de etanol 70% e centrifugado por 2 min a 9700 g. O sobrenadante foi removido, o DNA seco a 37 °C, ressuscitado em 50 µL de água Milli-Q e estocado a -20 °C.

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50µL, contendo 5 µL (10 ng) de DNA molde; 0,2 µM do primer 27f (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e do primer 1378r (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG-3') para o 16S e do primer F1067 (5'-GGGGATAAGCTCCATGGTTCG3') e R2192 (5'-AAGTTCTCAGCTTCGCCAC-3') para o 23S: 200µM de cada dNTP (Gibco BRL); 3,75 mM de MgCl e 2U de Taq DNA polimerase (Gibco BRL). Em todos os experimentos foi adicionada uma reação sem DNA como controle negativo. Foi utilizado termociclador (Gene AMP PCR System 9700) programado para gerar uma desnaturação inicial de 4 min a 94°C, 2 ciclos a 94°C, 1 min a 60°C, 1 min a 72°C, 2 min; mais 2 ciclos a 94°C, 1 min; 59°C, 1 min; 72°C; 2 min; mais dois ciclos a 94°C, 1 min, 58°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais dois ciclos a 94°C, 1 min; 57°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais 2 ciclos a 94°C, 1 min; 56°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais 20 ciclos a 94°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 2 min e uma extensão final de 10 min a 72°C. Foi utilizados 5 µL da reação para a observação em gel de agarose (1,2%) de um fragmento de aproximadamente 1350 pb para o 16S e 1000pb para o 23S. Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados com o Kit GFX (Amersham Pharmacia) e seqüenciados.

Para cada reação de sequenciamento foram usados aproximadamente 150 ng de DNA, 0,4 uL de TRR Mix (BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit), 5 pmoles de primer 27f (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') para o 16S, e o primer F1067 (5'-GGGGATAAGCTCCATGGTTCG3') para o 23S, acrescido de tampão 2,5x (200mM Tris-HCl pH 9,0 e 5 mM MgCl<sub>2</sub>) em um volume final de 10 uL. A reação para sequenciamento foi realizada no termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Perkin-Elmer), em um programa constituído por 30 ciclos de 96°C por 10 segundos, 52°C por 20 segundos e 60°C por 4 minutos. O produto da amplificação foi corrido no sequenciador automático ABI 3100 e selecionadas quanto à resolução das bases identificadas. Seguindo a metodologia de Kullen *et al.* (2000) e Clarridge (2004).

As seqüências obtidas foram analisadas pelo BLASTn contra a base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information website* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)). A árvore filogenética foi construída com base na seqüência do gene rRNA obtidos. Para o alinhamento das seqüências foi utilizado o programa *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Em seguida, as seqüências foram submetidas aos programas MEGA 6 (<https://www.megasoftware.net/>), e construído a árvore filogenética. Todas as seqüências obtidas foram depositadas no banco de dados da coleção de cultura do UEA.

## Resultados e Discussão

Após o sequenciamento de ambos os genes, foi possível obter aproximadamente 700pb com boa qualidade, como pode ser visto na Tabela 1. Atualmente seqüências de DNA tem sido a forma mais segura de identificar os organismos, principalmente bactérias, devido suas características morfológicas serem muito semelhantes.

O uso de seqüências de DNA tem sido considerado um caminho promissor para os estudos taxonômicos e filogenéticos dos *Streptomyces*, uma filogenia mais fina e robusta para o *Streptomyces* CBA-61 foi construída (Figuras 1 e 2). Comparando as árvores filogenéticas derivadas dos dados das seqüências do 16S e do 23S, indica que este isolado pode pertencer à espécie *S. collinus* como pode ser visto nas figuras 1 e 2.

Tabela 1. Sequências de DNA dos genes 16S e 23S rRNA.

<p><b>CBA-61 gene 16S rRNA</b>                  TTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTAATCCCCAGGCGGGGAACCTTAATG                  CGTTAGCTGCGGCACCACGACGTGGAATGTCGCCAACACCTAGTTCCACCAGGTTTACGGCGTGGACTACC                  AGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTAATGGCCAGAGATCCGCCTT                  CGCCACCGGTGTTCCCTCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCAGGAATCCGATCTCCCTACCACA                  CTCTAGCTAGCCCGTATCGACTGCAGACTCGGGTTAAGCCCGAGCTTTCACAATCGACGTGACAAGCCG                  CCTACGAGCTCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC                  GTAGTTACGCTTCTTCGACAGTACCGTCACTTTCGCTTCTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAG                  GCCGTCATCCCTCAGCGGGCTCGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGCAATATTCCTCCACTGCTGCCTC                  CCGTAGGAGTCTGGCCGTGCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTTCGCCCTCAGGCGGGCTACCCGTCGTCG                  CCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACAAGCTGATAGGCCGCGGGCTCATCTGCACCGCCGAGCTTTACA                  CCATCAAGGATGCCAAGATGGTCATATCCGGTATTAGACCCCGTTTCAGGGGCTTGTCCAGAGTGCAGG                  GCAGATTGCCCA</p> <p><b>CBA-61 gene 23S rRNA</b>                  CCCGCGGTCCCTTACGTTACGACACCGGGCAGGCGTACGTCCGTATACATCGCCTTACGGCTTCCACGGACC                  TGGTTTTTAGTAAACAGCCTTCTCGCTGGTCTCTGCGGCCACCCAGCTCAGGAGTAAATCCCATCCCGA                  GGTGGCCCCCTTCTCCCGAAGTTACGGGGGCATTTTGCAGGTTCCCTTAACCATAGTTTACCCGAAACGCC                  TCGGTATTCTTACCTGACCACCTGAGTCCGTTAGGTTAGGGTACGGGCGCCATGAAACTCGTAGAGCTTTTC                  TCGACAGCATAGGATCATCCACTTACCACAATCGGCTCGGCATCAGGTCTCAACTAATAGGGGATTTAC                  CTACCGCCTACACCTTACCCCGGGACAACCACCGCCGGGATGGACTACCTTCTGCGTCCCCCATCAC                  TCACCTACTAACCGCTTGGTTACGCGGCTCCACCCTCCCTCAACTCCGAAGAGATCAGGGCGGTTCCGG                  CCTTAGCATCAGATGCTCGATGTTTACGCTTACAGCGGGTACCCGGAATATCAACCGGTTATCCATCGA                  CTACGCTTTCGCGCTCGCCTTAGGTCCCGACTTACCTGGGCAGATCAGCTTGACCCAGGAACCTTAGT                  CAATCGGGCACACGTTTCTCACGTGTGTATCGCTACTCATGCCTGCATTCTCACTCGTCA</p>
--

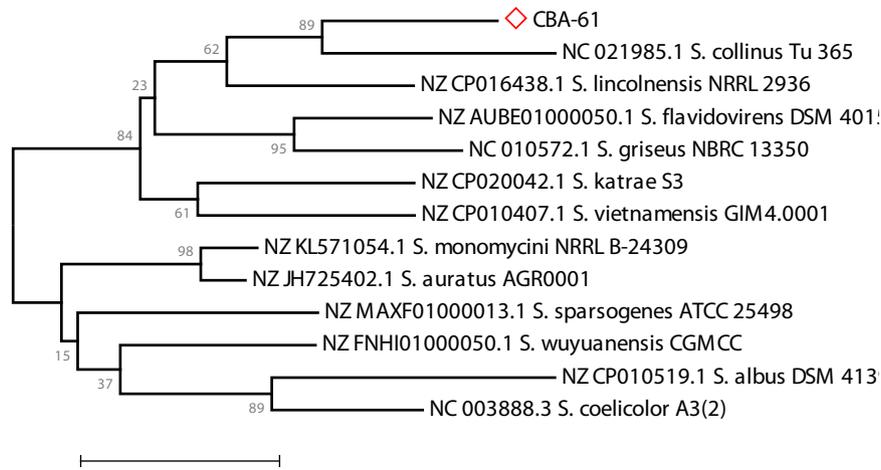


Figura 1. Relações filogenéticas entre 12 linhagens padrões de *Streptomyces*, e o isolado CBA-61 baseadas nas sequências do gene 16S rRNA. A árvore foi construída usando o método NJ. Os números indicam a porcentagem do *bootstrap*. A barra indica 1% de divergência das sequências estimada.

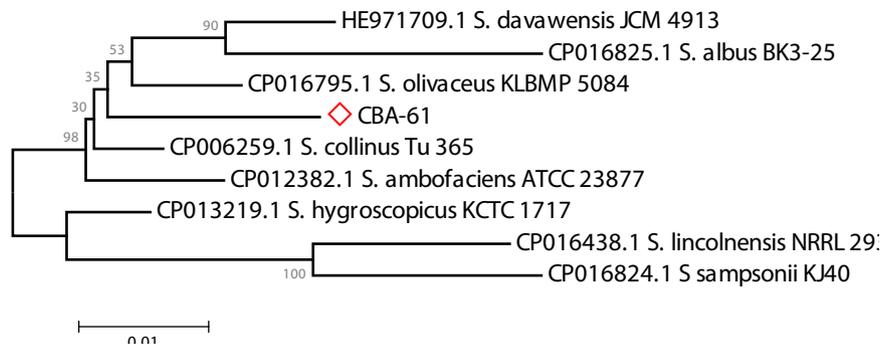


Figura 2. Relações filogenéticas entre 8 linhagens padrões de *Streptomyces*, e o isolado CBA-61 baseadas nas sequências do gene 23S rRNA. A árvore foi construída usando o método NJ. Os números indicam a porcentagem do *bootstrap*. A barra indica 1% de divergência das sequências estimadas.

O isolado CBA-61 apresentou similaridade com o *S. collinus* Tü 365, que é uma estirpe de *Streptomyces*, isolada em 1972 de Kouroussa (Guiné). É mais conhecido como produtor do antibiótico kirromicina, um inibidor da biossíntese de proteínas interagindo com o fator de alongamento EF-Tu, um alvo molecular para o antibiótico (Rückert *et al.*, 2013; Iftime *et al.*, 2016). A ligação da Kirromicina inibe o deslocamento conformacional que a EF – Tu, normalmente sofre quando o GTP é hidrolisado em GDP. Isso evita a dissociação da EF – Tu do complexo ribossômico e, portanto, bloqueia a tradução (Laiple *et al.*, 2009). Esforços têm sido feitos para determinar uma filogenia abrangente, detalhada e robusta de *Streptomyces* usando filogenias baseadas em genes únicos e genomas. Filogenias do grupo atualmente disponíveis são baseadas em 16S rRNA, tais reconstruções tendem a ser relativamente instáveis e não reflete a história evolutiva geral em um grupo complexo com generalizada transferência horizontal de genes (Alam *et al.*, 2010). Apesar da disponibilidade atual de quase todas as seqüências do gene 16S rRNA de cepas do tipo *Streptomyces* em bancos de dados públicos, disponibilizadas por pesquisadores de vários países, muitas relações de espécies dentro de *Streptomyces* permanecem obscuras. O gênero *Streptomyces* tornou-se um dos grupos taxonomicamente mais complexos. A maioria dos membros deste grupo compartilha fenótipos e seqüências 16S rRNA altamente similares, com a maioria das espécies compartilhando seqüências do gene 16S rRNA idênticas ou altamente similares e fenótipos semelhantes (Guo *et al.*, 2008; Rong e Huang, 2010). Por isso, a necessidade de utilização de outros genes para a confirmação da espécie. No entanto, foi observado que as árvores baseadas na análise genômica e as árvores do gene 23S rRNA são similares, mostrando que as seqüências do 23S rRNA também são úteis na diferenciação entre *Streptomyces* spp (Chaves *et al.*, 2017). O 23S rRNA também mostrou que o isolado CBA-61 é similar ao *S. collinus* Tü 365, confirmando a identificação do 16S rRNA. Compreender a extensão da diversidade genética e funcional entre cepas da mesma espécie ou espécies muito relacionadas se tornou uma questão fundamental para a sistemática bacteriana segundo Koeppel *et al.* (2008) e Penn *et al.* (2009), principalmente para um gênero tão importante quanto o *Streptomyces*.

## Conclusão

Através do sequenciamento das regiões 16S e 23S rRNA foi possível indicar que o isolado CBA-61 está filogeneticamente próximo ao *S. collinus* Tü 365, que é uma estirpe de *Streptomyces*, produtora do antibiótico kirromicina, um inibidor da biossíntese de proteínas interagindo com o fator de alongação EF-Tu, bloqueando a síntese de proteínas.

## Referências

- Alam MT, Merlo ME, Takao E, Breitling R 2010. Genome-based phylogenetic analysis of *Streptomyces* and its relatives. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54:763–72.
- Chaves JV, Ojeda CPO, Silva IR, Procópio REL 2017. Use of 23S rRNA gene in phylogeny and taxonomic identification of *Streptomyces*. *Research Journal of Microbiology*, 13(1):13-20.
- Clarridge JE 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4):840–62.
- Guo Y, Zheng W, Rong X, Huang Y 2008. A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematic. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58(1):149–59.
- Iftime D, Kulik A, Härtner T, Rohrer S, Niedermeyer TH, Stegmann E, Weber T, Wohlleben W 2016. Identification and activation of novel biosynthetic gene clusters by genome mining in the kirromycin producer *Streptomyces collinus* Tü 365. *Journal of Industrial Microbiology and biotechnology*, 43(2-3):277-91.
- Koeppel A, Perry EB, Sikorski J, Krizanc D, Warner A, Ward DM, Rooney AP, Brambilla E, Connor N, Ratcliff RM, Nevo E, Cohan FM 2008. Identifying the fundamental units of bacterial diversity: a paradigm shift to incorporate ecology into bacterial systematics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7):2504–9.
- Laiple KJ, Härtner T, Fiedler HP, Wohlleben W, Weber T 2009. The kirromycin gene cluster of *Streptomyces collinus* Tü 365 codes for an aspartate- $\alpha$ -decarboxylase, KirD, which is involved in the biosynthesis of the precursor  $\beta$ -alanine. *The Journal of Antibiotics*, 62: 465-468.

- Omura S, Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Takahashi C, Shinose M, Takahashi Y, Horikawa H, Nakazawa H, Osonoe T, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M 2001. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (21): 12215-12220.
- Procópio REL, Silva IR, Martins MK, Azevedo JL, Araújo JM 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(5):466-71.
- Rong X, Huang Y 2010. Taxonomic evaluation of the *Streptomyces griseus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, with proposal to combine 29 species and three subspecies as 11 genomic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(3):696-703.
- Rückert C, Szczepanowski R, Albersmeier A, Goesmann A, Iftime D, Musiol EM, Blin K, Wohlleben W, Pühler A, Kalinowski J, Weber T 2013. Complete genome sequence of the kirromycin producer *Streptomyces collinus* Tü 365 consisting of a linear chromosome and two linear plasmids. *Journal of Biotechnology*, 168(4): 739-40.
- Silva IR 2016. *Caracterização de Compostos Antimicrobianos Produzidos por Streptomyces*. Manaus, Amazonas. (PhD Tese. Universidade Federal do Amazonas). 104f.

## Avaliação da viabilidade do método de preservação Castellanni na conservação de fungos filamentosos

Rosângela Santana Martins de Matos<sup>1</sup>, Ivanete Ferreira de Souza<sup>1</sup>,  
Ginarajadaça Ferreira dos Santos Oliveira<sup>1</sup>, Ingrid Reis da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA)  
Emails: rosangelamm42@gmail.com, ingridreis.alvrinho@gmail.com

### Resumo

As coleções microbiológicas são um importante patrimônio biológico, que se devidamente conservadas, podem servir de suporte para atividades de ensino e pesquisa. A escolha do método adequado de preservação depende do tipo de microrganismo em estudo, da infraestrutura do laboratório e dos objetivos do trabalho. Foi avaliada a viabilidade quanto ao método de preservação de 447 fungos filamentosos da coleção microbiológica do CBA. Dentre estes, 100 isolados de solo e 367 endofíticos. O método de preservação avaliado foi o de Castellani (água destilada autoclavada). Para avaliação da viabilidade, os fungos foram reativados em triplicatas em meio BDA com antibiótico. As características morfológicas, como coloração, pigmentos e aspecto da colônia foram observadas, bem como as estruturas fúngicas. Dos 447 fungos avaliados, 359 permaneceram viáveis em meio de cultura BDA. Em relação aos fungos de solo, a viabilidade foi de 75% após 4 anos de preservação. Os fungos endofíticos apresentaram viabilidade variada de acordo com o ano de preservação: 70% após 8 anos; 65% após 5 anos; 80% após 4 anos; 89% após 3 anos. Os aspectos macro e micromorfológicos das culturas viáveis foram avaliadas, sendo possível identificar isolados dos gêneros: *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Botrytis*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Xylaria*, *Pestalotia*, *Pestalotiopsis*, *Lasiodiplodia* e *Fomitopsis*.

**Palavras-chave:** Castellani, preservação, fungos.

### Introdução

O Brasil detém cerca de 20% da biodiversidade do planeta, principalmente na Amazônia. Essa grande variabilidade genética pode ganhar ainda mais valor quando devidamente organizada, identificada, classificada, documentada e disponível para acesso, sempre que houver demanda, seja ela para pesquisa ou aplicações tecnológicas (Da Silva *et al.*, 2011).

Os microrganismos constituem uma fonte quase inesgotável de produtos de importância biotecnológica. Na área industrial, vários processos biotecnológicos têm como objetivo a produção de compostos comerciais ou a transformação de substrato em produtos de maior valor agregado, tais como antibióticos (estreptomicina, penicilina). No setor agropecuário e de alimentos, destacam-se os microrganismos fixadores de nitrogênio, os empregados na produção de bebidas alcoólicas e sucos (vinho, cerveja, produção de pectinase), processamento de alimentos (queijo, iogurte, panificação), além do controle biológico de pragas e doenças (controle da lagarta da soja, da cigarrinha da cana de açúcar e outros) (Fungaro e Maccheroni Jr., 2002). Apresentam ainda uma grande vantagem para a produção de compostos de interesse comercial devido ao fato de serem cultivados em grande escala e seus compostos facilmente purificados. Essa imensa riqueza natural constitui um verdadeiro patrimônio científico, tecnológico e econômico, que precisa ser conhecido, preservado e explorado racional e criteriosamente (Demain e Sanchez, 2009).

As coleções biológicas são recursos estratégicos, fundamentais para o conhecimento e preservação da biodiversidade, que podem fazer parte da infraestrutura de pesquisa e inovação do país. As informações contidas nestas coleções são recursos-chave que o país precisa para o estabelecimento de estratégias rápidas e eficientes para o desenvolvimento científico e tecnológico (Dieuliisa *et al.*, 2016).

As coleções microbiológicas têm como principal função a aquisição, preservação, identificação, catalogação e distribuição de microrganismos autenticados para dar suporte à pesquisa científica, estudos

epidemiológicos, bem como ao desenvolvimento e produção de produtos e processos tecnológicos, na obtenção de extratos e moléculas bioativas, atuando também como provedores de serviços especializados (Da Silva *et al.*, 2011).

Os diferentes tipos de coleções sejam elas de trabalho, institucionais ou de serviço, têm uma importância destacada na conservação e exploração da diversidade genética e metabólica. O material biológico destas coleções é matéria-prima para a obtenção dos mais variados produtos biotecnológicos incluindo fármacos, alimentos, bebidas alcoólicas e ácidos orgânicos (Câmara, 2008).

Diversos métodos vêm sendo empregados para a preservação de fungos, porém, não existe um único método que seja capaz de preservá-los de forma adequada e generalizada (Girão *et al.*, 2004). A escolha do melhor método deve ser baseada nas características dos microrganismos em estudo, assim como pelas vantagens e desvantagens de cada método (Sola *et al.*, 2012). Com o objetivo de conservar a biodiversidade Amazônica, 428 fungos filamentosos da coleção microbiológica do Centro de Biotecnologia da Amazônia foram avaliados quanto à viabilidade e eficiência da técnica de Castellani como método de preservação.

## Material e Métodos

Os isolados utilizados neste estudo foram obtidos da Coleção Microbiológica do Laboratório de Bioprospecção (LAPROSP) do Centro de Biotecnologia da Amazônia - CBA (Manaus/Am) e estavam conservados em água destilada. A preservação em água destilada, também conhecida como método de Castellani, consiste em armazenar pequenos discos do fungo com meio em frascos de vidro contendo água destilada esterilizada (Passador *et al.*, 2010). Foram selecionados 467 fungos, destes, 367 são endofíticos, isolados a partir de plantas da região Amazônica e 100 isolados de solo.

Os isolados selecionados foram reativados em triplicata em meio ágar batata dextrose (BDA), previamente vertidos em placas de petri, incubados a 28°C para favorecer a multiplicação e posterior preservação pela técnica de Castellani e óleo mineral.

As características macroscópicas, como coloração do micélio aéreo, pigmentos difusos no meio e aspecto das colônias foram analisadas com base nas informações catalogadas da coleção. As características morfológicas foram analisadas pela técnica de microcultivo em lâmina e coloração com azul de metileno segundo metodologia de Lacaz *et al.*, (1998).

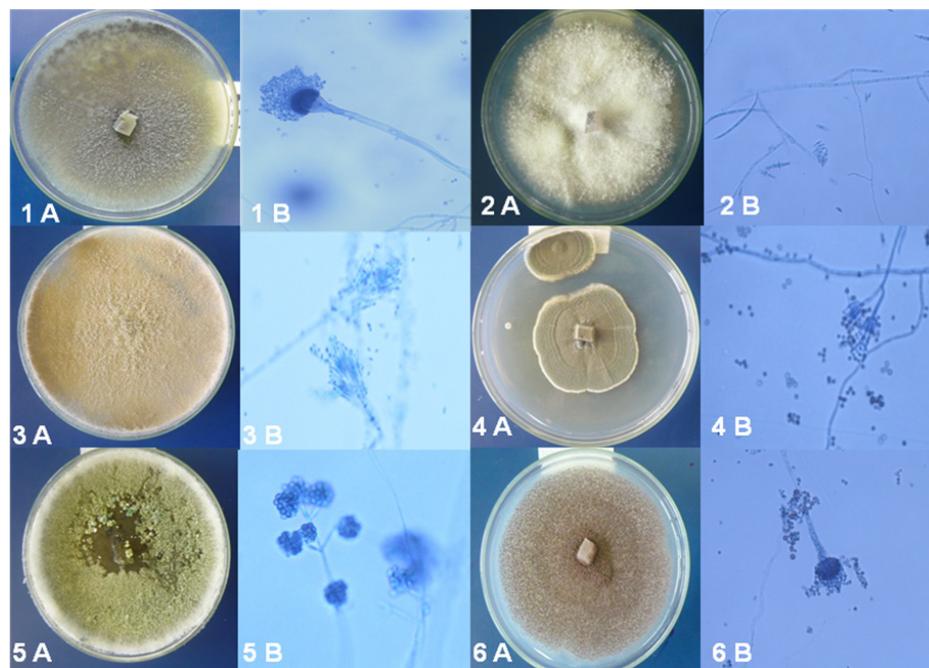
## Resultados e Discussão

Pelo método de preservação Castellani dos 447 fungos avaliados, 359 permaneceram viáveis em meio de cultura BDA. Esses foram novamente preservados pelas técnicas de Castellani e óleo mineral. Dos 100 isolados de solo do ano de 2014, 80 permaneceram viáveis, correspondendo a 80% de viabilidade (4 anos). Os isolados endofíticos foram selecionados de acordo com o ano de preservação. Dos 367 endofíticos, 19 foram reativados do ano de 2009 e 14 permaneceram viáveis, correspondendo a 70% de viabilidade (8 anos). 80 endofíticos foram reativados do ano de 2012 e 52 permaneceram viáveis, correspondendo a 65% de viabilidade (5 anos). 209 endofíticos foram reativados do ano de 2013 e 168 permaneceram viáveis, correspondendo a 80% de viabilidade (4 anos). 56 endofíticos foram reativados do ano de 2015 e 50 permaneceram viáveis, correspondendo a 89% de viabilidade (3 anos). Os aspectos macro e micromorfológicos das culturas viáveis foram avaliadas, sendo possível identificar em nível de gênero, 147 fungos, 37 de solo e 110 endofíticos. Dentre os isolados de solo, 13 são *Penicillium*, 11 *Aspergillus*, 4 *Trichoderma*, 3 *Paecilomyces*, 3 *Botrytis*, 2 *Fusarium*. Em nível de espécie, um isolado de solo foi identificado como *Fomitopsis ostreiformis* (Tabela 1).

Dentre os endofíticos, 36 foram classificados como *Aspergillus*, 23 *Penicillium*, 17 *Fusarium*, 6 *Trichoderma*, 6 *Colletotrichum*, 5 *Pestalotia*, 4 *Pestalotiopsis*, 3 *Xylaria*, 1 *Cladosporium* e 1 *Curvularia*. Em nível de espécie, foram identificados 4 *Aspergillus flavus*, 1 *A. fumigatus* e 1 *Lasiodiplodia theobromae*, como pode ser observado na Tabela 2. A morfologia macro e micromorfológica de alguns fungos pode ser observada na Figura 1.

**Tabela 1.** Relação dos fungos de solo com identificação morfológica e preservados no LAPROSP pelo método de Castellani (água destilada).

Código de registro da cepa	Fungo/Morfológica	Tempo Estocagem/ano	Código de registro da cepa	Fungo/Morfológica	Tempo Estocagem/ano
CBA 430	<i>Penicillium</i>	4 anos	CBA 4263	<i>Trichoderma</i>	4 anos
CBA 448	<i>Aspergillus</i>	4 anos	CBA 4265	<i>Paecilomyces</i>	4 anos
CBA 452	<i>Fomitopsis ostreiformis</i>	4 anos	CBA 4272	<i>Botrytis</i>	4 anos
CBA 455	<i>Paecilomyces</i>	4 anos	CBA 4273	<i>Botrytis</i>	4 anos
CBA 459	<i>Aspergillus</i>	4 anos	CBA 4313	<i>Penicillium</i>	4 anos
CBA 480	<i>Aspergillus</i>	4 anos	CBA 4337	<i>Aspergillus</i>	4 anos
CBA 483	<i>Aspergillus</i>	4 anos	CBA 4340	<i>Penicillium</i>	4 anos
CBA 4101	<i>Penicillium</i>	4 anos	CBA 4341	<i>Penicillium</i>	4 anos
CBA 4123	<i>Trichoderma</i>	4 anos	CBA 4343	<i>Penicillium</i>	4 anos
CBA 4125	<i>Penicillium</i>	4 anos	CBA 4345	<i>Trichoderma</i>	4 anos
CBA 4149	<i>Trichoderma</i>	4 anos	CBA 4347	<i>Fusarium</i>	4 anos
CBA 4159	<i>Penicillium</i>	4 anos	CBA 4349	<i>Aspergillus</i>	4 anos
CBA 4172	<i>Botrytis</i>	4 anos	CBA 4352	<i>Penicillium</i>	4 anos
CBA 4202	<i>Penicillium</i>	4 anos	CBA 4356	<i>Penicillium</i>	4 anos
CBA 4214	<i>Aspergillus</i>	4 anos	CBA 4360	<i>Aspergillus</i>	4 anos
CBA 4219	<i>Paecilomyces</i>	4 anos	CBA 4316	<i>Aspergillus</i>	4 anos
CBA 4235	<i>Penicillium</i>	4 anos	CBA 4360	<i>Aspergillus</i>	4 anos
CBA 4248	<i>Fusarium</i>	4 anos	CBA 4399	<i>Aspergillus</i>	4 anos
CBA 4262	<i>Penicillium</i>	4 anos	Total		37

**Figura 1.** Macro e micromorfologia de alguns fungos da Coleção Microbiológica do CBA. **CBA 2392** (1 A e B: *Aspergillus* spp.); **CBA 195** (2 A e B: *Fusarium* spp.); **CBA 289** (3 A e B: *Paecilomyces*); **CBA 2234** (4 A e B: *Penicillium*); **CBA 2238** (5 A e B: *Trichoderma*); **CBA 2361** (6A e B: *Aspergillus*).

Pelo método de preservação em Castellani, 359 fungos permaneceram viáveis em meio de cultura BDA, mantendo suas características morfológicas originais. 80% dos fungos de solo foram reativados após 4 anos preservados pela técnica de Castellani. Os fungos endofíticos, apresentaram viabilidade variando de acordo com o ano de preservação, sendo de 70% após 8 anos, 65% após 5 anos, 80% após 4 anos e 89% após 3 anos de preservação.

**Tabela 2.** Relação dos endófitos com identificação morfológica preservados no LAPROSP pelo método de Castellani (água destilada).

Identificação taxonômica	Hospedeiro		Tempo Estocagem	Identificação taxonômica	Hospedeiro		Tempo Estocagem
CBA 26	<i>Fusarium</i>	<i>Elaeis guineensis</i>	8 anos	CBA 2743	<i>Aspergillus</i>	<i>Copaifera multijuga</i>	4 anos
CBA 213	<i>Penicillium</i>	<i>Paulinea cupana</i>	8 anos	CBA 2746	<i>Aspergillus</i>	<i>Copaifera multijuga</i>	4 anos
CBA 214	<i>Aspergillus</i>	<i>Paulinea cupana</i>	8 anos	CBA 2747	<i>Aspergillus</i>	<i>Copaifera multijuga</i>	4 anos
CBA 217	<i>A. flavus</i>	<i>Paulinea cupana</i>	8 anos	CBA 2748	<i>Aspergillus</i>	<i>Copaifera multijuga</i>	4 anos
CBA 224	<i>Aspergillus</i>	<i>Paulinea cupana</i>	8 anos	CBA 2746	<i>Aspergillus</i>	<i>Copaifera multijuga</i>	4 anos
CBA 243	<i>Aspergillus</i>	<i>Hevea brasiliensis</i>	8 anos	CBA 2760	<i>Trichoderma</i>	<i>Copaifera multijuga</i>	4 anos
CBA 247	<i>Penicillium</i>	<i>Arrebidaea chica</i>	8 anos	CBA 2818	<i>Fusarium</i>	<i>Piper aduncum</i>	4 anos
CBA 251	<i>Penicillium</i>	<i>Arrebidaea chica</i>	8 anos	CBA 2835	<i>Aspergillus</i>	<i>Piper aduncum</i>	4 anos
CBA 257	<i>Penicillium</i>	<i>Mangifera indica</i>	8 anos	CBA 2884	<i>Xylaria</i>	<i>Piper aduncum</i>	4 anos
CBA 269	<i>Aspergillus</i>	<i>Bertholletia excelsa</i>	5 anos	CBA 2960	<i>Xylaria</i>	<i>Piper aduncum</i>	4 anos
CBA 271	<i>Aspergillus</i>	<i>Bertholletia excelsa</i>	5 anos	CBA 21481	<i>Aspergillus</i>	<i>Piper aduncum</i>	4 anos
CBA 288	<i>Aspergillus</i>	<i>Astrocaryum aculeatum</i>	5 anos	CBA 21493	<i>Pestalotiopsis</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos
CBA 289	<i>Paecylomyces</i>	<i>Copaifera multijuga</i>	5 anos	CBA 21494	<i>Pestalotiopsis</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos
CBA 291	<i>Fusarium</i>	<i>Astrocaryum aculeatum</i>	5 anos	CBA 21495	<i>Fusarium</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos
CBA 295	<i>Trichoderma</i>	<i>Spondias mombin L.</i>	5 anos	CBA 21498	<i>Curvularia</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos
CBA 2109	<i>Fusarium</i>	<i>Copaifera multijuga</i>	5 anos	CBA 21504	<i>Fusarium</i>	<i>Annona muricata</i>	4 anos
CBA 2120	<i>Penicillium</i>	<i>Aniba rosaedora</i>	5 anos	CBA 21531	<i>Pestalotia</i>	<i>Annona muricata</i>	4 anos
CBA 2135	<i>Colletotrichum</i>	<i>Aniba rosaedora</i>	5 anos	CBA 21535	<i>Aspergillus</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos
CBA 2185	<i>Fusarium</i>	<i>Piper aduncum</i>	5 anos	CBA 21540	<i>Fusarium</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos
CBA 2188	<i>Penicillium</i>	<i>Piper aduncum</i>	5 anos	CBA 21541	<i>Fusarium</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos
CBA 2191	<i>Penicillium</i>	<i>Piper aduncum</i>	5 anos	CBA 21542	<i>Pestalotia</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos
CBA 2194	<i>Fusarium</i>	<i>Piper aduncum</i>	5 anos	CBA 21543	<i>Aspergillus</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos
CBA 2195	<i>Fusarium</i>	<i>Piper aduncum</i>	5 anos	CBA 21557	<i>Fusarium</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos
CBA 2212	<i>Colletotrichum</i>	<i>Piper aduncum</i>	5 anos	CBA 21558	<i>Penicillium</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos
CBA 2216	<i>Penicillium</i>	<i>Piper aduncum</i>	5 anos	CBA 21566	<i>Penicillium</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos
CBA 2234	<i>Penicillium</i>	<i>Piper aduncum</i>	5 anos	CBA 21568	<i>Fusarium</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos
CBA 2238	<i>Trichoderma</i>	<i>Piper aduncum</i>	5 anos	CBA 21569	<i>Penicillium</i>	<i>Annona muricata</i>	4 anos
CBA 2245	<i>Penicillium</i>	<i>Piper aduncum</i>	5 anos	CBA 21576	<i>Pestalotiopsis</i>	<i>Annona muricata</i>	4 anos
CBA 2247	<i>Colletotrichum</i>	<i>Piper aduncum</i>	5 anos	CBA 21578	<i>Pestalotia</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos
CBA 2249	<i>Colletotrichum</i>	<i>Piper aduncum</i>	5 anos	CBA 21582	<i>Pestalotiopsis</i>	<i>Annona muricata</i>	4 anos
CBA 2252	<i>A. flavus</i>	<i>Piper aduncum</i>	5 anos	CBA 21585	<i>Penicillium</i>	<i>Annona muricata</i>	4 anos
CBA 2257	<i>Curvularia</i>	<i>Piper aduncum</i>	5 anos	CBA 21586	<i>Penicillium</i>	<i>Annona muricata</i>	4 anos
CBA 2258	<i>Colletotrichum</i>	<i>Piper aduncum</i>	5 anos	CBA 21588	<i>Aspergillus</i>	<i>Annona muricata</i>	4 anos
CBA 2280	<i>Colletotrichum</i>	<i>Psychotria barbiflora</i>	4 anos	CBA 21589	<i>Penicillium</i>	<i>Annona muricata</i>	4 anos
CBA 2304	<i>L. theobromae</i>	<i>Izertia hypoleuca</i>	4 anos	CBA 21593	<i>Aspergillus</i>	<i>Annona muricata</i>	4 anos
CBA 2345	<i>Fusarium</i>	<i>M. hoffmannseggiana</i>	4 anos	CBA 21594	<i>Penicillium</i>	<i>Annona muricata</i>	4 anos
CBA 2361	<i>Aspergillus</i>	<i>M. hoffmannseggiana</i>	4 anos	CBA 21566	<i>Penicillium</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos
CBA 2366	<i>Penicillium</i>	<i>Astrocaryum aculeatum</i>	4 anos	CBA 21569	<i>Penicillium</i>	<i>Annona muricata</i>	4 anos
CBA 2370	<i>Aspergillus</i>	<i>Astrocaryum aculeatum</i>	4 anos	CBA 21596	<i>Pestalotia</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos
CBA 2392	<i>Aspergillus</i>	<i>Dioclea glabra</i>	4 anos	CBA 21600	<i>Penicillium</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos
CBA 2542	<i>Fusarium</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos	CBA 21601	<i>Penicillium</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos
CBA 2545	<i>Cladosporium</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos		<i>Pestalotia</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos
CBA 2557	<i>Aspergillus</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos		<i>Aspergillus</i>	<i>Carapa guianensis</i>	4 anos
CBA 2558	<i>Aspergillus</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos		<i>Aspergillus</i>	<i>Mangifera indica</i>	3 anos
CBA 2567	<i>A. flavus</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos		<i>Aspergillus</i>	<i>Mangifera indica</i>	3 anos
CBA 2568	<i>Fusarium</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos		<i>Aspergillus</i>	<i>Mangifera indica</i>	3 anos
CBA 2567	<i>A. flavus</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos		<i>Aspergillus</i>	<i>Mangifera indica</i>	3 anos
CBA 2583	<i>Aspergillus</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos		<i>Aspergillus</i>	<i>Mangifera indica</i>	3 anos
CBA 2590	<i>Aspergillus</i>	<i>Morinda citrifolia</i>	4 anos		<i>Aspergillus</i>	<i>Mangifera indica</i>	3 anos
CBA 2595	<i>Trichoderma</i>	<i>Eichornia chassipes</i>	4 anos		<i>Aspergillus</i>	<i>Mangifera indica</i>	3 anos
CBA 2596	<i>Trichoderma</i>	<i>Eichornia chassipes</i>	4 anos		<i>Aspergillus</i>	<i>Mangifera indica</i>	3 anos
CBA 2599	<i>Aspergillus</i>	<i>Eichornia chassipes</i>	4 anos		<i>Aspergillus</i>	<i>Mangifera indica</i>	3 anos
CBA 2614	<i>Trichoderma</i>	<i>A. aculeatum</i>	4 anos		<i>Aspergillus</i>	<i>Mangifera indica</i>	3 anos
CBA 2638	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. amazonicus</i>	4 anos		<i>Aspergillus</i>	<i>Senna macranthera</i>	3 anos
CBA 2657	<i>Fusarium</i>	<i>Handroanthus albus</i>	4 anos	Total			110

Entre os fungos reativados e preservados encontram-se isolados dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Botrytis*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Xylaria*, *Pestalotia* e *Pestalotiopsis*. Em nível de espécie, foram identificados 4 *Aspergillus flavus*, 1 *Aspergillus fumigatus*, 1 *Lasiodiplodia theobromae* e um isolado de solo foi identificado como *Fomitopsis ostreiformis*. O método de conservação em água destilada pode ser aplicado para a conservação de uma variedade de gêneros e espécies de fungos, inclusive fungos fitopatogênicos (Dhingra e Sinclair, 1995; Passador *et al.*, 2010).

Nesse método, pequenos fragmentos fúngicos são colocados em um frasco contendo água destilada esterilizada ou solução salina, sendo posteriormente selado e armazenado em temperatura ambiente ou de refrigerador. É um método simples e eficaz quanto à viabilidade fúngica. A principal vantagem deste método é o baixo custo, facilidade na execução da técnica, espaço reduzido para a estocagem do material e evita a contaminação por ácaros. Diante disso, pequenas coleções micológicas podem ser mantidas por este método (Urdaneta e Lacaz, 1965; Carneiro *et al.*, 1996).

## Conclusões

A preservação de fungos filamentosos pelo método de Castellani se mostrou eficiente, com poucas perdas, garantindo a manutenção da viabilidade em meio de cultivo BDA sem alterar as características morfológicas originais dos isolados.

O método de preservação em Castellani é uma técnica barata e prática para a manutenção de micotecas.

## Agradecimentos

Ao INMETRO, ao MDIC e a SUFRAMA pelo apoio financeiro e estrutural

## Referências

- Carneiro SMTGP, Silva JFV, Carneiro RG 1996. Evaluation of four methods on the survival of *Paecilomyces lilacinus* and *Arthrobotrys oligospora*. *Nematologia Brasileira*, Campinas, 20(2):63-67.
- Urdaneta SM, Lacaz CS 1965. Preservation of Fungi in Distilled Water Preliminary Results. *Rev. Inst. Med. Tro.*, São Paulo, 7:24-26.
- Dhingra OD, Sinclair JB 1995. Basic plant pathology methods. *Boca Raton: CRC Press.*, 2 ed. 434 p.
- Passador MM, Pires GCC, Finatti D, Aparecido CC, Figueiredo MB 2010. Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca “Mário Barreto Figueiredo”. *Biológico*, São Paulo 72(1):51-55.
- Sola MC, Oliveira AP, Feistel JC, Rezende CSM 2012. Manutenção de microrganismos: Conservação e Viabilidade. *Enciclopédia Biosfera*, 8(14):1398.
- Girão MD, Prado MR, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Monteiro AJ, Sidrim JJC, Rocha MFG. 2004. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. *Rev. da Soc. Brasil. de Med. Trop.*, Rio de Janeiro, 37(3):229-233.
- Da Silva M, Cupolillo E, Pirmez C 2011. Fiocruz microbial collections: the impact of biodiversity to public health. *WFCC Newsletter*. v 51, p.7-8.
- Câmara RN. *A patrimonialização de material genético brasileiro: o estudo de caso da coleção de cultura de fungos filamentosos do Instituto Oswaldo Cruz*. 2008. Dissertação de Mestrado apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Museologia e Patrimônio. UNIRIO/MAST - RJ.
- Dieuliisa D, Johnsonb K R, Morsec SS, Schindel DE 2016. Specimen collections should have a much bigger role in infectious disease research and response. *PNAS*, 113:4-7.
- Fungaro MHP, Maccheroni Jr W 2002. Melhoramento genético para produção de enzimas aplicadas à Indústria de Alimentos. In: Melo, I. S.; Valadares-Inglis, M. C.; Nass, L. L. and Valois, A.C.C. (Eds.). *Recursos Genéticos e Melhoramento-Microrganismo. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente*. p. 426-453.
- Demain AL, Sanchez S 2009. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*, 62(1):5-16.
- Lacaz CS, Porto E, Heins-Vaccari EM, Melo NT 1998. Guia para identificação “Fungos Actinomicetos e Algas” de interesse médico. São Paulo: Savier.

## Avaliação do possível efeito imunomodulador de *Pleurotus ostreatus* em hepatócitos infectados pelo DENV-2

Aldiane Passos de Oliveira<sup>1</sup>, Marjory Michely Martins de Souza<sup>1</sup>,  
Larissa de Souza Kirsch<sup>3</sup>, Raimundo Sousa Lima Júnior<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Mestranda PPGMBT, Universidade do Estado do Amazonas

<sup>2</sup> Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas

<sup>4</sup> Doutor em Biologia Parasitária, na área de concentração em Imunologia e Patogenia, pelo Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz do Rio de Janeiro

Emails: aldianep.bio@gmail.com, marjorym.bio@gmail.com, l\_kirsch@hotmail.com, rsjunior@uea.edu.br

### Resumo

Nas últimas décadas a dengue tem se tornado um dos principais problemas de saúde pública. Dados da Organização Mundial da Saúde estimam que anualmente os casos atingem entre 50 a 100 milhões de indivíduos em todo o globo. Os vetores da doença são mosquitos do gênero *Aedes*, tendo como principal vetor a espécie *Aedes aegypti*. Quando ocorre a infecção, algumas células como as dendríticas, macrófagos, linfócitos B e T são usadas como resposta imune do hospedeiro para combater o vírus, e em seguida haverá a ativação imunológica, pois tem-se a produção de várias citocinas, como a IL-8. Essas citocinas são encontradas em altos níveis geram o quadro grave da doença. Por não haver, até o momento, nenhuma droga imunomoduladora contra a dengue, surge a necessidade de se descobrir um produto natural que interfira na infecção ou na resposta inflamatória dos sintomas clássicos da doença. E para encontrar respostas a esse problema, alguns estudos são direcionados aos fungos, buscando conhecimento de suas ações terapêuticas. Sendo assim, o fungo escolhido na pesquisa foi o *Pleurotus ostreatus* que de acordo com a literatura, apresenta atividade biológica comprovada. Dessa forma, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a possível atividade imunomoduladora de exopolissacarídeos de *Pleurotus ostreatus* em linhagem de hepatócitos infectados pelo vírus DENV-2 e para isso, uma linhagem celular de hepatócitos humanos (Huh-7) foi infectada com DENV-2 e tratadas com diferentes concentrações (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de exopolissacarídeos de *P. ostreatus* (APO) para verificação da viabilidade celular, a qual foi realizada pelo ensaio colorimétrico de MTT, que demonstrou que nenhuma das concentrações de APO analisadas foi considerada citotóxica sobre a linhagem Huh-7. Para verificação da possível atividade imunomoduladora, realizou-se a quantificação da citocina IL-8, verificada nos sobrenadantes das Huh-7 infectados. Nas três cinéticas do teste realizado (24, 48 e 72h), as concentrações de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foram capazes de reduzir de forma significativa a produção de IL-8.

**Palavras-chave:** Fungo, IL-8, Dengue

### Introdução

A dengue é uma doença que possui uma ampla distribuição entre a faixa abaixo e acima da linha do Equador, 35° N a 35° S. Até a metade da década de 1990, o Sudeste Asiático era considerada a região do mundo mais atingida pela dengue. Porém, logo depois os países das Américas Central e do Sul começaram a se destacar nesse cenário e passaram a contribuir com muito mais da metade dos casos notificados dessa doença no mundo (Teixeira *et al.*, 2008).

O vírus Dengue pertence à família Flaviviridae e ao gênero *Flavivirus*, contendo em seu interior um genoma de RNA de fita simples e envelopado (Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2008). Há quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, sendo que qualquer um destes apresenta a capacidade para causar as formas graves da doença. Os vetores da doença são mosquitos do gênero *Aedes*, tendo como principal vetor, a espécie *Aedes aegypti*, frequentes em áreas tropicais e subtropicais do mundo (Gubler, 2006).

Nas últimas décadas verificou-se que, devido ao elevado número de casos da doença em vários países, a dengue se tornou um dos principais problemas de saúde pública mundial (Wyse, 2011). No Brasil, até 24/03/2018 (Semana Epidemiológica 12), foram registrados 66.425 casos prováveis de dengue em todo país, sendo que neste total foram confirmados 522 casos de dengue com sinais de alarme, 45 casos com dengue grave e 19 casos de óbitos. Já para o mesmo período de 2017, a incidência da doença foi maior, pois foram registrados 90.044 casos prováveis da dengue, com confirmação de 1.093 casos de dengue com sinais de alarme, 90 casos com dengue grave e 44 casos de óbitos. Apesar da diminuição, a ocorrência da doença ainda se encontra presente em todas as regiões brasileiras, apresentando maior incidência de casos prováveis no Centro-Oeste (162,2 casos/100 mil habitantes) e no Norte (31,8 casos/100 mil habitantes) (Brasil, 2018).

Quando ocorre a infecção, algumas células, como as dendríticas, macrófagos, linfócitos B, linfócitos T, rapidamente envolvem-se no processo da resposta imune do hospedeiro para combater o vírus (Robertson, 2002; Green e Rothman, 2006). Depois de ocorrer a infecção pelo vírus Dengue, haverá a ativação imunológica, pois tem-se a produção de várias citocinas, num fenômeno conhecido como “tempestade de citocinas” (Butthep *et al.*, 2012). Depois de instalada a resposta imune, fatores como, MMP, IL-8, MIF e TNF- $\alpha$  são produzidos e vão desempenhar um papel fundamental na desregulação do endotélio e, portanto, devido a essa ação tendem a serem encontradas em altos níveis em pacientes com as formas graves da doença (Raghupathy *et al.*, 1998; Basu e Chaturvedi, 2008; Dalrymple e Mackow, 2012).

Por ser considerada um dos principais problemas de saúde pública mundial, e por não haver até o momento nenhuma droga antiviral e/ou imonomoduladora com eficácia na eliminação e ou controle dos principais sintomas em pacientes com dengue, surge a necessidade de se descobrir um produto natural que interfira na infecção ou na resposta inflamatória dos sintomas clássicos da dengue (Hasan *et al.*, 2016). Neste contexto, os fungos surgem como opção de estudo para terapia de dengue, visto que alguns produtos naturais ou bioativos de origem fúngica têm apresentado ações terapêuticas para diversas doenças (Cutler e Horace, 2000; Newman e Cragg, 2007). Por esta razão, este trabalho se propôs a estudar a possível ação imunomoduladora dos exopolissacarídeos de *Pleurotus ostreatus* em hepatócitos humanos infectados com vírus Dengue, visto que já foram comprovadas para este fungo, as atividades antiviral (Wang *et al.*, 2000; Santoyo *et al.*, 2012), antioxidante (Jayakumar *et al.*, 2006) antitumoral e imunomoduladora (Sarangi *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2011; Ebrahimi *et al.*, 2017).

## Material e Métodos

Para a realização dos procedimentos experimentais com o fungo, foram utilizados os seguintes materiais: uma linhagem comercial de *P. ostreatus*, meio ágar batata dextrose (BDA) com extrato de levedura 0,5% (p/v), placas de Petri, frascos Erlenmeyer (250 mL), papel de filtro, filtrador a vácuo, água destilada, etanol 95%, concentrador à vácuo, liofilizador.

Para os procedimentos experimentais com o vírus e a célula Huh-7, foram utilizados os seguintes materiais: linhagem celular de hepatócitos (Huh-7), alíquotas do DENV-2, frascos de cultura (25 cm<sup>2</sup>), meio de cultura DMEM, soro fetal bovino (SFB), L-glutamina, Estreptomicina, Penicilina, fungisona, estufa, centrífuga, microscópio, criotubos, kit comercial de ELISA padrão para IL-8, placa de 96 poços, leitora de ELISA Robonik.

Para essa pesquisa foi utilizada uma linhagem comercial de *P. ostreatus*. O isolamento foi realizado em meio ágar batata dextrose (BDA) com extrato de levedura 0,5% (p/v) em placas de Petri. Os cultivos foram incubados a 25 °C na ausência de luz por oito dias (Kirsch *et al.*, 2011).

O cultivo do *P. ostreatus* foi realizado em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL do meio de cultura, cuja formulação está descrita em (Mazziero, 1996). A partir das culturas mantidas em BDA + YE foram retirados 3 fragmentos de micélio ( $\varnothing = 1\text{cm}$ ) e adicionados ao meio de cultura, previamente esterilizado a 121 °C por 15 minutos. A fermentação submersa foi conduzida durante 15 dias a 25 °C sob agitação constante de 150 rpm (Kirsch *et al.*, 2011).

Ao término do processo fermentativo, a biomassa micelial obtida foi separada por filtração a vácuo em papel de filtro (Whatman No.1), lavada com água destilada esterilizada e desidratada a 60 °C, até peso constante (Kirsch, 2016). O meio líquido recuperado foi utilizado para a avaliação da produção de exopolissacarídeos (EPS).

Com a finalidade de recuperar os EPS, o meio líquido do experimento anterior foi tratado com etanol 95% a 8 °C (3:1, v/v). Após esse procedimento, colocou-se a mistura em um concentrador à vácuo, e em seguida foi levado a um liofilizador para eliminar o meio aquoso deixando somente os compostos orgânicos.

As células dos hepatócitos Huh-7 foram cultivadas em frascos de cultura (25 cm<sup>2</sup>) utilizando suplementação do meio DMEM F-12, contendo antibiótico e antifúngico e foram deixadas em estufa com 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em um período de 24 e 48h. Depois disso, a multiplicação celular foi acompanhada diariamente com auxílio de microscópio invertido de contraste de fase.

Os exopolissacarídeos de *P. ostreatus* foi diluído em DMSO 100%, aliquotado e posteriormente avaliado quanto à sua citotoxicidade nas Huh-7. A qual ocorreu através de ensaios colorimétricos quantitativo MTT (Mosmann, 1983). As placas foram armazenadas em estufa (37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>) por cerca de 24h a 48h. Depois o sobrenadante foi retirado e acrescentou-se o meio de cultura fresco com 5% de SFB no poço controle e nos demais poços, 200 µL das amostras em diferentes concentrações dos exopolissacarídeos de *P. ostreatus* (1 µg/mL<sup>-1</sup>, 10 µg/mL<sup>-1</sup>, 50 µg/mL<sup>-1</sup> e 75 µg/mL<sup>-1</sup>).

As placas ficaram incubadas na estufa entre 24h e 72h. Depois foi adicionado o Meio RPMI e MTT (12mM) em todos. Ainda foi adicionado um controle negativo. Em seguida, retirou-se o sobrenadante por poço de maneira que restasse apenas 25 µL. Por fim, acrescentou-se 50 µL de DMSO por poço. Ao final, fez-se a leitura na leitora de microplacas Robonik (Robonik India PVT), nos comprimentos de onda de 540-570 nm. e os resultados foram projetados no Programa GraphPad Prism 6.

Para os ensaios de infecção da linhagem de Huh-7 utilizou-se uma cepa asiática padrão universal (16681). A adsorção viral ocorreu em estufa em 37 °C com 5% CO<sub>2</sub> por 2h. Posteriormente o sobrenadante foi retirado e adicionado 800 µL/poço de DMEM-F12 contendo 2% de SFB, sendo que alguns poços infectados foram tratados com diferentes concentrações dos exopolissacarídeos de *P. ostreatus* (1 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL e 75 µg/mL). Em seguida, as placas foram incubadas em estufa 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>, sendo que a cada 24h, durante 3 dias, os sobrenadantes foram aliquotados, etiquetados e armazenados em freezer - 80 °C para posterior dosagem do antígeno viral NS1e da citocina IL-8.

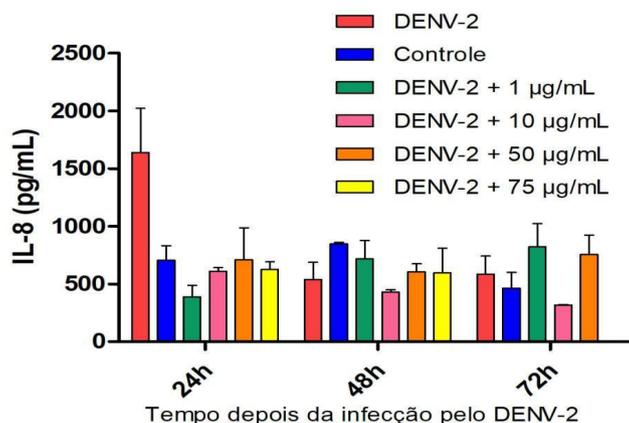
A possível atividade imunomoduladora das diferentes concentrações dos exopolissacarídeos de *P. ostreatus* (APO) foi avaliada através da dosagem da citocina IL-8 nos sobrenadantes dos hepatócitos infectados, conforme descrito previamente (Lima-Júnior *et al.*, 2013; Mello *et al.*, 2015). Para tanto, foi utilizado um kit comercial de ELISA padrão para IL-8 humana (PeproTech cat. # 900-k18). Previamente, as soluções utilizadas foram preparadas: Solução de Lavagem (0,05% de Tween 20 em PBS 1X), Reagente da solução de paragem (HCl 1M).

Após o preparo de tais soluções, o Anticorpo de Captura foi diluído em PBS e depois adicionados 100µL por poço de uma placa de 96 poços. Em seguida a placa foi mantida em overnight a 4 °C. No dia seguinte, a placa foi lavada 4x para depois serem acrescentados 280µL da solução de bloqueio em cada poço. Incubou-se a placa por 1h em temperatura ambiente (TA). Em seguida, preparou-se a Curva Padrão com a diluição do IL-8 padrão do kit em solução diluente (concentrações da curva: 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62 e 0 pg/mL). Foram distribuídos 100µL das amostras (sobrenadantes) e da Curva Padrão na placa, que depois ficou incubada por 2h em TA. Após, lavou-se 4x a mesma, e adicionou-se 100µL de Anticorpo de Detecção (1/180). Depois, a placa foi incubada por 2h em TA. Em seguida, foi lavada 4x e acrescentou-se 100µL por poço de Estreptavidina-HRP (1/200) em ambiente escuro. Ocorreu incubação por 30min em TA. Lavou-se 4x e adicionou-se 100µL por poço do substrato TMB, também no escuro. Depois, incubou-se por mais cerca de 20min em TA para depois serem acrescentados 50µL de Solução de Paragem. A leitura das densidades ópticas da placa de ELISA foi realizada na leitora de ELISA Robonik nos comprimentos de onda de 450 e 630nm.

## Resultados e Discussão

A avaliação da viabilidade celular dos hepatócitos humanos (Huh-7) tratados com diferentes concentrações dos extratos de exopolissacarídeos de *Pleurotus ostreatus* foi realizada através do ensaio colorimétrico MTT. Dentre as quatro diferentes concentrações dos extratos (APO), foram consideradas tóxicas aquelas concentrações que induziram nas linhagens de hepatócitos, uma redução superior a 10% na produção da enzima formazan, comparado com o controle positivo (+) de viabilidade 100% (poços contendo apenas Huh-7 não tratadas com nenhuma das concentrações do extrato). Sendo assim, após uma cinética de 3 dias (24h, 48h e 72h), foram usadas todas as concentrações (75, 50, 10, 1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) devido o resultado significativo no que diz respeito à viabilidade celular.

Na cinética de 24 horas, todas as concentrações apresentaram uma redução de secreção de IL-8. Em 48 e 72h, as concentrações de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foram capazes de reduzir a produção de IL-8, de forma significativa. Pôde-se ainda observar, que no tempo de 72 horas não foi expresso o resultado para a concentração de 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Isso se deu devido os valores ficarem acima da curva padrão, não sendo possível utilizá-lo em comparação com os demais. Ao observar a cinética de 48 horas, o poço controle se encontrava acima do padrão quantitativo dos poços que contém o DENV-2, no entanto, no controle não houve a presença do vírus e assim, esperava-se que não produzisse tanto IL-8. De acordo com Mello (2015), isso pode ser explicado devido às células Huh-7 possuírem uma produção basal de IL-8 em torno de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , o que pode ser verificado na Figura 1 a seguir.



**Figura 1.** Efeito modulador dos exopolissacarídeos de *Pleurotus ostreatus* (APO) sobre a produção de IL-8 em Huh-7 infectadas pelo DENV-2. As Huh-7 foram infectadas com DENV-2 e depois tratadas com diferentes concentrações da APO durante 24 h a 72 h. A quantificação da IL-8 foi realizada por ELISA no sobrenadante de Huh-7 infectadas. A figura representa 1 experimento em triplicata.

## Conclusões

Através do teste de MTT, verificou-se que as diferentes concentrações (75, 50, 10, 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) apresentaram eficácia em relação à viabilidade celular dos hepatócitos humanos (Huh-7). E dessa forma, todas as concentrações foram utilizadas na atividade imunomoduladora.

O teste imunomodulador mostrou uma redução mais expressiva de secreção IL-8 pela célula na cinética de 24 horas na concentração de  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Verificou-se também, que nas três cinéticas, as concentrações de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foram capazes de reduzir a produção de IL-8 de forma significativa.

## Agradecimentos

Aos professores Doutores Raimundo Sousa Lima Júnior e Larissa de Souza Kirsch pela orientação e oportunidade de realizar esse trabalho. Ao espaço cedido pelos laboratórios de biotecnologia e recursos naturais-MBT, Laboratório de Virologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA e à Universidade do Estado do Amazonas.

## Referências

- Basu A, Chaturvedi UC 2008. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 53, 287-299.
- Brasil, Ministério da Saúde 2018. Boletim epidemiológico: Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 12. *Secretaria de Vigilância em Saúde*, 49: 16.
- Butthep P, Chunhakan S, Yoksan S, Tangnaratchakit K, Chuansumrit A 2012. Alteration of cytokines and chemokines during febrile episodes associated with endothelial cell damage and plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. *The Pediatric infectious disease journal*. (31) 232-238.
- Cutler SJC, Horace G 2000. *Biologically active natural products: pharmaceuticals*. In: Stephen J, Dalrymple NA, Mackow ER 2012. Roles for endothelial cells in dengue virus infection. *Advances in Virology*. 2012:1-8.
- Ebrahimi A, Atashi A, Soleimani M, Mashhadikhan M, Barahimi A, Kaviani S 2017. Comparison of anticancer effect of *Pleurotus ostreatus* extract with doxorubicin hydrochloride alone and plus thermotherapy on erythroleukemia cell line. *J Complement Integr Med*. 15(2).
- Green S, Rothman A 2006. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 19:429-436.
- Gubler DJ 2006. *Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status*. Novartis Found Symp, v. 277, p. 3-16; discussion 16-22, 71-13, 251-253.
- Hasan S, Jamdar SF, Alalowi M, Beaiji SMA 2016. *Dengue virus: A global human threat: Review of literature*. *Journal Int Soc Prevent Communit Dent*; 6:1-6.
- Jayakumar J, Ramesh E, Geraldine P 2006. Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCL4-induced liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, 44:1989-1996.
- Kirsch LS, Pinto AC, Porto TS, Porto AL, Teixeira MF 2011. The influence of different submerged cultivation conditions on mycelial biomass and protease production by *Lentinus citrinus* Walleyn et Rammeloo DPUA 1535 (Agaricomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 13(2): 185-192.
- Kirsch LS 2016. Production of mycelial biomass by the Amazonian edible mushroom *Pleurotus albidus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(3), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.007>
- Lima-Júnior RS, Mello CS, Siani AC, Valente LMM, Kubelka CF 2013. *Uncaria tomentosa* alkaloidal fraction reduces paracellular permeability, IL-8 and NS1 production on human microvascular endothelial cells infected with dengue virus. *Natural Product Communications*, 8, 1547-1550.
- Maziero R 1996. *Produção de exopolissacarídeos por basidiomicetos em cultura submersa: screening, caracterização química preliminar e estudo de produção utilizando Irpex lacteus (Fr.:Fr)* Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 181p.
- Mello CS 2015. *Atividade antiviral e imunomoduladora de extratos originados de Uncaria sp. em infecção in vitro de linhagem contínua de hepatócitos humanos pelo vírus Dengue*. Dissertação Mestrado em Ciências). Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro.
- Mosmann T 1983. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65:55-63.
- Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG 2005. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*. 3(1):13-22.
- Newman DJ., Cragg GM 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of natural products*. 70(3):461-77.
- Raghupathy R, Chaturvedi UC, Al-Sayer H, Elbishbishi EA, Agarwal R, Nagar R, Kapoor S, Misra A, Mathur A, Nusrat H, Azizieh F, Khan MA, Mustafa AS 1998. Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. *Journal of medical virology*. 56(3):280-5.
- Robertson MJ 2002. *Role of chemokines in the biology of natural killer cells*. *J Leukoc. Biol. Rev.*; 71: 173-183.
- Santoyo S, Ramirez-Anguiano AC, Aldars-Garcia L, Reglero G, Soler-Rivas C 2012. *Antiviral activities of Boletus edulis, Pleurotus ostreatus and Lentinus edodes extracts and polysaccharide fractions against Herpes simplex virus type 1*. *J Food Nutr Res*. 51(4):225-235

- Sarang I, Ghosh D, Bhutia SK, Mallick SK, Maiti TK 2006. Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. *Int Immunopharmacol.* 6(8):1287-1297.
- Santos NOS, Romanos MTV, Wigg MD 2008. *Introdução à virologia humana.* 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 532 p.
- Teixeira MG, Barreto ML 2008. *Porque devemos, de novo, erradicar o Aedes aegypti.* *Ciência & Saúde Coletiva*, 1(1):122-35.
- Wang HX, Ng TB 2000. Isolation of a novel ubiquitin-like protein from *Pleurotus ostreatus* mushroom with anti-human immunodeficiency virus, translation-inhibitory, and ribonuclease activities. *Biochem Biophys Res Commun.* 276(2):587-593.
- Wyse APP, Gemaque AO, Chamilco GEI 2011. *Modelo Matemático da Transmissão de Dengue.* Grupo de Biomatemática IMECC – UNICAMP, 21: 153–162.
- Wu JY, Chen CH, Chang WH, Chung K, Liu YW, Lu FJ, Chen CH 2011. Anti-Cancer Effects of Protein Extracts from *Calvatia lilacina*, *Pleurotus ostreatus* and *Volvariella volvacea*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2011, Article ID 982368, 10 pages, 2011. <https://doi.org/10.1093/ecam/neq057>.

## Estudo de fungos termofílicos de compostagem para produção de biossurfactantes

Ralyvan Araujo dos Santos<sup>1</sup>, Rodrigo Ribeiro Cruz Santos<sup>2</sup>,  
Tayana Jesse Suwa Mesquita de Souza<sup>1</sup>, Marisa Mariana de Souza Santos<sup>3</sup>,  
João Vicente Braga de Souza<sup>4</sup>, Érica Simplício de Souza<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade do Estado do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia

<sup>2</sup> Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

<sup>3</sup> Universidade do Estado do Amazonas, Graduação em Engenharia Química

<sup>4</sup> Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Laboratório de Microbiologia Médica

Email: ralyvan.araujo@gmail.com, rottrigol@gmail.com, tayjsms@hotmail.com, marisasantoss@gmail.com, joaovicentebragasouza@yahoo.com.br, ericasimpliciosouza@yahoo.com.br

### Resumo

Devido ao aumento de compostos recalcitrantes no meio ambiente, o ser humano tem procurado alternativas sustentáveis e eficazes no processo de despoluição. A biorremediação surge como uma alternativa bastante promissora, pois o uso de microrganismos na decomposição de materiais perigosos em compostos inofensivos tem tornando-se mais atrativo para fins de despoluição, nesse contexto os biossurfactantes tem sido uma das classes de biossubstâncias mais estudadas para fins de biorremediação e outras utilidades. Portanto, o objetivo do presente estudo foi isolar fungos termofílicos de compostagem para produção de biossurfactantes, e comparar a produção em diferentes temperaturas. Os fungos foram isolados de compostagem, por meio de diluições seriadas com concentração de 10-5 células/mL, logo foram inoculados fragmentos fúngicos de 5 mm, e submetido a bioprocessamento submerso em caldo contendo óleo de soja (40g/L) e extrato de levedura (10 g/L) em temperaturas de 50 °C e 25 °C a 100 rpm por 120 horas. Após, o caldo foi separado por meio de filtração, e analisado o Índice de emulsificação (E24 %). Todos os fungos foram capazes de crescer e produzir biossurfactantes em temperaturas de 50 °C, porém, não foi possível detectar a produção em temperatura de 25 °C. Os fungos isolados de compostagem apresentam potencial para produção de biossurfactantes em temperaturas de 50 °C.

**Palavras-chave:** Biorremediação, Biossurfactantes, Fungos termofílicos

### Introdução

Devido ao aumento de compostos recalcitrantes no meio ambiente, o ser humano tem procurado alternativas sustentáveis e eficazes no processo de despoluição, devido ao acúmulo de substâncias nocivas à saúde humana e animal, pois as técnicas tradicionais de transformar substâncias nocivas, em menos nocivas, como o uso de altas temperaturas no processo de incineração, e vários tipos de decomposição química (decloração catalisada por base, oxidação UV e etc.). Porém, esses métodos tradicionais apresentam desvantagens, como complexidade tecnológica, custo para aplicação em pequena escala e a falta de aceitação pública, especialmente para incineração que aumenta a exposição a contaminantes, levando a riscos trabalhadores e moradores locais (Vidali, 2001).

A biorremediação surge como uma alternativa bastante promissora, pois o uso de microrganismos na decomposição de materiais perigosos em compostos inofensivos, tem tornando-se mais atrativo para fins de despoluição, pois não destroem sistemas vivos, tanto de ambientes terrestres, quanto em aquáticos, maior eficiência na biorremediação, não poluindo o meio ambiente (Wilson e Jones, 1993). No entanto, estudos estão se direcionando para a busca de novos microrganismos, principalmente os termofílicos, que são capazes de crescer em altas temperaturas, e produzem biomoléculas, que apresentam características como: termoestabilidade, estabilidade em ambientes ácidos e básicos, e maior eficiência na biodegradação (Deshpande *et al.*, 1983).

Em processo de biorremediação, os biossurfactantes tem sido uma das classes de biossubstâncias mais estudadas, pois são compostos biológicos anfífilos, que podem ser produzidos na membrana extracelularmente ou como parte da membrana celular, por uma variedade de fungos e bactérias, e são biodegradáveis, não tóxicas e ecologicamente corretas (Rahman e Gakpe 2008). Atualmente, vários fungos são reportados como produtores de biossurfactantes, a exemplo de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus ustus* MSF3 e *Fusarium oxysporum* LM 5634 (Kim *et al.*, 2010; Kiran *et al.* 2009; Sanches *et al.* 2018), porém, a literatura ainda é escassa sobre estudos envolvendo fungos termofílicos de origem amazônica produtores de biossurfactantes.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi isolar fungos termofílicos de compostagem para produção de biossurfactantes, e comparar a produção em diferentes temperaturas.

## Material e Métodos

Os fungos foram isolados de compostagem, onde 1 g de compostagem foi transferido para um tubo de ensaio contendo 9 mL de água destilada estéril, a partir desses tubos foram feitas 5 diluições sucessivas, até uma concentração de 10<sup>-5</sup> g/mL. Após isso, foram retiradas alíquotas de 0,1 mL da última diluição e plaqueada em placas de Petri contendo meio de indutor (18 g/L Agar, 10 g/L CMC e cloranfenicol 250 mg/L), e incubado em temperatura de 50 °C por 7 dias. As colônias que cresceram foram semeadas em placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Agar - BDA.

O bioprocesso foi realizado em Erlenmeyers (125 mL). O volume obtido baseado na concentração foi colocado em 50 mL de meio de cultivo constituído de 40 g/L de óleo de soja (Soya®) e 10 g/L de extrato de levedura (Bacto Yeast Extract® BD) em pH 6 ± 0,2, o meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C/15 min. Para o inóculo, foram utilizados 3 fragmentos de 5 mm diâmetro de cada uma das colônias, inoculados nos frascos emantidos à 25 ± 2 °C e 50 °C durante 5 dias sob agitação de 100 rpm.

Para o Teste de índice de emulsificação E<sub>24</sub>(%) foram misturados 2 mL do caldo livre de células por filtração com 2 mL de uma fonte de hidrocarboneto, neste estudo foi utilizado o tolueno. A solução foi agitada no máximo por 2 minutos constantes em agitador de tubos tipo vórtex (Phoenix®). Após 24 horas, a proporção da emulsão formada foi comparada com o volume total de hidrocarboneto com o caldo (Kiran *et al.* 2009). sendo o índice de emulsificação calculado pela seguinte fórmula:

$$E24 \% = \frac{\text{Altura da camada de emulsão}}{\text{Altura total}} \times 100$$

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e então calculados a média e o desvio padrão para cada uma das determinações realizadas.

## Resultados e Discussão

Foram isolados 5 fungos durante a fase termofílica da compostagem (temperatura de 50° C), onde foi realizado um bioprocesso submerso em caldo contendo óleo vegetal e extrato de levedura. Para tanto, os 5 isolados foram capazes de produzir biossurfactantes, na qual os resultados foram expressos através do índice de emulsificação E<sub>24</sub>(%), sendo respectivamente, Termo INPA A01 (59 %) Termo INPA A07 (59%), Termo INPA A08 (58%), Termo INPA A17 (58%) e Termo INPA A16 (57 %). Sanches *et al.* (2018) e Kiran *et al.* (2009) ao investigarem a produção de biossurfactantes por *Fusarium oxysporum* LM5634 e *Aspergillus ustus* MSF3 obtiveram E<sub>24</sub>(%) acima de 50% e 42,8 %, respectivamente, mostrando assim que os fungos investigados no presente estudo apresentam potencial para produção de biossurfactantes, quando utilizado o óleo de cozinha como indutor.

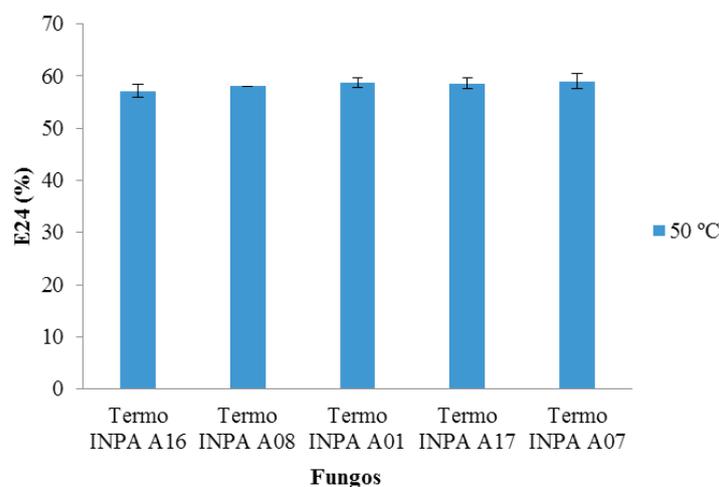
Muitos fungos são capazes de usar como fonte de energia como hidrocarbonetos e alguns óleos, e a produção de biossurfactantes, especialmente por fungos termofílicos que são de grande interesse, principalmente para aplicação biotecnológica e podem ser usados em diferentes temperaturas em vários processos industriais que requerem altas (Bharali *et al.* 2011). Os biossurfactantes são usados em vários

setores industriais, incluindo a indústria de alimentos, clínica, cosméticos e especialmente na industrial química e limpeza de óleos por meio da técnica de biorremediação (Kim *et al.* 2010).

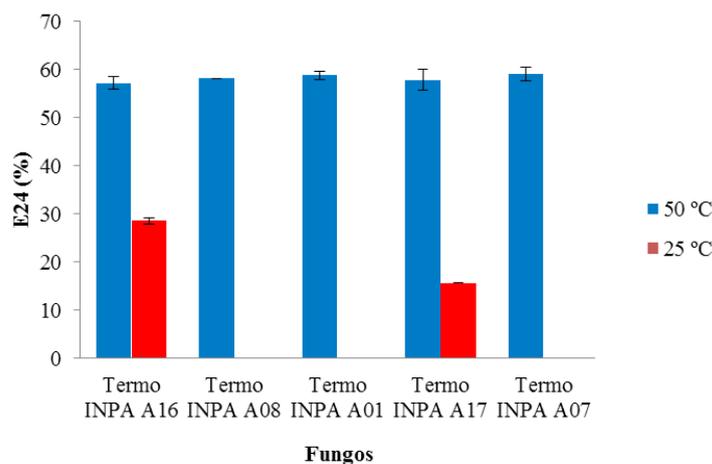
Para investigar a influência da temperatura na produção dos biosurfactantes, foi realizado um bioprocessamento submerso em temperaturas de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  e  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Os 5 fungos foram capazes de crescer em temperaturas de  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  e produzirem biosurfactantes, no entanto, quando realizado o bioprocessamento em temperatura ambiente, foi possível notar que não houve crescimento celular dos fungos (INPA A08, INPA A01 e INPA A07), e não foi detectada a presença de biosurfactantes, com exceção dos fungos Termo INPA A16 e INPA A17, apresentando E24(%) respectivamente de 29 % e 16 % (Figura 2).

A produção de biosurfactantes pode ser intermediada por meio de altas temperaturas, nos quais o metabolismo microbiano é acelerado, pode facilitar o uso dessas moléculas em escala industrial, incluindo estudos sobre os microssurfactantes produzidos a partir de microrganismos termofílicos (Bianchi *et al.*, 2018).

A temperatura é fator primordial para o desenvolvimento de uma série de microrganismos (Bianchi *et al.*, 2018), no entanto, os fungos termofílicos são conhecidos por crescerem em temperaturas ótimas de  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , visto que neste estudo, a temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  não apresentou crescimento e nem produção de biosurfactantes. A literatura é escassa a respeito de estudo de fungos termofílicos de origem amazônica para produção de biosurfactantes.



**Figura 1.** Produção de biosurfactantes em temperaturas de  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  pelos fungos isolados de compostagem.



**Figura 2.** Comparação da produção dos biosurfactantes em temperaturas de  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  pelos fungos isolados de compostagem.

## Conclusão

Os fungos termofílicos isolados de compostagem apresentam potencial para produção de biossurfactantes quando utilizado o óleo de soja como indutor. E que em temperaturas de 25 °C não foi possível avaliar o crescimento fúngico e nem a detectar presença de biossurfactantes.

## Referências

- Bharali P, Das S, Konwar BK, Thakur AJ 2011. International biodeterioration & biodegradation crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis* : feasibility in petro-spill bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65 (5): 682–690. Doi: 10.1016/j.ibiod.2011.04.001.
- Bianchi, C, Maria L, Morandini B, Borges C, Bublitz F, Ugalde G, Antonio M, Josemar R, Jacques S 2018. Biotechnology and industrial microbiology biosurfactant with, trehalose by *Fusarium fujikuroi* under optimized conditions of submerged fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*: 1–8. Doi: 10.1016/j.bjm.2018.04.004.
- Deshpande V, Raman HS, Rao M 1983. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol using *Penicillium funiculosum* cellulase and free or immobilized *Saccharomyces uvarum* cells. *Biochemistry Division*, XXV: 1679–1684.
- Kim, PI, Ryu J, Kim YH, Chi Y 2010. Production of biosurfactant lipopeptides iturin a, fengycin , and surfactin a from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20: 138–145. Doi: 10.4014/jmb.0905.05007.
- Kiran, GS, Hema, TA Gandhimathi, R, Selvin, J, Thomas, TA, Ravji TR, Natarajaseenivasan K 2009. Colloids and surfaces B : biointerfaces optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73: 250–256. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.05.025.
- Rahman, PKSM, Gakpe, E. 2008. Production, characterisation and applications of biosurfactants - Review. *Biotechnology*, 7: 360–370.
- Sanches MA, Santos, RA, Cortez ACA, Mariner R, Souza JVB 2018. Biosurfactant Production by *Fusarium oxysporum* LM 5634 Using Peels from the fruit of *Bactris gasipaes* ( Kunth ) as Substrate. *Biotechnology Journal International*, 21 (1): 1–9. Doi: 10.9734/BJI/2018/39405.
- Vidali M 2001. Bioremediation . An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73 (7): 1163–1172.
- Wilson SC, Jones KC 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Environmental Pollution*, 81: 229–249.

## Influência de condições de hidrólise e fermentação em reatores de coluna na produção de etanol 2G

Vinicius Pereira Shibukawa<sup>1</sup>, Lucas Ramos<sup>1</sup>, Marcelo Holanda Vasconcelos<sup>1,2</sup>,  
Júlio Cesar dos Santos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (EEL/USP), Lorena, São Paulo, Brasil

<sup>2</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia (IFRO), campus Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil  
Emails: lucas.eng12@usp.br, marcelo.holanda@ifro.edu.br

### Resumo

A obtenção de etanol 2G a partir de biomassa lignocelulósica é um assunto de grande interesse nacional, em especial considerando materiais como o bagaço de cana-de-açúcar, o qual é abundante no país e cujo uso possibilitaria aumento na produção do álcool sem necessidade de expansão da fronteira agrícola. Nesse contexto, é importante o estudo de condução das diferentes etapas do processo em biorreatores passíveis de ampliação de escala. Neste trabalho, avaliou-se a influência de condições de hidrólise e fermentação ou co-fermentação em reatores de coluna, visando à produção de etanol 2G a partir de bagaço de cana-de-açúcar. Inicialmente, o bagaço foi pré-tratado com solução de sulfito alcalino e posteriormente submetido à hidrólise enzimática em reator de coluna de leito fixo, carregado com diferentes teores de sólidos (9%, 12,5% e 16%). O leito do reator foi composto por bagaço pré-tratado e uma solução de celulasas e xilanas foi recirculada através do sistema. Para o maior carregamento de sólidos, obteve-se um rendimento de hidrólise de glucana e de xilana de 66 e 62%, respectivamente, enquanto que, para o menor carregamento de sólidos, estes valores foram de 72% e 75%, respectivamente. No processo fermentativo, realizado em coluna de bolhas, avaliou-se a influência da aeração no processo, realizando-se experimentos com 0,3vvm, 0,5vvm e 0,7vvm e empregando-se dois microrganismos distintos, *Saccharomyces cerevisiae* IR2 (cepa flocculante) ou *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y7124. Os resultados obtidos indicaram que o processo foi favorecido sob aeração de 0,5vvm, para ambas as leveduras empregadas. Usando a levedura *S. cerevisiae*, obteve-se um fator de rendimento ( $Y_p/s$ ) de 0,40g/g e uma produtividade volumétrica ( $Q_p$ ) de 1,58g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, em 24h. O uso da levedura *S. stipitis* resultou, em 48h, em  $Y_p/s$  de 0,31g.g<sup>-1</sup> e  $Q_p$  de 0,62g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. O potencial do sistema foi demonstrado, em especial considerando aspectos como a simplicidade de construção do biorreator.

**Palavras-chave:** Etanol de segunda geração, bagaço de cana-de-açúcar, reator de coluna.

### Introdução

Atualmente, o mercado de biocombustíveis está em expansão, particularmente considerando-se fatores como o contínuo aumento do consumo energético mundial, a necessidade da redução de emissão de poluentes e perspectivas de esgotamento das reservas de petróleo em médio prazo (Gaurav *et al.*, 2017). Dentre os biocombustíveis, destaque tem sido dado ao etanol obtido a partir de materiais lignocelulósicos, o chamado “etanol de segunda geração”. Este tem recebido grande atenção devido a sua importância e valorização por razões sociais, estratégicas, econômicas e ambientais (Mattei, 2017).

Os biocombustíveis obtidos a partir de materiais lignocelulósicos apresentam vantagens como a grande disponibilidade de matéria prima, possibilitando sua produção sem competição com a cadeia de obtenção de alimentos ou necessidade de expansão da fronteira agrícola. Além disso, o balanço global de carbono demonstra seu elevado potencial para a redução da emissão de CO<sub>2</sub> na atmosfera (BNDES e CGEE, 2008; Gonzalez *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, esforços têm sido conduzidos para viabilização de biorrefinarias de produção de etanol e outros compostos a partir de materiais lignocelulósicos (Silva *et al.*, 2010; Tete, 2016). Atualmente, há inclusive algumas plantas demonstrativas e empresas iniciando a produção de etanol de segunda

geração em escala industrial (Granbio, 2014; Santos *et al.*, 2016). No entanto, há muitos gargalos no processo e estudos são necessários para favorecer sua viabilidade.

As tecnologias em desenvolvimento incluem etapas de pré-tratamento e hidrólise das frações carboidrato visando liberar açúcares para o processo fermentativo (Agbor *et al.*, 2011; Galbe e Zacchi, 2012). O objetivo do pré-tratamento é favorecer a hidrólise enzimática da celulose presente no material. A hemicelulose, por sua vez, pode também ser hidrolisada na etapa de pré-tratamento ou na etapa enzimática, dependendo da tecnologia selecionada. Neste caso, quando são usados resíduos e subprodutos agrícolas como matéria-prima, liberam-se pentoses no hidrolisado. Para sua fermentação, podem-se empregar microrganismos geneticamente modificados ou leveduras capazes de fermentar pentoses naturalmente, como *Candida shehetae* e *Scheffersomyces stipitis* (Antunes *et al.*, 2016; Bideaux *et al.*, 2016).

Diversas opções têm sido avaliadas para a condução das etapas biológicas do processo, ou seja, hidrólise enzimática e fermentação (Terán-Hillares *et al.*, 2017). Visando a sua aplicação industrial, no entanto, são necessários estudos de opções de processo e reatores que favoreçam sua aplicação em larga escala. Entre as opções de biorreator, sistemas de colunas são interessantes, apresentando vantagens como simplicidade de construção e baixo custo (Terán-Hillares *et al.*, 2017).

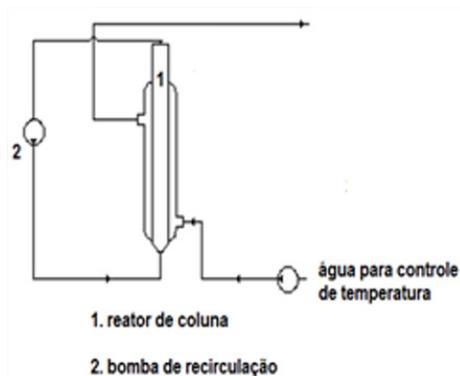
Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação da influência de condições de hidrólise e fermentação de hexoses ou co-fermentação de hexoses e pentoses em reatores de coluna, visando à produção de etanol 2G a partir de bagaço de cana-de-açúcar. Hidrólise enzimática foi conduzida em sistemas com leito fixo empregando diferentes quantidades iniciais de sólidos no reator e fermentação foi realizada em colunas de bolhas empregando células de *Saccharomyces cerevisiae* ou *Scheffersomyces stipitis*.

## Material e Métodos

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho foi doado pela Usina Vale Onda Verde, localizada no município de Onda Verde/SP. A matéria-prima foi seca ao sol para reduzir a umidade até cerca de 10% e assim evitar contaminação microbiana durante o período de estocagem. Na etapa subsequente, o bagaço foi moído em moinho de martelo marca Benedetti, modelo Dupla 270 (Moinho Benedetti Ltda., Pinhal-SP). A granulometria do bagaço foi analisada por meio de um conjunto de peneiras padrão da série Tyler montadas em um agitador de peneiras da Bertel Indústrias Metalúrgicas Ltda. (Caieiras-SP), sendo utilizadas nos experimentos partículas maiores que 0,60mm (28 MESH). O bagaço moído foi caracterizado com relação a sua composição em celulose, hemicelulose, extrativos, lignina e cinzas.

O pré-tratamento foi realizado em um reator de coluna com 460mm de altura e 220mm de diâmetro interno, seguindo a metodologia estabelecida por Mendes *et al.* (2015).

A hidrólise enzimática das frações carboidrato do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada em biorreator de coluna com diâmetro interno igual a 2,5cm e altura de 50cm, em um sistema montado conforme o esquema simplificado apresentado na Figura 1.



**Figura 1.** Esquema simplificado do sistema com reator de coluna empregado na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por sulfito alcalino

O biorreator foi preenchido com diferentes razões sólido/líquido iniciais (9%, 12,5% e 16%). O meio reacional (volume total de 250mL) era constituído de solução de preparações comerciais de celulases e foi recirculado no sistema com uma vazão de 23mL/min com auxílio de uma bomba peristáltica. A solução de enzimas era composta por tampão citrato de sódio 50mM pH4,8 e uma preparação comercial de celulase de *Trichoderma longibrachiatum* (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), com uma carga enzimática de 16,4FPU/g de bagaço, além de 4,4U/g de bagaço de uma preparação de  $\beta$ -glicosidase (NS50012, Novozymes Latin America Ltda., Araucária, PR, Brasil). O processo foi mantido por 24h a 50°C, sendo retiradas amostras periódicas para análise do teor de açúcares por HPLC.

Os microrganismos utilizados foram *Saccharomyces cerevisiae* IR2 e *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y7124, ambos disponíveis no Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena-Universidade de São Paulo, e armazenados em Ágar extrato de malte a 4°C. O preparo do inóculo foi feito em frascos Erlenmeyer de 500mL contendo 200mL de meio composto por 30g/L de glicose (para *S. cerevisiae*) ou xilose (para *S. stipitis*), 10g/L de peptona bacteriológica e 10g/L de extrato de levedura. O cultivo foi realizado em um agitador rotativo por 24h a 30°C e 200 rpm. Posteriormente, as células foram recuperadas por centrifugação a 2000g por 15min, lavadas e ressuspensas em água destilada para obtenção de uma suspensão com elevada densidade celular, a qual foi utilizada como inóculo.

O processo fermentativo foi conduzido na mesma coluna utilizada na etapa de hidrólise, porém com as devidas adaptações necessárias para a realização da fermentação (asepsia e aeração). O meio de fermentação foi composto por hidrolisado obtido a partir do processo de hidrólise enzimática descrito previamente e nutrientes (5g/L peptona bacteriológica, extrato de levedura 3g/L, extrato de malte 3g/L e sulfato de amônio 0,25g/L). As fermentações ocorreram em biorreatores de coluna de bolhas durante 48h a 30°C, com amostras sendo retiradas periodicamente para quantificação de açúcares e etanol. Os experimentos foram realizados em triplicata empregando diferentes vazões de aeração (0,3vvm, 0,5vvm e 0,7vvm).

Para a determinação da umidade do bagaço de cana-de-açúcar utilizou-se uma balança de infravermelho Mark M163 (BEL Engineering, Piracicaba-SP). A caracterização do bagaço foi realizada antes e após o pré-tratamento, seguindo a metodologia padrão NREL - National Renewable Energy Laboratory (Sluiter *et al.*, 2011). As concentrações de etanol, açúcares e ácido acético foram medidas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent Technology 1200 series (Agilent, Estados Unidos), conforme Medina (2013). Determinou-se a concentração celular por turbidimetria utilizando um espectrofotômetro (Beckman DU640B, USA), sendo correlacionada a leitura de absorbância a 600nm com a concentração celular por meio de uma curva de calibração previamente determinada.

## Resultados e discussão

Procedeu-se à caracterização do bagaço de cana-de-açúcar, obtendo-se como resultado, antes do pré-tratamento, 41,4% de glucana, 19,7% de xilana, 3,8% de arabinosil, 0,5% de acetil, 23,2% de lignina e 3,2% de cinzas. Após o pré-tratamento, a composição do bagaço incluiu: 47,1% de glucana, 23,3% de xilana, 2,9% de arabinosil, 0,2% de acetil, 13,2% de lignina e 3,6% de cinzas. Com o material pré-tratado, foram realizadas as reações de hidrólise enzimática em reator de coluna com leito fixo. A Figura 2 apresenta o perfil cinético da formação de açúcares devido à hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por sulfito alcalino.

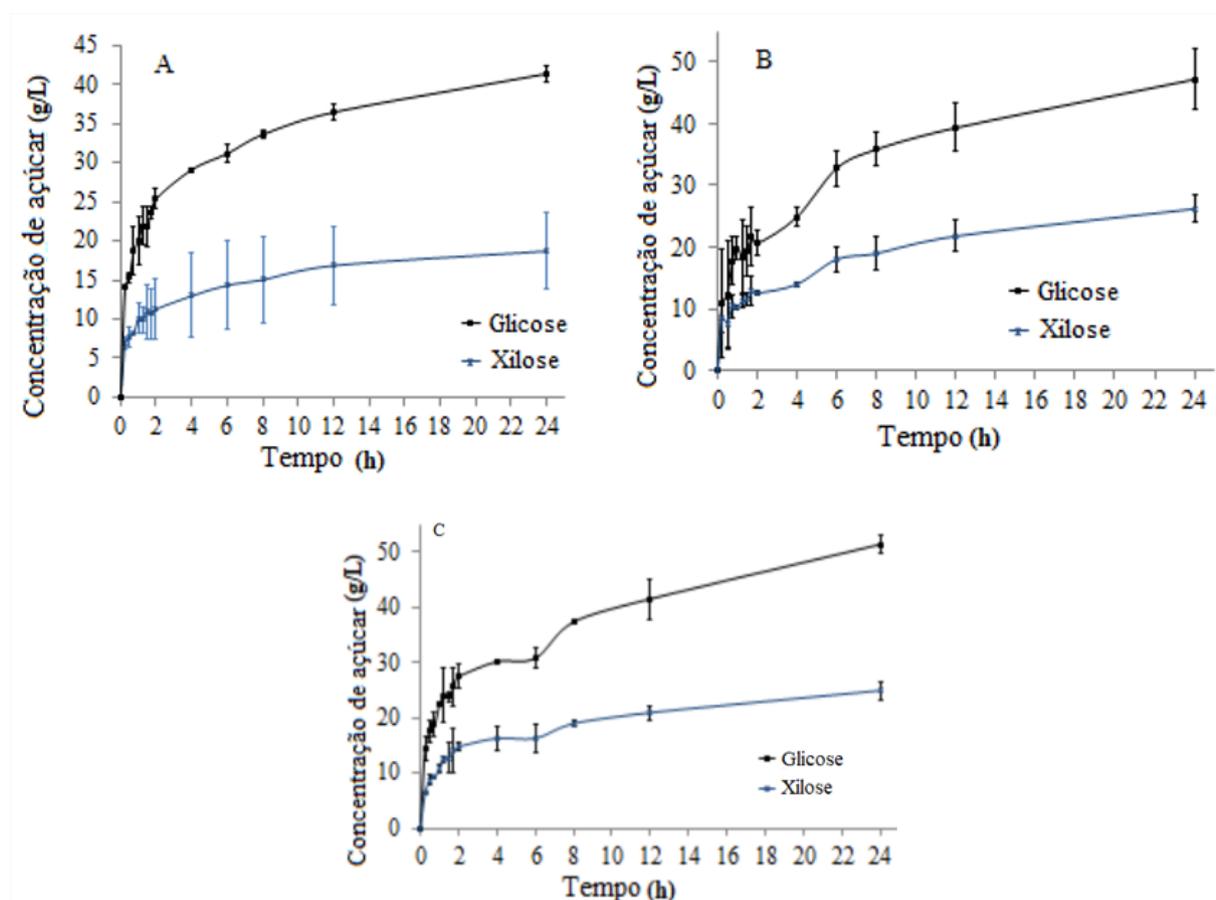
Conforme mostrado na Figura 2, a velocidade da hidrólise foi maior durante as duas primeiras horas de processo, devido à maior disponibilidade de frações carboidrato de baixa recalcitrância no início da reação e à baixa concentração de produtos de hidrólise inibidores da ação das enzimas. Após 24h de processo, obteve-se uma concentração de glicose de 41,41g.L<sup>-1</sup>, 47,17g.L<sup>-1</sup> e 51,38g.L<sup>-1</sup> nos experimentos com carregamento de sólidos de 9%, 12,5% e 16%, respectivamente. Apesar da maior concentração de glicose obtida com elevado carregamento de sólidos, obteve-se maior rendimento de hidrólise da celulose com baixo carregamento, conforme mostrado na Tabela 1.

O maior rendimento de hidrólise da celulose com baixo carregamento de sólidos pode estar associado a fenômenos como a inibição das celulases por produtos de hidrólise (celobiose e glicose) e adsorção improdutiva de enzimas nos sólidos presentes (Gan *et al.*, 2003).

Os hidrolisados obtidos foram empregados para o processo fermentativo. A fermentação ou co-fermentação foram realizadas empregando, respectivamente, *Saccharomyces cerevisiae* IR2 ou *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y7124. Para as ambas foram avaliadas a influência da aeração (0,3vvm, 0,5vvm e 0,7vvm) sobre o desempenho do processo fermentativo.

Conforme mostrado na Figura 3, a cinética de fermentação do processo com *S. cerevisiae* foi favorecida empregando aeração de 0,7vvm, atingindo-se uma concentração de etanol de 32g.L<sup>-1</sup> com uma eficiência de 69% e Yp/s de 0,36g/g e uma produtividade volumétrica (Qp) de 1,36g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>; porém, usando aeração de 0,5vvm, apesar de mais lento, o perfil de formação de etanol resultou em concentração mais elevada após 24h, de 38g/L e uma produtividade volumétrica (Qp) de 1,58g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, correspondendo a uma eficiência de 79% e Yp/s igual a 0,402g/g. Para a aeração de 0,3vvm, observou-se uma cinética de formação de produto ainda mais lenta, atingindo-se 35,7g/L de etanol após 72h, correspondendo a uma eficiência de 65% e Yp/s igual a 0,33g/g e um (Qp) de 0,67g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

Conforme pode ser observado, a aeração de 0,3vvm resultou em 16g/L de etanol em 48h de reação, com eficiência de 58% e Yp/s de 0,29g/g e uma produtividade volumétrica (Qp) de 0,35g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Maiores



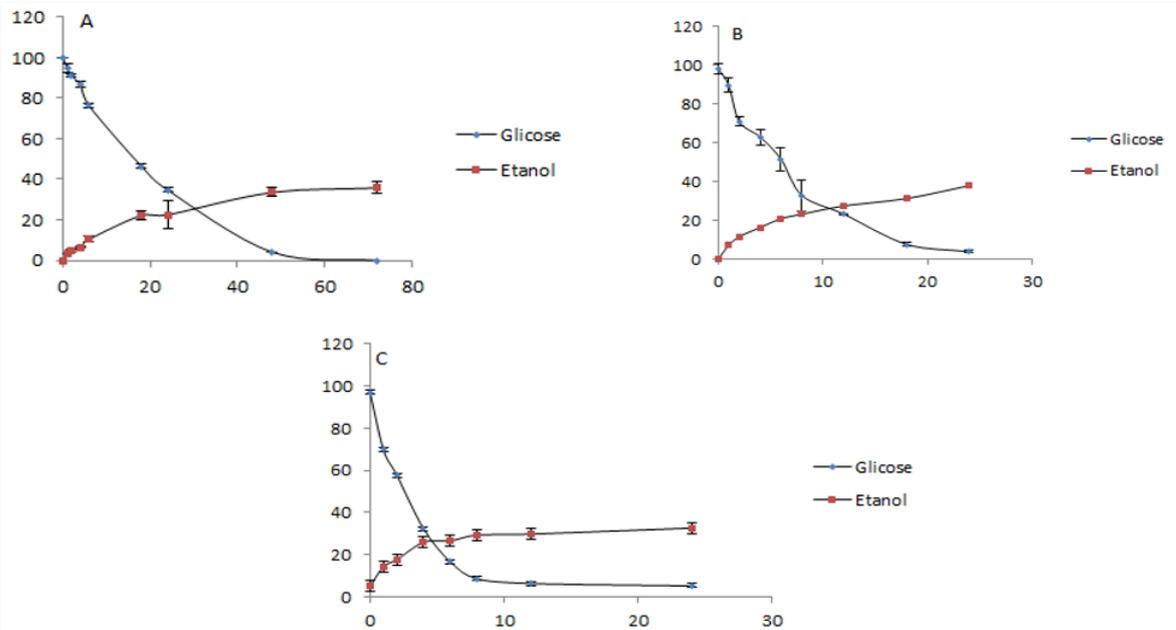
**Figura 2.** Perfil cinético da formação de açúcares no processo de hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar em reator de coluna com leito fixo empregando carregamento inicial de sólidos de: a) 9%; b) 12,5%; c) 16%

**Tabela 1.** Digestibilidade enzimática de bagaço de cana-de-açúcar sob diferentes carregamentos de sólidos

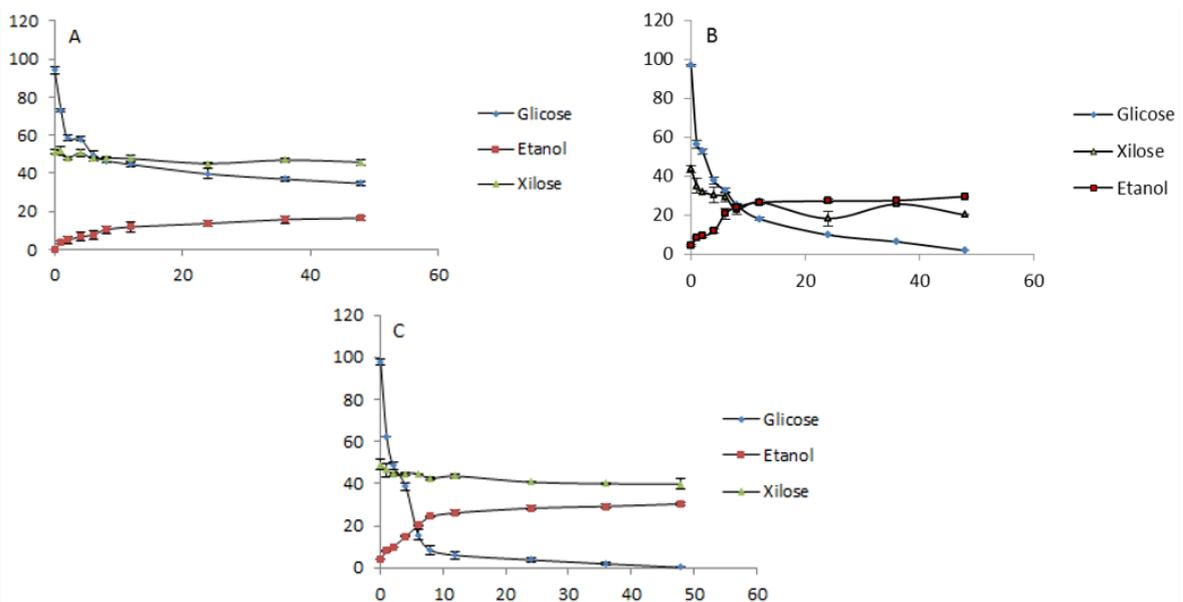
Carga inicial de sólidos	Rendimento de hidrólise da glucana	Rendimento de hidrólise da xilana
9%	86,73 ± 1,78	74,96 ± 2,52
12,5%	77,42 ± 7,47	79,14 ± 6,86
16%	65,11 ± 7,48	71,84 ± 7,37

concentrações de etanol foram obtidas empregando maior vazão de ar, atingindo-se cerca de 30g/L de etanol em 48h de processo empregando-se 0,5vvm ou 0,7vvm, porém a produtividade volumétrica ( $Q_p$ ) de foi maior empregando a aeração de 0,5vvm ( $0,64\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ). A levedura *S. stipitis* começou a consumir a xilose depois de toda a glicose ser consumida, entretanto esse consumo é mais lento em relação glicose, sendo necessário estender o tempo da reação para que toda a xilose seja consumida, isso resulta em uma diminuição da produtividade volumétrica de etanol.

A Figura 4 apresenta o perfil cinético da co-fermentação de hidrolisado com a levedura *Scheffersomyces stipitis* empregando diferentes aerações.



**Figura 3.** Perfil cinético da formação de etanol e consumo de glicose no processo fermentativo empregando reator de coluna de bolhas e *Saccharomyces cerevisiae* IR2 como levedura, sob diferentes vazões de ar: a) 0,3vvm; b) 0,5vvm; c) 0,7vvm.



**Figura 4.** Perfil cinético da formação de etanol e consumo de glicose e xilose no processo de co-fermentação empregando reator de coluna de bolhas e *Scheffersomyces stipitis* como levedura, sob diferentes vazões de ar: a) 0,3vvm; b) 0,5vvm; c) 0,7vvm.

## Considerações finais

Nas reações de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por sulfito alcalino em reator de leito fixo obteve-se uma maior digestibilidade da celulose com menor carregamento de sólidos (9%), enquanto que a hidrólise com elevado carregamento de sólidos (16%) resultou em maior concentração final de açúcares. No processo fermentativo realizado com meio baseado em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar conduzido no reator de coluna de bolhas, obteve-se, de uma forma geral, melhores desempenhos com aeração de 0,5vvm para ambas as leveduras avaliadas. A cepa de *S. stipitis*, apesar de consumir xilose, não aumentou significativamente a concentração final de etanol, resultando em uma menor produtividade volumétrica em comparação com a *S. cerevisiae*.

## Agradecimentos

À Usina Vale Onda Verde, pela doação das amostras de bagaço de cana-de-açúcar. À FAPESP (processo 2014/06923-6), CAPES, ao Programa PUB-USP pelo apoio financeiro e ao programa PIQ-IFRO.

## Referências

- Agbor VB, Cicek N, Sparling R, Berlin A, Levin DB 2011. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, 29(I):675–685.
- Antunes FAF, Santos JC, Chandel AK, Milessi TS, Peres GFD, Silva, SS 2016. Hemicellulosic ethanol production by immobilized wild brazilian yeast *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52,2: Effects of cell concentration and stirring rate. *Current Microbiology*, 72(I):133-138.
- Bideaux C, Montheard J, Cameleyre X, Molina-Louve C, Alfenore F 2016. Metabolic flux analysis model for optimizing xylose conversion into ethanol by the natural C5-fermenting yeast *Candida shehatae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100(I):1489-1499.
- BNDES - CGEE 2008. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro, Brasil: BNDES.
- Galbe M, Zacchi G 2012. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass and bioenergy*, 46(I):70-78.
- Gan Q, Allen SJ, Taylor G 2003. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modeling. *Process Biochemistry*, 38(I) 1003-1018.
- Gaurav N, Sivasankari S, Kiran GS, Ninawe A, Selvin J 2017. Utilization of bioresources for sustainable biofuels: a Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 73(I):205-214.
- Gonzalez R, Daystar J, Jett M, Treasure T, Jameel H, Venditti R, Phillips R 2012. Economics of cellulosic ethanol production in a thermochemical pathway for softwood, hardwood, corn stover and switchgrass. *Fuel Processing Technology*, 94(I):113–122.
- Granbio 2014. Global Bioethanol: Evolution, Risks, and Uncertainties. [on line]. Brasil, Disponível em: [http://www.granbio.com.br/wp-content/uploads/2014/09/partida\\_portugues](http://www.granbio.com.br/wp-content/uploads/2014/09/partida_portugues) Acesso em: 02 maio. 2018.
- Mattei L 2017. Programa Nacional para Produção e Uso do Biodiesel no Brasil (PNPB): trajetória, situação atual e desafios. *Revista econômica do Nordeste*, 41 (I):731-740.
- Medina KJD 2013. *Produção de bioetanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras Scheffersomyces (Pichia) stipitis NRRL Y-7124 e Candida shehatae UFMG HM 52,2 visando à aplicação em bioprocessos com campo eletromagnético*. Lorena, Brasil. (Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, USP). 171p.
- Mendes FM, Heikkilä E, Fonseca MB, Milagres AMF, Ferraz A, Fardim P 2015. Topochemical characterization of sugar cane pretreated with alkaline sulfite. *Industrial Crops and Products*, 69(I):60–67.
- Santos LV, De Barros Grassi MC, Gallardo JCM, Pirolla RAS, Calderón LL, De Carvalho-Netto OV, Pereira GAG 2016. Second-Generation Ethanol: The Need is Becoming a Reality. *Industrial Biotechnology*, 12(I): 40–57.
- Silva VS, Garcia CA, Silva CM 2010. O destino do bagaço da cana-de-açúcar: um estudo a partir das agroindústrias sucroalcooleiras do Paraná. *Revistas em Agronegócios e Meio Ambiente*, 3(I):59-76.
- Téran- Hilares R, Lenny JV, Marcelino PF, Ahmed MA 2017. Ethanol production in a simultaneous saccharification and fermentation process with interconnected reactors employing hydrodynamic cavitation-pretreated sugarcane bagasse as raw material *Bioresource technology*.243(I):652-659.
- Tete MF 2016. *Vínculos entre instituições e funções na formação de um sistema tecnológico de inovação: o caso do etanol de segunda geração brasileiro*. Brasília, Brasil. (Tese de doutorado. Universidade de Brasília, UNB). 339p.

# Potencial biotecnológico de actinobactérias do bioma amazônico para produção de enzimas hidrolíticas

Nélly Mara Vinhote Marinho<sup>1</sup>, Annie de Souza e Silva<sup>1</sup>, Maria Francisca Simas Teixeira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Micoteca DPUA – Coleção de Cultura - Universidade Federal do Amazonas – Manaus - AM, Brasil  
Emails: nmsvinhote@gmail.com, msimasteixeira@gmail.com

## Resumo

As atividades dos micro-organismos estão baseadas em sua diversidade metabólica e adaptabilidade genética, o que os torna uma fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e o desenvolvimento sustentável. Actinobactérias são bactérias Gram positivas, predominantemente filamentosas e disponíveis em diversos ambientes. O objetivo deste trabalho foi autenticar taxonomicamente actinobactérias provenientes do acervo da Micoteca DPUA, da Universidade Federal do Amazonas e, caracterizá-las qualitativamente quanto ao potencial enzimático. Para esta pesquisa foram selecionadas cinco linhagens de actinobactérias reativadas em ágar ISP2-A para autenticação em nível de gênero com base nas características macro e micromorfológicas. Os microrganismos foram cultivados em meio sólido e meio líquido para determinação da atividade enzimática pela técnica de difusão em ágar (técnica de difusão em ágar por poço e bloco de gelose). Os resultados demonstraram que as actinobactérias expressaram características morfológicas do gênero *Streptomyces*. O resultado revelou que *Streptomyces* A26 exibiu atividade para amilase, celulase, pectinase e protease, com índice enzimático variando de 1,9 a 3,1. Além disso, entre os processos utilizados para produção das enzimas, a fermentação submersa se mostrou mais eficiente. Bactérias filamentosas tem potencial para produção de enzimas hidrolíticas de interesse industrial quando cultivadas em meio sólido e líquido.

**Palavras-chave:** Bactérias filamentosas, Enzimologia, Região amazônica, Biopotencial.

## Introdução

As atividades dos micro-organismos estão baseadas em sua notável diversidade metabólica e adaptabilidade genética, o que os torna uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e o desenvolvimento sustentável (Kurtboke *et al.*, 2010).

Actinobactéria são bactérias Gram positivas, filamentosas e disponíveis abundantemente em diversos ambientes, encontradas principalmente no solo, no entanto, podem também estar presentes em ambientes aquáticos e em associação com líquens e plantas (González *et al.*, 2005, Silva-Vinhote *et al.*, 2011).

As actinobactérias são responsáveis pela produção de uma gama diversificada de metabólitos secundários com propriedades medicinais, incluindo, antibióticos, antitumorais, agentes imunossupressores e hormônios de crescimento (Strobel *et al.*, 2004; Fiedler *et al.*, 2005; Silva-Vinhote *et al.*, 2011).

Após os antibióticos, as enzimas são os compostos mais produzidos pelas actinobactérias. Uma característica marcante destas bactérias corresponde a produção de enzimas extracelulares que degradam macromoléculas complexas comumente encontradas nos solos como caseína, amido, quitina, húmus, celulose, lignocelulose, além da síntese e excreção de metabólitos secundários como antibióticos e o terpenóide geosmina (Coelho *et al.*, 2008).

As enzimas são produzidas por uma diversidade de seres vivos, tais como plantas, animais, fungos e bactérias, mas as de origem microbiana se destacam devido a ampla diversidade bioquímica, a susceptibilidade a manipulação genética e a facilidade de produção em larga escala. Além dessas vantagens, nessas enzimas predominam as características desejáveis para aplicações biotecnológicas em diversos ramos industriais. Dentre as enzimas de importância industrial destacam-se: amilases, celulases, lipases, pectinases e proteases (Rodarte *et al.*, 2011, Teixeira *et al.*, 2011, Orlandelli, 2012, Araújo, 2015, Silva *et al.*, 2018).

Considerando as aplicações biotecnológicas e o potencial de produção de enzimas por actinobactérias o presente trabalho tem por objetivo avaliar a atividade enzimática das actinobactérias provenientes do acervo da Micoteca DPUA (Departamento de Parasitologia da Universidade do Amazonas – UA).

## Material e Métodos

Neste trabalho foram avaliadas cinco linhagens de actinobactérias, cedidos pela Coleção de Cultura DPUA, da Universidade Federal do Amazonas-UFAM. As amostras que estavam preservadas em água destilada foram reativadas e autenticadas em meio de cultura ISP2-A (amido, extrato de levedura, extrato de malte, dextrose, ágar) em pH 7,3 e mantidos em placas de Petri a 30 °C, por até cinco dias. Uma vez confirmada a pureza das colônias, as amostras foram mantidas em tubos contendo ISP2-A, inclinado (Oliveira, 2007).

Após o processo de autenticação foi realizada a caracterização das actinobactérias com base nas características morfológicas (micélio aéreo, micélio vegetativo, determinação de cores, presença de pigmento, exsudato, aspecto das bordas) com auxílio de um microscópio estereoscópio modelo XR-X-3000. Para determinação das características microscópicas, as actinobactérias foram semeadas no meio ISP2-A, em placas de Petri, em estrias formando duas linhas horizontais e duas verticais, constituindo intercessões entre si. Em seguida, em cada cultivo foram inseridas lamínulas em posição parcialmente inclinada para o crescimento sobre a superfície das mesmas. Em intervalos de cinco dias durante 15 dias, as lamínulas foram retiradas para o acompanhamento do crescimento micelial por meio da observação em microscopia óptica. A leitura foi realizada em microscópio óptico com aumento de 400 x (Oliveira, 2007).

Na determinação da atividade das enzimas pela técnica do bloco de gelose, as actinobactérias foram cultivadas em ISP2-A, pH 7,3. Para avaliação da ação das enzimas pela difusão em ágar por poço foram utilizados os seguintes meios (g/L): (1) ágar amido (ágar: 18 g, amido solúvel: 10 g e Tampão Acetato de Sódio, pH 5,0,); (2) ágar celulase (ágar: 18 g, carboximetilcelulose (CMC) 10 g e Tampão Acetato de Sódio (pH 5,0); (3) ágar lipase (ágar nutriente: 20 g, CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O: 0,1 g, Tween 80: 10,0 mL e H<sub>2</sub>O destilada 990 mL); (4) ágar pectina (ágar: 18 g, pectina: 10 g, e Tampão Acetato de Sódio (pH 5,0) e, ágar leite (leite em pó desnatado: 50 g, ágar nutriente: 10 g e H<sub>2</sub>O destilada).

Dos cultivos das actinobactérias em ISP2-A foi retirado um disco micelial medindo seis milímetros de diâmetro e inoculado centralmente na superfície de ágar amido, ágar celulose, ágar leite e ágar pectina. A cada 24 horas de crescimento foram observadas a formação do halo de degradação ao redor da colônia e, após cinco dias foi medido o diâmetro do halo de hidrólise em milímetro para expressão da atividade enzimática, Equação I (Palheta *et al.*, 2011; Teixeira *et al.*, 2011). A atividade amilolítica, celulolítica e pectinolítica foi avaliada após revelação com vapores de iodo, solução de vermelho do congo 0,1% (p/v) e solução de ácido clorídrico 5N, respectivamente.

$$\text{Equação I: Atividade Enzimática (A)} = \frac{\text{Diâmetro do halo de hidrólise}}{\text{Diâmetro da colônia}}$$

Os discos miceliais retirados dos cultivos em ISP2-A foram inoculados em 50 mL de MPE líquido (farinha de soja, glicose, NaCl, CaCO<sub>3</sub>), em frascos de Erlenmeyer de 125 mL. Os cultivos foram mantidos a 30 °C, a 200 rpm. Após 72 horas, o extrato bruto foi recuperado por filtração a vácuo em papel de filtro Whatman n° 1 (Sastry *et al.*, 2003). Após a inoculação das amostras, as placas foram mantidas a 30 °C por 24 horas. A atividade amilolítica, celulolítica e pectinolítica foi avaliada após revelação com vapores de iodo, solução de vermelho do congo 0,1% (p/v) e solução de ácido clorídrico 5N, respectivamente (Kasana *et al.*, 2008; Molina *et al.*, 2001; Lima, 2006; Teixeira *et al.*, 2011). A atividade das enzimas foi determinada como índice enzimático (I), conforme Lima (2006) e Palheta *et al.* (2011), Equação II:

$$\text{Índice enzimático (I)} = \frac{\text{Diâmetro do halo de hidrólise}}{\text{Diâmetro do cup-plate}}$$

## Resultados e Discussão

Os resultados demonstraram que as actinobactérias expressaram as características morfológicas viáveis conforme descrito por Silva-Vinhote *et al.* (2011). Para autenticação foi efetuada a caracterização morfológica por meio da observação da coloração de colônias e morfologia de hifas sob microscópio óptico. Nos primeiros cinco dias foram verificados que alguns micro-organismos desenvolveram micélio vegetativo predominando a cor creme e posteriormente branca, além de difusão de pigmentos no meio de coloração amarela (Figura 1).

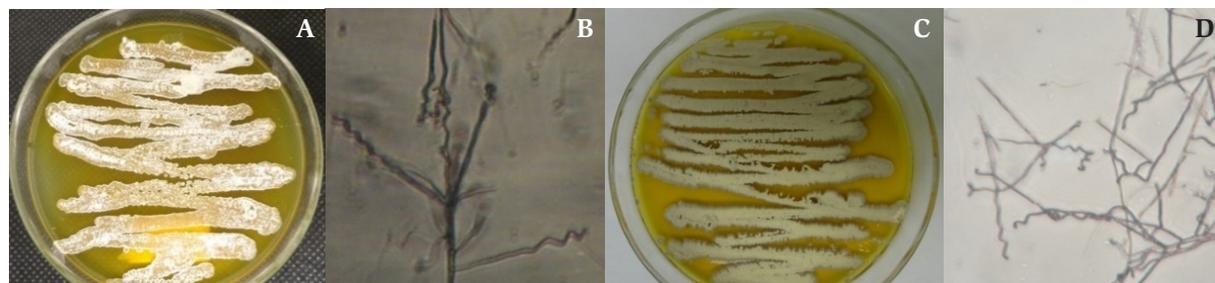
A identificação com base nas características microscópica dos micro-organismos foi realizada de cinco em cinco dias após o crescimento nas lamínulas, onde foi possível observar a presença de micélio altamente ramificado e em forma espiral, já no décimo quinto dia de cultivo foram autenticadas características das bactérias como pertencentes ao gênero *Streptomyces* (Tabela 1).

De acordo com Azuma (2011), as bactérias filamentosas podem apresentar irregularidades quanto à aparência, como superfície levemente dobrada, com coloração que varia entre branca, creme, laranja ou cinza claro, e em relação à micromorfologia, pode-se observar longas hifas ramificadas com filamentos que podem ser retos a ondulados, além disso, os filamentos podem sofrer ramificação.

Segundo Strobel *et al.* (2004) são consideradas colônias típicas de *Streptomyces* sp. as que apresentarem coloração branco-acinzentada, sem brilho, com aparência pulverulenta ou cotonosa com adesão colonial penetrando fortemente no Ágar.

Os resultados demonstraram a produção da atividade celulolítica e proteolítica, sendo que a amostra (A26) apresentou o maior índice na atividade. Não foram observadas atividades para produção das enzimas amilolíticas, pectinolíticas e lipolíticas (Tabela 2).

As celulases têm sido investigadas principalmente pelo seu uso industrial na bioconservação da biomassa na agricultura e em aditivos para detergentes. Proteases constituem um dos mais importantes



**Figura 1.** (A e C) aspecto de colônias de *Streptomyces* variando a coloração do micélio de branco para cinza claro com produção de pigmento; (B e D) aspecto da hifa em pequenos espirais. Fonte: Arquivo pessoal.

**Tabela 1.** Características macroscópicas e microscópicas das actinobactérias cultivadas em ISP2-A.

Amostras	Actinobactérias autenticadas	Características Macroscópicas	Características Microscópicas
A8	<i>Streptomyces</i> sp.	Colônias aderidas firmemente ao ágar, bordas rugosas, pigmento amarelo difundido com o meio e produção de exsudados.	Conjuntos de hifas em pequenas ondulações formando pequenos espirais.
A10	<i>Streptomyces</i> sp.	Micélio aéreo cinza escuro, reverso das colônias levemente fragmentadas, bordas enrugadas, não produz pigmentos.	Hifas espaçadas com formato de espículas com fragmentações.
A18	<i>Streptomyces</i> sp.	Micélio branco sem alteração na coloração, não produz pigmentos.	Micélio com leves ondulações em sua estrutura final.
A20	<i>Streptomyces</i> sp.	Micélio aéreo marrom escuro, forte odor, não produz pigmentos, bordas rugosas e produção de esporos.	Conjunto de hifas ramificadas com leves ondulações em espirais.
A26	<i>Streptomyces</i> sp.	Colônias unidas sem fragmentação, reverso creme, micélio marrom terra, produz forte odor, não produz exsudados, bordas rugosas e sobrepostas.	Micélio em espirais sobrepostos com presença de esporos.

**Tabela 2.** Atividade Enzimática de *Streptomyces* spp em meio sólido.

Actinobactérias ( <i>Streptomyces</i> sp.)	Atividade Enzimática									
	Técnica do Bloco de Gelose					Técnica de difusão em ágar por poço (l)				
	Ami	Cel	Lip	Pct	Pro	Ami	Cel	Lip	Pct	Pro
A8	nd	1,6	nd	nd	nd	nd	2,4	nd	2,8	3,5
A10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2,6	nd	2,5	3,5
A18	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2,3	nd	3,2	3,5
A20	nd	2,1	nd	nd	2,1	nd	2,1	nd	3,3	3,6
A26	nd	2,6	nd	nd	3,0	1,9	2,6	nd	2,6	3,1

(nd) Não determinado. Ami=Amilases; Cel=Celulases; Lip=Lipases; Pct=Pectinases; Pro=Proteases

grupos de enzimas industriais, os quais são usados em alimentos, produtos farmacêuticos, na indústria de couro. Economicamente as proteases são produzidas por espécies de *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. e *Pseudomonas* sp., entre as actinobactérias os *Streptomyces* sp. (Cherry e Idantsef, 2003).

Para avaliação das enzimas de interesse foram utilizados também os extratos brutos das actinobactérias. Destacando-se na hidrólise dos substratos para a atividade celulolítica e proteolítica, sendo que na atividade proteolítica 100% dos extratos obtidos hidrolisaram o substrato. Santos (2010) em seu estudo isolou 166 actinobactérias, onde 88 destes apresentaram atividade degradando a carboximetilcelulose. Em seu estudo Rodrigues (2006) constatou que o gênero que mais se mostrou ativo foi *Streptomyces*, onde 67% dos isolados apresentaram atividade celulolítica e 97% ativos para produção de protease, corroborando com este estudo. Além disso, houve ação de mais de uma enzima na degradação dos substratos utilizados com destaque para o micro-organismo (A26) que apresentou atividades para (amilase, celulase, pectinase e protease) variando de 1,9 a 3,1 o índice enzimático (Tabela 02).

Entre as enzimas produzidas por técnicas biotecnológicas, aquelas com atividade amilolítica apresentam um papel importante na indústria de alimentos, pois a maioria dos processamentos industriais do amido envolve a hidrólise desse polímero, que passa então a ser convertida em xaropes de glicose, maltose, frutose, maltotetrose, dextrinas e ciclodextrinas. Cada tipo de xarope requer diferentes tipos de enzimas amilolíticas (Gomes *et al.*, 2007).

Estudos vêm apontando as actinobactérias como fontes emergentes promissoras de uma ampla faixa de importantes enzimas de interesse industrial e ambiental, como as envolvidas na degradação de materiais lignocelulósicos (Goodfellow *et al.*, 1988; Flores *et al.*, 1997).

Desta forma, os resultados demonstraram que nos testes realizados com Extrato Bruto através da Fermentação Submersa das actinobactérias, houve uma quantidade maior de enzimas hidrolisadas (amilase, celulase, pectinase e protease), além disso, o Índice Enzimático neste teste também foi superior.

## Conclusões

As actinobactérias reativadas mostraram-se viáveis e expressaram as características morfológicas típicas predominantemente do gênero *Streptomyces*.

Dentre os microrganismos as amostras A20 e A26, apresentaram os maiores índices enzimáticos.

O processo de Fermentação Submersa associado à técnica de difusão em ágar por poço demonstra a eficácia na determinação da atividade enzimática comparado à técnica do Bloco de Gelose.

Representantes do gênero *Streptomyces* são fontes promissoras de importância industrial.

## Referências

Araújo MAM 2015. *Isolamento e seleção de leveduras para produção de enzimas de interesse industrial a partir de frutos do cerrado*. 67 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Católica Dom Bosco. Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

- Azuma MVP 2011. *Actinobactérias com Potencial Biotecnológico Isoladas da Região entre-marés da Ilha do Mel, PR, Brasil*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba.
- Cherry JR, Fidantsef AL 2003. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, 14: 438-443.
- Coelho RRR, Nascimento RP 2008. Seleção de actinomicetos produtores de interesse biotecnológico. In: Bom EPS, Ferrara MA, Corvo ML, Vermelho, AB, Paiva CLA, Alencastro RB, Coelho RRR (Org.). *Enzimas em Biotecnologia. Produção, Aplicações em Mercado*. Rio de Janeiro: Editora Interciência Ltda, p. 71-94.
- Fiedler HP. *et al.* 2005. Proximicin A, B and C, novel aminofuran antibiotic and anticancer compounds isolated from marine strains of the actinomycete *Verrucosisspora*. *J Antibiot.* 61: 158–163.
- Flores ME, Pérez R, Huitrón C 2007.  $\beta$ -Xylosidase and xylanase characterization and production by *Streptomyces* sp. CH-M-1035. *Letters in Applied Microbiology*, 24:410-416,
- Gomes E., Guez M, Martin N, Silva R 1997. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Química Nova*, 30(1):136-145.
- González I, Ayuso-Sacido A, Anderson A, Genilloud O 2005. Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 54:401-15.
- Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M 1988. *Actinomycetes in Biotechnology*. M. Goodfellow, ST, Williams e M. Mordarski (Eds.). Academic Press, London.
- Kasana RC, Salwan R, Dhar H, Gulati A 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. *Current Microbiology*, 57:503-507.
- Kurtboke DI, Swings J, Storms V 2010. Biodiscovery from microbial resources: Actinomycetes leading the way. *Official Journal of the Astralian Society for Microbiology*, 31(2):57.
- Lima ARS 2006. Produção de pectinases por *Aspergillus* e classificação de suco de camu-camu com poligalacturonases e pectinesterases. Araluze Regina de Souza Lima: UFAM, 85p. II. Manaus.
- Molina SMG, Pelissari FA, Vitorello CBM 2001. Screening and genetic improvement of pectinolytic fungi for degumming of textile fibers. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32: 320-326.
- Orlandelli R.C *et al.* 2012. Enzimas de Interesse Industrial: produção por fungos e aplicações *Rev. Saúde e Biol.*, 7(3):97-109.
- Oliveira SR 2007. *Atividade antagônica de actinomicetos contra Botrytis cinérea, patógeno da videira (Vitis SP)*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Antibióticos. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, p.495–548.
- Palheta RA, Kirsch LS, Neves KCS, Machado ARG, Brito E Teixeira LS, Macedo AJP 2011. Enzimas e aplicações biotecnológicas. In: Teixeira M.F.S, Silva T.A, Carneiro A.L.B, Atayde H.M (Org.). *Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada (aplicações biotecnológicas)*. Manaus: EDUA, p. 126-153.
- Rodarte PM, Nimmagadda A, Vilela DM, Schwan RF 2011. Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.). *Acta Scientiarum. Agronomy*, Maringá, 33(3):457-464.
- Rodrigues K 2006. *Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos de isolados de actinomicetos*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e do Ambiente). Faculdade de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- Santos DB 2010. *Bioprospecção de Micro-organismos produtores de celulase de resíduos do sisal*. Dissertação (Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.
- Sastry M, Ahmad A, Khan M, Kumar R 2003. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and Actinomycete. *Current Science*, 85(2):25.
- Silva BCR, Gois IM, Bispo DF, Marques J, Silva CF 2018. Isolamento e seleção de micro-organismos produtores de enzimas de interesse comercial. *Scientia Plena*, 14(2). doi: 10.14808/sci.plena.2018.024201.
- Silva-Vinhote NM, Marinho-Pereira T, Astolfi-Filho S, Matsuura T 2011. Taxonomic Characterization and Antimicrobial Activity of Actinomycetes Associated with Foliose Lichens from the Amazonian Ecosystems. *Australian J. Basic Appl. Sci.* 5:910-918.
- Strobel G, Daisy B, Castillo U, Harper J 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.* 67:257–268.
- Teixeira MFS, Amorim T, Palheta RA, Atayde HM 2011. *Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada (aplicações biotecnológicas)*. Manaus: EDUA. v.1. p. 224.

## Atividade antimicrobiana de microrganismos promissores em diferentes condições de cultivo

Ivanete Ferreira de Souza<sup>1</sup>, Isaque Ferreira da Silva<sup>1</sup>, Rosângela Santana Martins de Matos<sup>1</sup>, Waléria Dasso Pinheiro<sup>1</sup>, Ingrid Reis da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pesquisadores do Centro de Biotecnologia da Amazônia. Emails: ivaf300@gmail.com, ingridreis.alvrinho@gmail.com

### Resumo

Os microrganismos são fontes potenciais para descobertas de novas moléculas biotivas que são importantes para o desenvolvimento novos agentes biotecnológicos como os antibióticos que enfrentam atualmente resistência microbiana por conta do uso indiscriminado. Objetivo do trabalho foi avaliar a melhor fonte de carbono e determinar o tempo de crescimento ideal para produção de molécula bioativa. Foram analisados preliminarmente 300 isolados da Coleção de Microrganismos do Centro de Biotecnologia da Amazônia dos quais selecionou-se os 4 mais promissores entre fungos e bactérias. A metodologia empregada para a análise antagonista foi o método de difusão em ágar utilizando-se as cepas de referência *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 10231, *Bacillus cereus* ATCC 1778, *Serratia marcescens* ATCC 14756, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Mycobacterium smegmatis* e *Burkholderia cepacia* e para identificação das cepas o método de GRAM e a técnica de microcultivo. Na avaliação da melhor fonte de carbono fez-se cultivos contendo glicerol, glicose, amido e arroz durante 24h, 48h e 120h para bactérias a 30°C sob agitação a 150 rpm e 5, 10 e 15 dias para fungos a 24°C. Os isolados mais promissores entre as bactérias foram o CBA1844, CBA1848 e CBA1856 que apresentaram os melhores halos de inibição para os patógenos *C. albicans*, *M. smegmatis* e *S. aureus* e entre os fungos o isolado de CBA 21601 que apresentou inibição aos patógenos *S. aureus*, *B. cereus*, *S. marcescens*, *E. coli*, e *K. pneumoniae* somente no caldo batata, não demonstrando produção de metabólito inibidor nos outros cultivos. As melhores condições para crescimento das bactérias e produção da biomolécula foi detectada nos cultivos contendo glicerol e glicose durante 24 e 48 horas e a identificação morfológica indica que as bactérias são GRAM positivas e que o fungo é um *Penicillium* spp.

**Palavras-chave:** antibiose, Amazônia, isolados.

### Introdução

Microrganismos colonizam com sucesso cada nicho ecológico possível do planeta e são capazes de utilizar diversos meios e estratégias competitivas para sobreviverem (Silva, 2008; Pan *et al.*, 2010). Geralmente são associados a graves doenças que podem desencadear, porém são potenciais produtores de medicamentos, como os antibióticos que ajudam a salvar milhares de vidas (Conti *et al.*, 2012). Além disso, representam uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento econômico sustentável (Oliveira *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2010).

Uma das propriedades mais importantes dos microrganismos está associada a sua capacidade metabólica de produzir uma grande diversidade de moléculas bioativas muitas delas derivadas de seu metabolismo primário e secundário como os antibióticos, antifúngicos, pigmentos, certas toxinas e feromônios (Li e Strobel, 2001; Moraes, 2004; Souza *et al.*, 2004;).

Todos os organismos vivos crescem e se reproduzem utilizando rotas metabólicas muito semelhantes, ou até idênticas, para a geração de energia além das rotas metabólicas semelhantes utilizadas pelos microrganismos para sua sobrevivência, existem outras rotas que lhes possibilita a produção dos mais diversos tipos de compostos, como os metabólitos secundários. Os fatores que desencadeiam a produção destes metabólitos geralmente estão ligados à escassez de algum nutriente essencial como carbono, nitrogênio ou fosfato (Vining, 1986; Heck, 2007; Ochi, 2007), o que consolida a investigação aprofundada destas formas de crescimento e produção de biomoléculas.

Atualmente a resistência bacteriana aos antibióticos é um dos problemas de saúde pública mais relevantes a nível global, dado que apresenta consequências clínicas e econômicas preocupantes, estando associada ao uso inadequado de antibióticos (Loureiro *et al.*, 2016). Desta forma, tecnologias na busca por metabólitos bioativos devem ser melhoradas e implantadas para que surjam novas alternativas para tratamento de infecções causadas por microrganismos sendo o objetivo desta pesquisa avaliar a produção de moléculas bioativas produzidas por microrganismos frente a diversos patógenos utilizando diferentes fontes de carbono e tempos de cultivo.

## Material e Métodos

Os microrganismos avaliados são bactérias e fungos endofíticos depositados na Coleção de Microrganismos do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) que foram isolados de amostras de plantas e solo no Laboratório de Microbiologia desta instituição. Dentre esses microrganismos realizou-se a análise preliminar da atividade antimicrobiana dos metabólitos produzidos por 100 bactérias e 200 metabólitos fúngicos. A partir desta análise selecionou-se três isolados bacterianos e 1 isolado fúngico que apresentaram os melhores resultados para elaboração desta pesquisa.

As bactérias preservadas em glicerol 50% a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , foram reativadas no meio de cultura ágar Luria Bertani (LB) 50% por estrias cruzadas e incubadas a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24h e após o crescimento inicial, preparou-se o pré-inóculo com as cepas no meio LB líquido nas mesmas condições de cultivo. Os fungos preservados em água destilada (Castellani, 1939) foram reativados em ágar batata dextrose (BDA) por 7 dias a  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

A identificação morfológica das bactérias foi realizada conforme a técnica de coloração de GRAM e a dos fungos pela técnica de microcultivo em lâminas (Konemam *et al.*, 2001).

Os isolados fúngicos primeiramente foram cultivados em placa de Petri contendo meio BDA e incubados a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 dias. Fragmentos de 5mm de diâmetro deste cultivo foram transferidos asépticamente para Erlenmeyers contendo 100 mL de uma solução de sais composta por  $\text{KNO}_3$  (2g/L), caseína (0,3g/L), NaCl (2,0 g/L),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (2,0 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2,0 g/L),  $\text{MgSO}_4$  (0,1 g/L),  $\text{CaCO}_3$  (0,1 g/L) e 0,001 (g/L) de  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$  e  $\text{MnCl}_2$ . As fontes de carbono avaliadas (10g/L) foram amido, arroz, glicerol e glicose.

Os frascos contendo fungo foram incubados a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 dias em B.O.D de modo estático e a cada 5 dias foram retiradas alíquotas de 2 mL para realização dos ensaios.

As bactérias cresceram em meio LB e incubadas a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 18 h a 150 rpm. Adicionou-se 5% deste inóculo nos frascos contendo 100 mL da solução de sais e uma das fontes de carbono e incubou-se em agitador horizontal a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24h a 150 rpm por 5 dias. Deste cultivo, retirou-se alíquotas de 2 mL após 24h, 48h e 120h, que foram centrifugadas sob refrigeração a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 8 minutos a 11.000 rpm (Centrifuge 5417R-Eppendorf). Como controle positivo das atividades verificadas fez-se cultivo das linhagens nos meios LB e BD.

Os microrganismos utilizados como indicadores no teste de antibiose foram cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 10231, *Serratia marcescens* ATCC 14756, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Escherichia coli* ATCC 25922 e os isolados clínicos *Burkholderia cepacia* e *Micobacterium smegmatis*. Estes microrganismos foram cultivados previamente em caldo LB por 16h e diluídos em solução salina a 0,9% conforme padronização com tubo 0,5 da escala McFarland.

Este ensaio foi realizado conforme a técnica de difusão em ágar (Bauer e Kirby, 1966) utilizando-se placas de Petri contendo Ágar Mueller-Hinton nas quais espalhou-se o inóculo das bactérias indicadoras previamente diluído com o auxílio de swabs estéreis em cada placa. Nestas, fez-se 5 orifícios de 6mm de diâmetro no meio, onde adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  do metabólito referente ao microrganismo e sua condição de cultivo avaliada. Posteriormente fez-se a incubação das placas a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24h e a leitura dos halos de inibição.

## Resultados e Discussão

Foram realizadas análises de atividade antimicrobiana nos metabólitos obtidos das colônias fúngicas e bacterianas depositadas na coleção de culturas do CBA. Com exceção da indicadora patogênica *B. cepacia*

foram verificados resultados positivos para todas as ATCC's avaliadas diante dos metabólitos fúngicos e bacterianos como observado na tabela 1. Entre os resultados positivos, 20 bactérias apresentaram atividade antimicrobiana contra os patógenos testados concentrando o maior número de inibições para *S. aureus* e *M. smegmatis*. Na análise dos fungos filamentosos, obteve-se 53 resultados positivos de ação antagonista aos diferentes patógenos testados, obtendo-se assim o maior número de inibições para *S. aureus*.

A partir dos resultados preliminares de atividade antimicrobiana foram selecionados entre as bactérias, os isolados CBA 1844 e CBA 1856 que melhor inibiram os patógenos *C. albicans* e *M. smegmatis* e o isolado CBA 1848 que inibiu a *M. smegmatis* e *S. aureus*. Entre os fungos selecionou-se o isolado CBA 21601 que inibiu as bactérias *S. aureus*, *B. cereus*, *K. pneumoniae*, *E. coli* e *S. Marcescens*.

Os isolados selecionados foram cultivados em diferentes fontes de carbono para verificação de qual destas favorecia uma melhor produção de moléculas bioativas. Das quatro fontes testadas o glicerol, a glicose e o arroz apresentaram os maiores halos de inibição em 24 horas de cultivo para as bactérias CBA 1844 e CBA 1848. Considerando os resultados de outros testes de atividade realizados como atividade antitumoral e enzimática destes microrganismos, selecionou-se como melhor fonte de carbono o glicerol para análises posteriores, embora para a atividade antimicrobiana a glicose promova uma melhor produção da molécula inibidora.

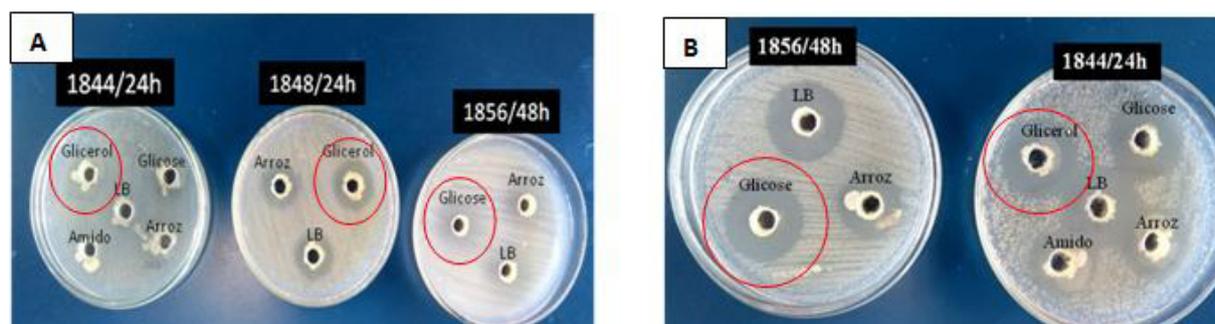
A bactéria CBA1856 obteve melhores resultados de inibição contra *C. albicans* e *M. smegmatis* após 48 horas de cultivo em meio contendo glicose como fonte de carbono (Tabela 2).

Nenhuma fonte de carbono avaliada foi eficaz para melhorar a produção da substância antimicrobiana de interesse pelo fungo selecionado, o qual apresentou atividade inibidora de amplo espectro quando cultivado em caldo BD após 5 dias de incubação como verificado na figura 3.

Uma vez identificada a condição ideal para a produção da substância antimicrobiana, um novo ensaio foi realizado para confirmação dos resultados obtidos. Na inibição de *M. smegmatis* foi verificada atividade bacteriostática das bactérias CBA 1844 e CBA 1856 e bactericida da bactéria CBA 1848. A inibição de *C. albicans* pelas bactérias CBA1844 e CBA1856 foi confirmada com alta inibição nos meios contendo a fonte de carbono correspondente (figura 1-A e 1-B). Quando comparado ao halo de inibição preliminar (1,8cm) obteve-se um pequeno aumento da inibição da bactéria CBA1848 de *S. aureus*, tanto quanto cultivado em caldo LB, quanto no meio contendo glicerol, apresentando halos de 2, 4cm (figura 2).

**Tabela 1.** Atividade antimicrobiana de fungos e bactérias da Coleção do CBA com diferentes patógenos

Dados da atividade antimicrobiana das bactérias e fungos								
Microorganismo	<i>C. albicans</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>S.aureus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.marcescens</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>M.smegmatis</i>
Bactérias	10	0	2	1	0	0	0	7
Fungos	2	3	33	6	2	4	4	4

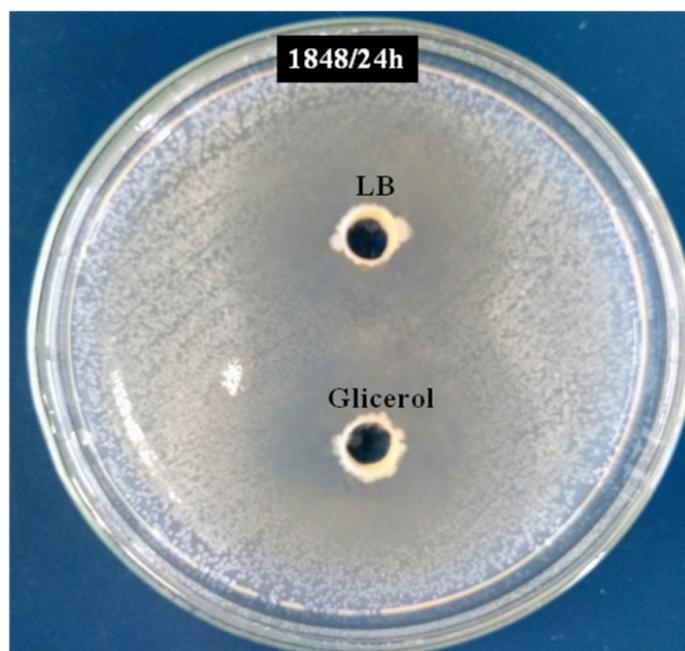


**Figura 1.** Atividade antimicrobiana dos isolados: A- Inibição a *M. smegmatis* nas melhores fontes de carbono; B- Atividade antimicrobiana contra *C. albicans* dos isolados CBA1844 e CBA1856 nas melhores condições de crescimento.

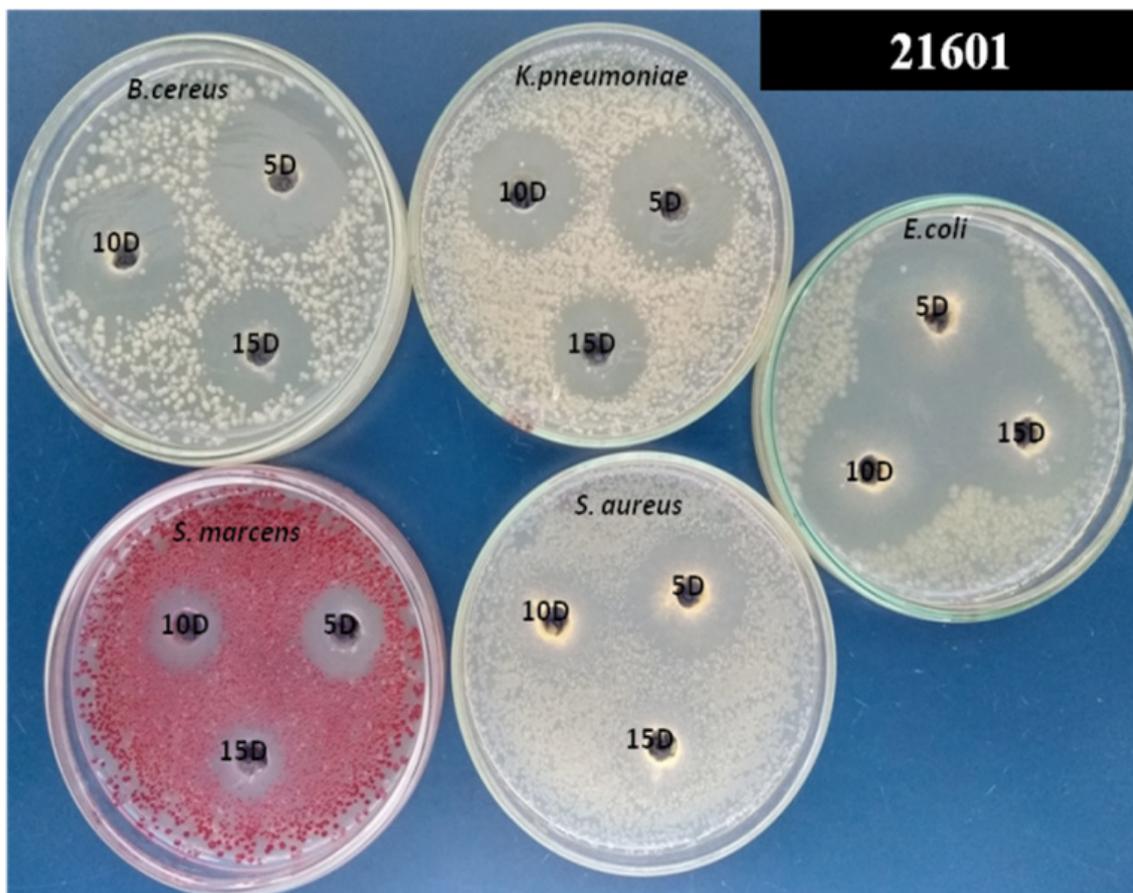
**Tabela 2.** Dados preliminares da atividade antimicrobiana dos isolados selecionados de duas variáveis de cultivo.

Nº do isolado	Tempo (h)	LB			Glicerol			Glicose			Arroz			Amido		
		Patógenos			Patógenos			Patógenos			Patógenos			Patógenos		
		<i>C. albicans</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>S. aureus</i>
1844	24	+++	+		+++	-		+++	+		+++	-		+	+	
	48	+++	+	AAI	+	-	AAI	+++	+	AAI	+++	-	AAI	+	+	AAI
	120	+++	+		+	-		+++	+		++	+		+	+	
1848	24		+++	+++		+++	+++		+++	+++		++	+		+++	+++
	48	AAI	+++	+++	AAI	++	+++	AAI	+++	+++	AAI	++	+	AAI	+	+++
	120		++	+++		+++	+++		+++	+++		+++	-		++	+++
1856	24	+++	+		+	-		+++	+		++	+		+	+	
	48	+++	+	AAI	+	-	AAI	+++	+	AAI	++	+	AAI	+	+	AAI
	120	+++	-		+	-		+++	+		++	+		+++	+	

Alta (+++): diâmetro do halo de inibição superior a 1,7cm;  
 Moderada (++) : diâmetro do halo de inibição entre 1,3cm a 1,6cm;  
 Baixa (+): diâmetro do halo entre 0,7cm a 1,2 cm;  
 Negativa: ausência de halo de inibição;  
 +\*: atividade bacteriostática;  
 AAI: atividade antimicrobiana inexistente.

**Figura 2.** Atividade antimicrobiana do isolado N1848 contra *S. aureus* na melhor condição de crescimento.

No cultivo do isolado CBA 21601 nenhuma das fontes de carbono produziu antibiose contra os microrganismos-testes, sendo verificados halos de inibição classificados como altos somente no metabólito do cultivo em caldo batata durante 5 dias de crescimento como pode observado na figura 3.



**Figura 3.** Atividade antimicrobiana do fungo CBA21601 contra os patógenos *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. marcescens* e *K. pneumoniae* em cultivo em BD conforme o tempo de crescimento (em dias).

As análises para identificação morfológica dos microrganismos indicaram que os três isolados bacterianos são cocos Gram positivos e que o isolado fúngico pertence ao gênero *Penicillium* sp.

Foi realizada uma seleção primária com 300 microrganismos da Coleção de Microrganismos do CBA, onde esses isolados foram avaliados quanto a sua atividade antimicrobiana. Inicialmente os microrganismos avaliados, foram crescidos em caldo LB para as bactérias e BD para os fungos, onde foram avaliados frente a diversos microrganismos patogênicos. Destes resultados foi possível selecionar os melhores produtores de antibiose conforme o tamanho dos halos e posteriormente seguiu-se o estudo para determinação do melhor tempo de incubação e fonte de carbono para cultivo dos microrganismos promissores.

Conforme Pereira e Oliveira (2016) as condições ambientais como concentração de oxigênio dissolvido no meio fermentativo, concentração da biomassa, volume de cultura, concentração de dióxido de carbono no meio, pH, temperatura de fermentação são importantes parâmetros a serem verificados na produção de moléculas bioativas

Muitos trabalhos relacionados ao tema fortalecem a necessidade identificar as melhores condições ambientais para produção de antimicrobianos (Oskay, 2011; Serrano, 2014; Silva *et al.*, 2016).

Silva (2012) ao verificar a produção de antimicrobianos produzidos por *Streptomyces* sp., constatou que as condições ambientais e do substrato influenciam diretamente na produção de antimicrobianos.

Linhagens do fungo *Penicillium* spp são conhecidas devido ao seu grande potencial para produção de antimicrobianos (Patrick, 2001) e estudos referentes a descoberta de novos metabólitos secundários produzidos por este microrganismo como os de Petit *et al.* (2009) confirmam essa necessidade.

## Conclusões

Os metabólitos testados apresentaram as melhores inibições em cultivos de curta duração (24 horas para bactérias e 5 dias para fungos);

As melhores fontes de carbonos para cultivo e produção de antimicrobianos para bactérias foi o glicérol e a glicose.

O caldo BD é o meio de cultivo mais eficiente para produção de moléculas biativas para o fungo analisado.

## Agradecimentos

Ao INMETRO, ao MDIC e a SUFRAMA pelo apoio financeiro e estrutural.

## Referências

- Castellani A 1939. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Orford*, 42(3):225-226.
- Conti R, Guimarães DO, Pupo MT 2012. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. *Ciência e Cultura*, 64(3): p. 43-47.
- Heck MG 2007. *Produção de compostos antimicrobianos provenientes do metabolismo de Streptomyces sp. Linhagem 2S*. Porto Alegre, Brasil. (M.Sc. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul) 104p.
- Koneman E 2001. Diagnóstico microbiológico. Rio de Janeiro: MEDSI. p 996-1020.
- Li JY, Strobel GA 2001. Jesterone and Hydroxy-Jesterone Antioomycete Cyclohexenone Epoxides from the Endophytic Fungus *Pestalotiopsis jesteri*. *Phytochemistry*, 57(2): p. 262- 265.
- Loureiro RJ, Roque F, Rodrigues AT, Herdeiro, MT; Ramalheira, E 2016. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 34 (1): p.77-84.
- Morais L 2004. *Antagonismo de bactérias endofíticas amazônicas a diferentes bactérias*. Manaus, Brasil (MSc. Dissertação. Universidade Federal do Amazonas.UFAM). 104p.
- Oliveira VM, Sette LD, Fantinatti-Garbozzini F 2004. Construindo a História dos Produtos Naturais, v. 7.
- Ochi K 2007. From microbial differentiation to ribosome engineering. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71:1383-1386.
- Oskay M 2011. Effects of some Environmental Conditions on Biomass and Antimicrobial Metabolite Production by *Streptomyces Sp. KGG32*. *International Journal of Agriculture & Biology*, 13(3):317-324.
- PAN SY, PAN S, YU ZL, MA DL, CHEN SB, FONG WF, HAN YF, KO KM 2010. New Perspectives on Innovative Drug Discovery: An Overview. *Journal of Pharmacia Pharmaceut Sci*,13(3): p. 450 – 471.
- Patrick GL 2001. *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 2nd ed., University Press: Oxford.
- Petit P, Lucas EMF, Abreu LM, Pfenning LH, Takahashi JA 2009. Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium sp.* isolated from Brazilian cerrado soil *Electronic Journal of Biotechnology*, 12 (4)
- Serrano, NF 2014. *Produção de compostos antimicrobianos por Paenibacillus polymyxa RNC-D: otimização das condições de cultivo, purificação e caracterização dos produtos*. São Carlos, Brasil. (Dr. Tese Universidade Federal de São Carlos).123p.
- Silva NMV 2008. *Caracterização taxonômica e atividade antimicrobiana de actinomicetos associados a líquens folhosos de ecossistemas amazônicos*. Manaus, Brasil. (M.Sc. Dissertação. Universidade Federal do Amazonas. UFAM). 52p.
- Silva IR 2012. *Produção de compostos antimicrobianos produzidos por actinomicetos*. Manaus, Brasil. (M.Sc. Dissertação. Universidade Federal do Amazonas.UFAM). 94p.
- Silva JM 2016. Atividade antimicrobiana de moléculas bioativas produzidas por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 frente a *Staphylococcus Spp.* multirresistentes de mastite bubalina. *Pesquisa veterinária Brasileira*, 36 (9): p.805-810.
- Souza AQL Souza ADL Astolfi-Filho S, Belém-Pinheiro ML, Sarquis MIM, Pereira JO. 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazonica*, 34 (2):185 – 195.
- Vining LC 1986. Secondary metabolism. In: Rehm, H. J.; Reed, G. *Biotechnology: a comprehensive treatise*, 4:19-38.

## Avaliação do possível efeito imunomodulador de exopolissacarídeos de *Pleurotus eryngii* em linhagem de hepatócitos (Huh-7) infectados pelo vírus Dengue

Marjory Michely Martins de Souza<sup>1</sup>, Aldiane Passos de Oliveira<sup>1</sup>,  
Raimundo Sousa Lima Junior<sup>2</sup>, Larissa de Souza Kirsch<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduada em Ciências Biológicas - Universidade do Estado do Amazonas - Escola Normal Superior

<sup>2</sup>Dr (a). Professor (a) - Universidade do Estado do Amazonas - Escola Normal Superior

Emails: marjorym.bio@gmail.com, aldianep.bio@gmail.com, rsjunior@uea.edu.br, l\_kirsch@hotmail.com.

### Resumo

A dengue é um grave problema de saúde pública, provocando altos índices de morbidade e mortalidade, gerando impactos econômicos na sociedade na tentativa de minimizar esses índices. O vírus tem como alvo, algumas células do sistema imunológico, como células dendríticas, macrófagos, monócitos, células endoteliais e hepatócitos também são atingidas. Não existe ainda nenhuma opção terapêutica eficaz para tratar e/ou atenuar os sintomas causados pelo dengue. Trabalhos científicos com fungos do gênero *Pleurotus* vêm demonstrando excelentes resultados terapêuticos como ações antivirais, antiartrítica e anticancerígena, utilizando os exopolissacarídeos (EPS) produzidos por eles. Desta forma o objetivo deste foi avaliar *in vitro* o possível efeito imunomodulador de *Pleurotus eryngii* em linhagem de hepatócitos Huh-7 infectados pelo vírus dengue. A pesquisa consistiu em duas etapas: na primeira foi realizado o cultivo do fungo por fermentação submersa para obter a biomassa micelial e o extrato bruto de onde foram extraídos os exopolissacarídeos. Na segunda etapa, o objetivo foi avaliar quais e quantas concentrações de EPS não eram tóxicas para célula para em seguida infectar as mesmas e tratá-las com as concentrações viáveis. Após esse tratamento foi medida a quantidade de IL8 para os resultados de imunomodulação, a extração dos EPS foi realizada com sucesso a partir da fermentação submersa e todas as concentrações testadas foram viáveis á célula. Os resultados revelaram que nenhuma das concentrações demonstrou efeito imunomodulador, pois não foram capazes de reduzir significativamente os níveis da citocina IL-8 no sobrenadante das culturas de Huh-7 infectadas pelo vírus dengue.

**Palavras-chave:** fungos, IL8, sistema imunológico, in vitro, EPS.

### Introdução

A Dengue é considerada a arbovirose mais comum entre os seres humanos e tornou-se de um dos principais problemas de saúde pública mundial em termos morbidade, mortalidade e impactos econômicos (Gubler, 2011). Trata-se de uma doença de caráter endêmicoepidêmico causada pela infecção pelo vírus Dengue (DENV), sendo transmitida pelos mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente pelo *Aedes aegypti*. Esta doença apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, muitas vezes com evolução clínica e resultados imprevisíveis. Enquanto a maioria dos pacientes se recupera após um curso-clínico não grave e de resolução espontânea, uma pequena proporção evolui para a doença grave, caracterizado principalmente por um aumento da permeabilidade vascular com ou sem hemorragias, sendo que neste último há grande risco de morte (Murphy e Whitehead, 2011; Srikiatkachorn *et al.*, 2011). Existem quatro sorotipos para o DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), sendo que a infecção por qualquer um deles pode ou não resultar nas formas graves da doença. Além da dengue, o *Aedes aegypti* pode transmitir os vírus da Zika e Chikungunya, que, apesar de terem sintomas bem parecidos, são doenças que causam problemas bem diferentes.

A mudança no sorotipo predominante é bastante preocupante, pois as pessoas que nunca tiveram contato com este sorotipo encontram-se imunologicamente vulneráveis, o que aumenta as chances de ocorrer uma grande epidemia com casos graves da doença. No Brasil, até 24/03/2018 (Semana Epidemiológica

12), foram registrados 66.425 casos prováveis de dengue em todo o país, sendo que deste total, foram confirmados 522 casos de dengue com sinais de alarme, 45 casos com dengue grave e 19 casos de óbitos. Já para o mesmo período de 2017 a incidência da doença foi maior, pois foram registrados 90.044 casos prováveis da dengue, com confirmação de 1.093 casos de dengue com sinais de alarme, 90 casos com dengue grave e 44 casos de óbitos. Apesar da diminuição da ocorrência da doença, esta ainda se encontra presente em todas as regiões brasileiras, apresentando maior incidência de casos prováveis no Centro-Oeste (162,2 casos/100 mil habitantes) e no Norte (31,8 casos/100 mil habitantes) (Brasil, 2018).

A principal característica dos casos graves de dengue é o aumento da permeabilidade vascular resultando no extravasamento plasmático, diminuição do volume intravascular e, nos casos severos, o choque, embora a gravidade possa ocorrer em pacientes que se infectaram pela primeira vez com o vírus. Pesquisas indicam que vários elementos da resposta imune inata e adaptativa estão envolvidos na patogênese dos casos graves da dengue (Srikiatkachorn, 2009; Srikiatkachorn e Green 2010). Durante a infecção pelo vírus Dengue, ocorre a produção elevada de vários mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas) que são envolvidos no aparecimento dos sintomas da dengue, principalmente, na regulação da função de barreira do endotélio (Bozza *et al.*, 2008). Por esta razão, modelos de infecção *in vitro* ainda são ferramentas muito usadas para o entendimento da doença. Os resultados obtidos em culturas de células primárias e linhagens permanentes infectadas pelo DENV apresentam perfis semelhantes aos dados obtidos em pacientes. Além disso, muitas linhagens permanentes de células humanas têm sido utilizadas para replicação do DENV visando o estudo de receptores, produção de citocinas e modelos antivirais (Bente e Rico-Hesse, 2006).

As mortes causadas pelas infecções virais da dengue representam uma grande preocupação para a saúde pública mundial (Gubler, 2011) e, apesar dos investimentos financeiros e do conhecimento científico terem crescido bastante nos últimos anos, não existe ainda uma vacina licenciada eficiente para os quatro sorotipos (tetraivalente), ou mesmo um agente terapêutico específico para abrandar os sintomas (Simmons *et al.*, 2012). A reposição dos fluidos, seja por via oral ou por via parenteral nos casos mais graves, é a única recomendação medicamentosa. Assim, a descoberta de medicamentos que possam modular a resposta inflamatória e abrandar os sintomas é altamente desejável. A dengue é uma doença de origem imunológica em que os distúrbios de coagulação e o desequilíbrio hemodinâmico causado por aumento de permeabilidade vascular têm um papel chave na determinação da gravidade. Por essa razão, valorizar e incentivar estudos de produtos naturais em busca de uma droga com atividade antidengue são de fundamental importância para a saúde pública.

Um dos produtos naturais mais estudados na atualidade são substâncias extraídas de fungos, pois possuem uma grande importância econômica, tanto no ramo alimentício como terapêutico. Os basidiomicetos, conhecidos popularmente como cogumelos, têm sido alvo de muitos estudos farmacológicos nos últimos anos, visto que suas ações terapêuticas já são, empiricamente, utilizadas e reconhecidas, há muito tempo, principalmente no Oriente (Wasser, 2002). Segundo Rathee *et al.* (2012), houve um aumento recente do interesse em cogumelos não só como um alimento saudável, de elevado teor proteico, mas também como uma fonte de compostos biologicamente ativos de valor medicinal, com atividade anticancerígena, antiviral, hepatoprotetora, imunomoduladora e hipocolesterolêmica. As espécies *Pleurotus florida* e *Pleurotus pulmonaris* apresentam elevada atividade antioxidante e antitumoral quer por atividade anticarcinogênica quer por antimutagênica, mas são menos estudadas. Os cogumelos do gênero *Pleurotus* apresentam essencialmente atividades antioxidantes (Jayakumar *et al.*, 2006). No estudo de Roupas *et al.* (2012) são evidenciados também, os benefícios do gênero *Pleurotus* em diversas patologias, com ação anticarcinogênica no carcinoma do fígado, do pulmão e cervical. Apresenta também ação antiartrítica, ao nível ósseo, evitando a perda de massa óssea, além de prevenir a formação de cataratas nos testes *in vivo*. Além da atividade antitumoral, imunomoduladora, hipoglicemiante, provenientes do gênero *Pleurotus* citadas acima, Kim *et al.* (2006) observaram que o extrato do basidioma da espécie *P. eryngii* aumentava o metabolismo ósseo, estimulando a formação de osteoblastos em ratos com osteoporose. No entanto, os componentes que estariam atuando neste processo não foram ainda descritos. Apesar de não existirem trabalhos que evidenciem com mais ênfase atividades medicinais do *P. eryngii* o mesmo foi escolhido para o desenvolvimento desta pesquisa.

## Material e Métodos

Foram utilizadas neste trabalho, amostras de *P. eryngii* DPUA 1692, do acervo da Micoteca DPUA da Universidade Federal do Amazonas. As culturas preservadas em óleo mineral foram reativadas em ágar batata dextrose (BDA) com extrato de levedura 0,5% (p/v) em placas de Petri. Os cultivos foram incubados a 25 °C na ausência de luz por oito dias (Kirsch *et al.*, 2011).

Inoculou-se três fragmentos de micélio ( $\emptyset = 1\text{cm}$ ) no meio de cultura em meio líquido e a fermentação submersa foi conduzida durante 15 dias a 25 °C sob agitação constante de 150 rpm (Kirsch *et al.*, 2011). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Ao término do processo fermentativo, a biomassa micelial obtida foi separada por filtração a vácuo em papel de filtro (Whatman No.1) e o meio líquido recuperado foi utilizado para avaliação da produção de exopolissacarídeos (EPS), que foram tratados com etanol 95% (4:1, v/v), homogeneizados vigorosamente e mantidos a 4 °C por 12 horas. O precipitado foi separado por centrifugação a 6000 rpm por 15 minutos (Chen *et al.* 2007).

A dosagem de exopolissacarídeo (EPS) foi realizada segundo Kim *et al.* (2005). As amostras coletadas foram centrifugadas a 10000g por 20min. e, ao sobrenadante, foi adicionado o volume de quatro vezes de etanol absoluto. Em seguida, estas soluções foram homogeneizadas e mantidas por 18h a 4 °C. O precipitado foi centrifugado a 10000 por 20 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado secou em temperatura ambiente ( $28 \pm 2$  °C) até peso constante e, então, pesado em balança analítica. Os ensaios celulares foram realizados no Laboratório de Virologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. A linhagem celular de hepatócitos (Huh-7) e as alíquotas do DENV-2 foram fornecidas pelo Laboratório de Imunologia Viral da FIOCRUZ-RJ. As células Huh-7 foram cultivadas em frascos de cultura (25 cm<sup>2</sup>) com 10 ml de meio de cultura DMEM (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2 mM de L-glutamina, 100 µg mL<sup>-1</sup> de Estreptomicina e 100U/mL de Penicilina e 1 µg/mL de fungisona, em estufa com 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> em um período de 24 e 48h. A partir daí a multiplicação celular foi acompanhada diariamente com auxílio de microscópio invertido de contraste de fase, observará a formação de uma monocamada confluenta, os hepatócitos foram passados para novas garrafas (expansão celular) com auxílio de Tripsina-EDTA, seguido de centrifugação a 250 G por 5 minutos. Após a centrifugação, o *pellet* formado foi ressuspensão em meio fresco suplementado e depois transferido para novos frascos de 25 cm<sup>2</sup>. Quando necessário, para manter um estoque, as células foram congeladas em criotubos contendo solução de DMSO a 10%, numa temperatura inicial de -80°C.

Os exopolissacarídeos de *Pleurotus eryngii* foram avaliados quanto à sua citotoxicidade nas Huh-7 através de ensaios colorimétricos quantitativo MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) diphenyl tetrazolium bromide) (Mosmann, 1983). Para tal, foi realizada a contagem das células em Câmara de Neubauer e a suspensão celular foi distribuída em 3 placas de 96 poços junto ao meio de cultura (DMEM, mais 10% SFB, 1% de antibiótico e antifúngico), numa concentração de 105 células por poço. As placas foram armazenadas em estufa (37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>) por 48h, período necessário para formação da monocamada. Depois que a monocamada se formar, o sobrenadante foi retirado e as células foram lavadas cuidadosamente com PBS para não remover a monocamada celular. Depois foi adicionado 200 µL de meio de cultura fresco com 2% de SFB em cada poço, sendo que em alguns poços as Huh-7 foram tratadas com diferentes concentrações dos polissacarídeos de *P. eryngii* (100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml e 0,1 µg/ml). Após os períodos de tratamento, o possível efeito citotóxico das diferentes concentrações dos polissacarídeos de *P. eryngii* sobre a linhagem Huh-7 foi determinado utilizando método o MTT Molecular Probes cat. # M-6494), onde foram seguidas as recomendações do fabricante. A leitura das densidades ópticas de cada placa foi realizada na leitora de ELISA Robonik (Robonik India PVT), nos comprimentos de onda de 540-570 nm.

Para os ensaios de infecção da linhagem de Huh-7 foi utilizada uma cepa asiática padrão universal (16681). Primeiramente, foram semeadas 2x10<sup>5</sup> células por poço de cultura de 24 poços, completando com meio de cultura DMEM até o volume final de 1000 µL por poço. As placas foram incubadas em estufa 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 48h. Passado esse período, o sobrenadante substituído por 300 µL de inóculo viral diluído 1:5 em meio de cultura sem SFB. A adsorção viral ocorreu em estufa em 37°C com

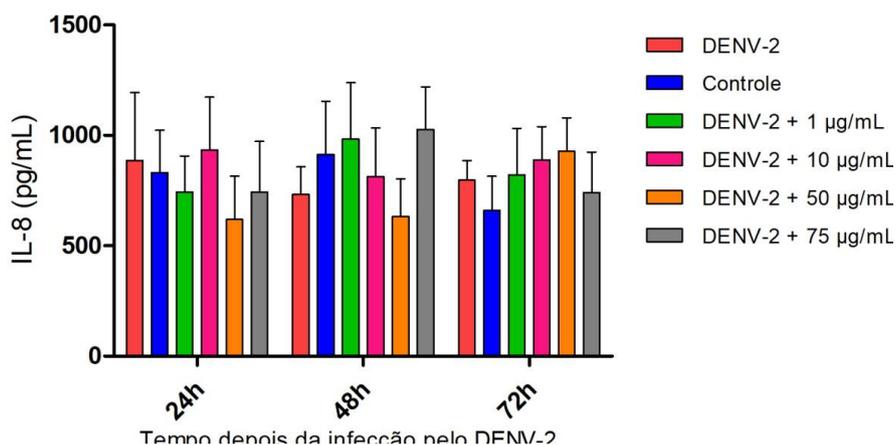
5% CO<sub>2</sub> por 2h. Posteriormente o sobrenadante foi retirado e adicionado 800 µL/poço de DEMEM contendo 2% de SFB, sendo que alguns poços infectados foram tratados com diferentes concentrações dos polissacarídeos de *P. eryngii*. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, sendo que a cada 24h, durante 3 dias, os sobrenadantes foram alíquotados, etiquetados e armazenados em freezer - 80 °C para posterior da citocina IL-8.

A possível atividade imunomoduladora das diferentes concentrações dos exopolissacarídeos de *P. eryngii* foi avaliada através de dosagens da citocina IL-8 nos sobrenadantes dos hepatócitos infectados, conforme descrito previamente (Lima-Júnior *et al.*, 2013). Vale ressaltar que essa citocina foi escolhida para a dosagem por apresentar relação com os casos graves de dengue (Chen *et al.*, 2006; Chuang *et al.*, 2015). Para tanto, foi utilizado o kit de ELISA padrão para IL-8 humanos (PeproTech cat. # 900-k18), em que foram seguidos estritamente as instruções dos fabricantes. A leitura das densidades ópticas de cada placa de ELISA foi realizada na leitora de ELISA Robonik (Robonik India PVT), nos comprimentos de onda recomendados.

## Resultados e Discussão

As citocinas são mediadores necessários para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão. No entanto, a produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias a partir da lesão pode manifestar-se sistemicamente com instabilidade hemodinâmica ou distúrbios metabólicos (Oliveira *et al.*, 2011). Segundo Varella (2001), são moléculas protéicas, glicosiladas ou não, que enviam diversos sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células do sistema imunológico, sua síntese habitualmente ocorre após estimulação antígena. Segundo Talavera *et al.* (2004) e Brasier *et al.*, (2012) a IL-8 é uma das citocinas encontradas em níveis altos nos pacientes diagnosticados com dengue hemorrágica. A sua principal ação é o grande estímulo migratório para as células do sistema imune, principalmente neutrófilos, determinando ainda um aumento da expressão de moléculas de adesão por células endoteliais (Varella, 2001). A dosagem da citocina IL-8 foi realizada por meio de ELISA durante três dias de cinética (24h, 48h e 72h). As concentrações de 1 µg mL<sup>-1</sup>, 50 µg mL<sup>-1</sup> e 75 µg mL<sup>-1</sup> se destacaram por apresentarem redução nos níveis de IL-8 na cinética de 24hs. Em 48hs foi observado que a concentração de 50 µg mL<sup>-1</sup> demonstrou uma pequena redução, sendo que em 72h observamos a redução somente para a concentração de 75 µg mL<sup>-1</sup> (Figura 1).

Um ponto importante a ser observado é que os poços controle se encontram no mesmo padrão quantitativo dos poços contendo apenas o vírus DENV-2 nas cinéticas de 24h e 72h, sendo que na cinética de 48h está em nível maior o que deveria ser o contrário, já que o controle não possui vírus, não tendo que produzir tanto IL-8 comparado aos poços infectados DENV-2. Isso pode ser explicado pela produção basal normal das células se encontrarem no limiar, em torno de 1000pg mL<sup>-1</sup>, corroborando com o observado recentemente por pesquisadores da FIOCRUZ (Mello *et al.*, 2015).



**Figura 1.** Efeito modulador dos exopolissacarídeos de *Pleurotus eryngii* (MPE) sobre a produção de IL-8 em Huh-7 infectadas pelo DENV-2. As Huh-7 foram infectadas com DENV-2 e depois tratadas com diferentes concentrações da MPE durante 24 h a 72 h. A quantificação da IL-8 foi realizada por ELISA no sobrenadante de Huh-7 infectadas. O gráfico representa 1 experimento em triplicata.

## Considerações Finais

A extração dos EPS foi realizada com sucesso, a partir do cultivo do micélio de *Pleurotus eryngii*. Após a infecção da linhagem das células do hepatócito humano Huh-7 com as alíquotas de DENV-2, pôde-se concluir que as concentrações de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$  dos EPS de *P. eryngii*, através do teste de MTT, foram viáveis às células do hepatócito humano (Huh-7), ou seja, não apresentaram toxicidade para as mesmas. O ensaio imunomodulador deverá ser repetido pelo menos duas vezes para estar estatisticamente confiável, não demonstrando, nos ensaios realizados, efeito imunomodulador contra o vírus dengue, ou seja, não foram conclusivos, devido ter sido feito apenas um teste para atividade. Porém novos testes foram realizados para definir estatisticamente os resultados. Já em relação ao fungo estudado, a revisão bibliográfica foi assertiva em comprovar que há um vasto universo de produtos biológicos, bem como substâncias extraídas dos mesmos, que está sendo estudada e testada cientificamente e na verdade já é utilizada empiricamente no mundo todo há muitos anos. Portanto, este trabalho abriu portas para futuras pesquisas com a espécie de fungo estudada.

## Referências

- Bente DA, Rico-Hesse R 2006. Models of dengue virus infection. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 3, 97-103.
- Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, Bozza PT, Kubelka CF 2008. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFNgamma as predictive factors for severity. *BMC Infectious diseases*, 8, 86.
- Brasier AR, Ju H, Garcia J, Spratt HM, Victor SS, Forshey BM 2012. A three-component biomarker panel for prediction of dengue hemorrhagic fever. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 86(2):341-8.
- Brasil, Ministério da Saúde 2018. Boletim epidemiológico: Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 12. *Secretaria de Vigilância em Saúde*, 49: 16.
- Chen LC, Lei HY, Liu CC, Shiesh SC, Chen SH, Liu HS, Lin YS, Wang ST, Shyu HW, Yeh TM 2006. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74, 142-147.
- Gubler DJ 2006. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Found Symp*, v. 277, p. 3-16; discussion 16-22, 71-13, 251-253.
- Kim S, Kim H, Lee B, Hwang H, Baek D, KOS 2006. Effects of mushroom, *Pleurotus eryngii*, extracts on bone metabolism. *Clinical Nutrition*, v. 25, p. 166-170.
- Kirsch LS 2011. The influence of different submerged cultivation conditions on mycelial biomass and protease production by *Lentinus citrinus* Walley et Rammeloo DPUA 1535 (Agaricomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 13, n. 2.
- Lima-Junior RS 2013. *Efeito antiviral, imunomodulador e atenuante da permeabilidade endotelial de uma fração alcaloide de Uncaria tomentosa em células infectadas pelo DENV-2*. Rio de Janeiro, Brasil. (Tese de Doutorado, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.). 117 pp.
- Mello CS 2015. *Atividade antiviral e imunomoduladora de extratos originados de Uncaria sp em infecção in vitro de linhagem contínua de hepatócitos humanos pelo vírus dengue*. Rio de Janeiro, Brasil. (MSc Dissertação, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ). 119p.
- Mosmann T. 1983. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological*, 65, 55-63.
- Murphy BR, Whitehead SS 2011. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. *Annual review of immunology*, 29, 587-619.
- Oliveira CMB, Sakata RK., Issy AM, Gerola LR, Salomão R 2011. Citocinas e Dor. *Ver. Bras. Anestesiologia*, 61: 2: 255-265.
- Rathee S, Rathee D, Rathee D, Rathee P, Kumar V 2012. Mushrooms as therapeutic agents. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, Abril, 459-474.
- Jayakumar J, Ramesh E, Geraldine P 2006. Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCL4-induced liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology, Oxford*, v.44, p. 1989-1996.

- Roupas P, Keogh J, Noakes M, Taylor P 2012. The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence – *Journal of Functional Foods*, volume 4, issue 4, october, pages 687-709.
- Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen VV, Wills B 2012. Dengue. *The New England journal of medicine*, 366, 1423-1432.
- Srikiatkachorn A 2009. Plasma leakage in dengue haemorrhagic fever. *Thrombosis and Haemostasis*, 102, 1042-1049.
- Srikiatkachorn A, Green S 2010. Markers of dengue disease severity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 338, 67-82.
- Srikiatkachorn A, Rothman AL, Gibbons RV Sittisombut N, Malasit P, Ennis FA, Nimmannitya S, Kalayanarooj S 2011. Dengue--how best to classify it. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 53, 563-567.
- Talavera D, Castilho AM, Dominguez MC, Gutierrez AE, Meza II 2004. IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *The Journal of General Virology*. 85(Pt 7):1801-13.
- Varella PPV, Forte WCN 2001. Citocinas: revisão. *Rev. Bras. Alerg. Imunopatol*; 24(4):146-154.
- Wasser SP 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60: 258-274.

## Perfil enzimático do fungo L3 Isolado de celulose reciclada e atuação sinérgica com enzimas de *Trichoderma reesei* comercial

Pamella Suely Santa Rosa Pimentel<sup>1,2</sup>, Jessica Batista Oliveira<sup>2</sup>, Enide Luciana Belmont<sup>1,2</sup>, Suelen Dias Silva<sup>3</sup>, Carlos Gustavo Nunes-Silva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas-UFAM

<sup>2</sup> Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Amazonas-UFAM

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede Bionorte

Emails: pamellasuely@gmail.com, jessicabatista115@gmail.com lucianabelmont22@gmail.com, suelendiass@gmail.com, cgmanaus@gmail.com.

### Resumo

Enzimas celulolíticas são biocatalizadores altamente específicos que atuam em conjunto na degradação da celulose para liberação de glicose. Fungos filamentosos são ótimos produtores de celulases, e as enzimas de diferentes fungos podem ser utilizadas em conjunto visando um aumento no poder de catálise de um mix enzimático. Neste trabalho avaliou-se a produção de enzimas celulolíticas por um fungo isolado de celulose reciclada (fungo L3), e a ação sinérgica de suas enzimas com as enzimas do fungo comercial *Trichoderma reesei* QM9414. O perfil de produção enzimática durante a fermentação submersa foi comparado com o obtido pela estirpe QM9414. O fungo L3 apresentou desempenho melhor do que *T. reesei* QM9414 na produção de betaglucosidases, e níveis mais baixos de atividade CMCase. A atividade de celulases totais foi aumentada no mix enzimático formulado com proteínas do sobrenadante de cultivo de *T. reesei* QM9414 e do fungo L3. Esses resultados demonstram que o fungo isolado L3 representa uma alternativa na produção de enzimas para suplementar composições enzimáticas aplicadas na hidrólise de materiais celulósicos.

**Palavras-chave:** Celulases; sinergismo; fungos filamentosos.

### Introdução

As celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalizadoras altamente específicas que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais a glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à sua possibilidade de conversão em etanol (Lynd *et al.*, 2002; Tolan, 2002). A conversão bioquímica da biomassa celulolítica preserva as estruturas de carbono originais sob a forma de açúcares monoméricos ao contrário da conversão termoquímica da biomassa, que leva a destruição dos hidratos de carbono, logo, a tecnologia enzimática é considerada a mais sustentável para a sacarificação (Horn *et al.*, 2012).

De acordo com a nomenclatura de enzimas EC (Enzyme Commission Numbers), as celulases estão classificadas dentro do grupo das glicosil hidrolases (EC 3.2.1. -) pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB), e estão distribuídas em três principais classes distintas (Lombard *et al.*, 2013)., que agem em conjunto e são classificadas de acordo com o local em que atuam na fibra de celulose em: endoglucanases, exoglucanases e beta-glucosidases.

A eficiência da hidrólise enzimática da celulose está ligada com sua atuação em conjunto. As celulases têm um rendimento maior quando atuam juntas do que quando agem isoladamente, e tal sinergismo, tem sido alvo de muitos estudos a fim de que se possa entender melhor o modo de ação dessas enzimas (Gan *et al.*, 2003).

As enzimas celulolíticas são produzidas por diversos microrganismos e dentre eles, destacam-se os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* (Amorea *et al.*, 2012). O primeiro microrganismo utilizado na produção industrial de celulases foi o fungo filamentoso *Trichoderma reesei* e ainda hoje é a fonte mais utilizada (Ogeda e Petri, 2010). A estirpe *T. reesei* QM9414, é uma linhagem mutante de *Trichoderma* que produz 2 a 4 vezes mais celulases do que o *Trichoderma* original Qm6a (Dashtban *et al.*, 2011).

Mohanram *et al.* (2013) descrevem que atualmente a otimização dos processos de conversão de polisacarídeos da biomassa em açúcares fermentáveis, envolvem a utilização de coquetéis enzimáticos que permitam maior rentabilidade a custos reduzidos e dentro deste contexto, a utilização diversificada de celulasas permite uma melhor atuação catalítica desses coquetéis. O objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de celulasas pelo fungo *Aspergillus* L3 isolado da massa de papel reciclado e testar o desempenho do seu complexo enzimático em conjunto com o complexo celulolítico de *T. reesei* QM9414.

## Material e Métodos

O fungo filamentososo L3 foi isolado a partir de massa de papel do recipiente de lavagem no processo de reciclagem de papel, de uma fábrica de reciclagem na cidade de Manaus-AM. O fungo *Trichoderma reesei* QM9414 foi adquirido da coleção de culturas tropicais da fundação André Tosello. Os microrganismos foram reativados em meio BDA (Batata Dextrose ágar), e preservados em água destilada estéril de acordo com o método de Castellani (1939). O Isolado L3 foi identificado morfológicamente ao nível de gênero por meio de microcultivo realizado em placa de Petri, seguido de observação das características microscópicas das lâminas coradas com azul de bromofenol em objetiva de 40x e 100x.

Foi feito um teste qualitativo para avaliação da capacidade de degradação de substratos celulósicos pelo fungo L3, onde se cultivou o fungo em meio CMC-ágar (Zhang *et al.*, 2009), e após 4 dias de crescimento, corou-se a placa com vermelho Congo 1% e em seguida descorou-se com NaCl 1M, e o halo de degradação formado foi medido com auxílio de paquímetro (mm).

Para avaliação quantitativa da produção de celulasas em fermentação submersa, os fungos L3 e *T. reesei* QM9414 foram cultivados em meio BDA por até 10 dias e em seguida foram preparadas as suspensões de esporos em água destilada previamente esterilizada a 120 °C e 1 atm, 20 min. A contagem dos esporos foi feita em câmara de Neubauer, em microscópio óptico a um aumento de 100x. Um volume de 5% de solução de esporos com a concentração de esporos/células 10<sup>6</sup> foram inoculadas em meio basal de crescimento micelial (Mandels e Weber, 1969) com 1% de glicose, e incubados a 30°C, 200rpm por 72h. Após a formação de micélio, o pré-inóculo (v/v) contendo massa micelial aproximada (mg) foi inoculado, na proporção 10% (v/v), nos meios de indução contendo polpa de celulose industrial triturada como fonte de carbono.

A fermentação foi conduzida em frascos Erlenmeyers contendo meio Mandels com a composição de (g/L): polpa de Celulose 10g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,0g; CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 0,4g; MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0,3g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,4g; Uréia 0,3g; Peptona 1,0g; Extrato de levedura 0,25g; (mg/L); FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 5mg; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 1,6mg; ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 1,4mg; CoC<sub>12</sub>·H<sub>2</sub>O 2mg. A fermentação foi realizada em triplicata, a 30 °C, 200 rpm, por 108 h, a cada 12h foram retiradas amostras que foram centrifugadas para remoção de micélio, e o sobrenadante foi armazenado a 4°C para as análises posteriores. Os ensaios enzimáticos foram feitos baseados nas metodologias descritas por Eveleigh *et al.* (2009) e Ghose (1987), onde as atividades enzimáticas foram investigadas de acordo com a atuação das enzimas sobre os seus respectivos substratos conforme descrito na tabela 1.

Em todos os ensaios os substratos foram preparados em tampão citrato, 50 mM, pH 4.8. As proteínas totais presentes nos complexos enzimáticos foram dosadas conforme a metodologia de Bradford (1976). As atividades enzimáticas foram determinadas em U (Unidade de atividade), onde, uma unidade de atividade corresponde a 1µmol de produto liberado por minuto.

Para se analisar o sinergismo entre os complexos enzimáticos de L3 e *T. reesei*, os sobrenadantes de cultivo de cada fungo foram previamente concentrados 10x em coluna Vivaspin® de 3 kDa. Após a quantificação de proteínas totais presentes nos concentrados, foram misturados na proporção de 50%,

**Tabela 1.** Atividades enzimáticas e seus substratos.

Atividade	Enzima avaliada	Substrato	Reação
FPase	Celulasas totais	Papel de filtro	60 minutos 50°C
CMCase	Endoglucanases	Carboximetilcelulose (2%)	15 minutos 50°C
Betaglucosidase	Betaglucosidase	Celobiose (2%)	15 minutos 50°

baseado na concentração de proteína presente nos extratos enzimáticos de cada fungo (10mg de proteínas de L3 e 10mg de proteínas de *T. reesei*). Em seguida foram feitos os testes de atividade enzimática de celulases totais (FPase).

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando os Softwares BioEstat® versão 5.3 e ORIGIN® 2017. Os testes estatísticos realizados foram: Análise de variância (ANOVA), seguido de Teste *t* de Student (amostras independentes), e estatística descritiva com determinação dos desvios-padrão.

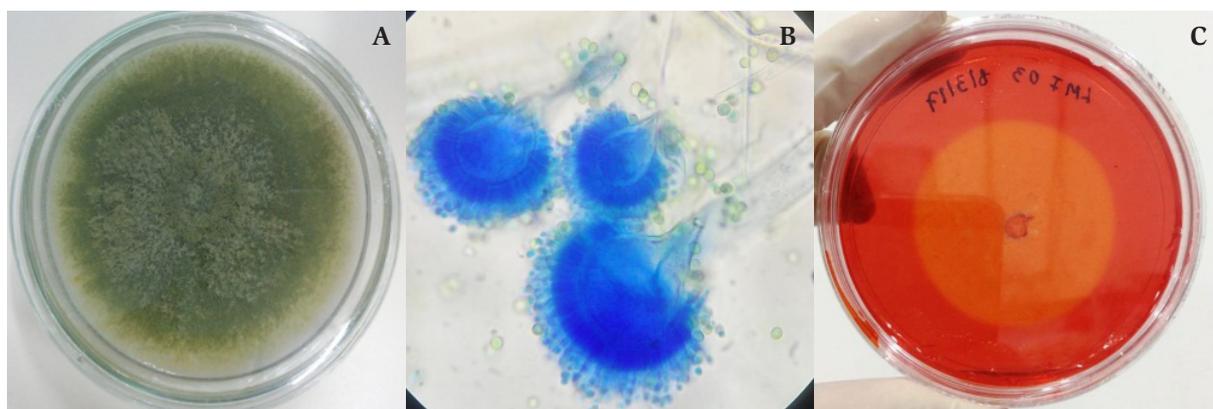
## Resultados e Discussão

Os aspectos micromorfológicos do fungo isolado L3 apresentaram características compatíveis com o gênero *Aspergillus* (Figura 1B), conidióforo com terminal dilatado em vesícula, e vesícula de aparência radiada (Samsom *et al.*, 1990; Teixeira *et al.*, 2011). Quanto à avaliação da capacidade de degradação de celulose pelo fungo L3, observou-se a formação de halo de degradação de CMC, com 17 mm de diâmetro (Figura 1C).

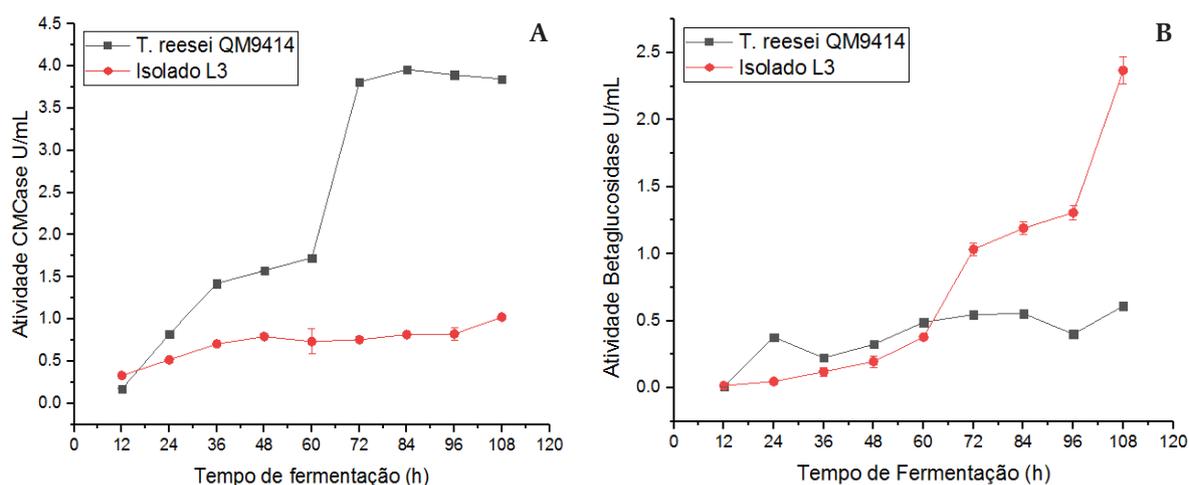
O perfil cinético de produção de celulases foi diferente entre os dois fungos, *T. reesei* manteve os níveis de atividade enzimática de betaglucosidase sem grandes alterações em relação ao tempo de fermentação, enquanto que no cultivo de *Aspergillus sp* L3 a atividade foi aumentando ao longo do tempo. Já na produção de enzimas com atividade CMCase (endoglucanases), *T. reesei* apresentou um perfil de aumento da atividade ao longo do processo, mantendo-se estável após 72h, e *Aspergillus sp* L3 manteve um perfil estável de produção a partir de 48h de fermentação submersa.

O fungo *Aspergillus sp* (L3) apresentou níveis mais altos de produção de enzimas com atividade betaglucosidásica (Figura 2). O primeiro pico de atividade ocorreu no período de 72h com 1.033 U. mL<sup>-1</sup> e atingiu 2.368 U. mL<sup>-1</sup> em 108 h, os valores desta atividade enzimática foram mais altos do que os observados para o *Trichoderma reesei* QM9414 nos mesmos períodos, 0,548 U.mL<sup>-1</sup> e 0.611 respectivamente (Figura 2B). Para a atividade CMCase, *T. reesei* apresentou níveis mais elevados em todos os tempos de fermentação (Figura 2A). Em 48h *T. reesei* obteve 1,576 U/mL de atividade CMCásica e em 108 h chegou a 3,849 U.mL<sup>-1</sup>, enquanto *Aspergillus sp* L3 apresentou atividade de 0,793 U.mL<sup>-1</sup> em 48 h e 1,025 U.mL<sup>-1</sup> em 108h.

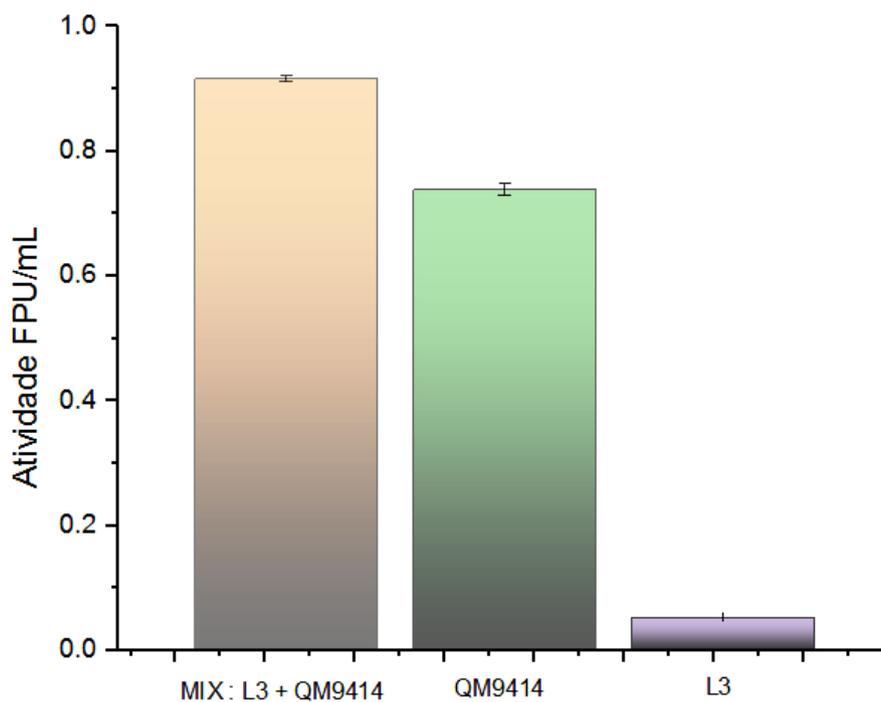
No teste de sinergismo entre as enzimas celulolíticas presentes no complexo enzimático de *Aspergillus sp* L3 e *T. reesei* QM9414, observou-se que houve um efeito positivo de atuação entre as enzimas das duas espécies de fungos (Figura 3). A atividade de celulases totais (FPU/mL) foi mais elevada no mix formulado com os extratos enzimáticos dos dois fungos (0,9164 FPU/mL) do que quando avaliados isoladamente, *T. reesei* (0,7383 FPU/mL) e L3 (0,053 FPU/mL), com diferença estatística significativa entre os resultados do Mix e dos fungos isoladamente (Teste *t* de student;  $p < 0,01$ ).



**Figura 1.** Imagens representativas do fungo L3. A: crescimento micelial em meio BDA após 10 dias a 28°C. B: aspectos microscópicos das estruturas reprodutivas, lâmina corada com azul de bromofenol [objetiva 100X]. C: halo de degradação de celulose em meio CMC-ágar, após 4 dias de crescimento.



**Figura 2.** Perfil de produção enzimática pelos fungos L3 e *T. reesei* QM9414, em fermentação submersa com polpa de celulose como fonte de carbono. A: Atividade CMCCase durante 108h. B: Atividade betaglicosidase durante 108h. Valores e desvios-padrão referentes à médias de triplicatas biológicas e réplicas amostrais de ensaio enzimático (N = 6).



**Figura 3.** Efeito do sinergismo entre os coquetéis enzimáticos de L3 e *T. reesei* QM9414 na atividade sobre papel de filtro. Médias e Desvios-padrão (N = 3).

Várias espécies de fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, são descritas como importantes produtoras de enzimas celulolíticas.

Linhagens de fungos da espécie *T. reesei* possuem um sistema de produção de celulases eficaz (endoglucanases e exoglucanases), mas são descritos por exibir baixa produção de betaglicosidases que correspondem a aproximadamente 1% das suas proteínas totais secretadas (Ahamed *et al.*, 2008). Em contrapartida, várias espécies de fungos do gênero *Aspergillus*, são descritas como importantes produtoras

de enzimas celulolíticas (Visser *et al.*, 2001), inclusive muitas produções comerciais de enzimas são obtidas por meio de fungos desse gênero, que exibem níveis elevados de betaglucosidases (Bhat *et al.*, 2000). Nesta pesquisa, o nível de produção de betaglucosidases por *Aspergillus* sp L3 foi bastante promissor, uma vez que betaglucosidases são enzimas chave para gerar açúcares no contexto de produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica (Singh *et al.*, 2016).

Os resultados obtidos no teste de sinergismo demonstram que os complexos enzimáticos de *Aspergillus* sp L3 e *Trichoderma reesei* QM9414 podem atuar em conjunto sem efeito inibitório. O fato da atividade de celulasas totais (FPase) ter sido mais alta no mix formulado com os complexos enzimáticos quando comparado às amostras isoladamente pode estar relacionado com as betaglucosidases do fungo L3 que complementaram a capacidade de degradação da celulose por *T. reesei* QM9414, uma vez que este apresentou níveis baixos de produção desta enzima.

Misturas de enzimas de diferentes fontes é uma abordagem sustentável que podem aumentar o desempenho de hidrólise da celulose, reduzindo custos de desconstrução enzimática da biomassa lignocelulósica (Adsul *et al.*, 2014). A busca para se obter um alto nível de açúcares fermentáveis a partir da biomassa lignocelulósica depende da produção eficiente de enzimas e misturas de celulasas, hemicelulasas, lignases, e outras proteínas que atuem de maneira sinérgica (Obeng *et al.*, 2017).

## Conclusões

O fungo *Aspergillus* sp L3 produz eficazmente uma das principais enzimas do complexo celulolítico, a betaglucosidase, apresentando níveis de atividade para esta enzima mais elevados que a atividade CMCase.

O complexo enzimático de fungo *Aspergillus* sp L3 atuou de forma sinérgica com o complexo enzimático do fungo comercial *T. reesei* QM9414, aumentando o nível de atividade de celulasas totais.

A estirpe L3 de *Aspergillus* sp pode ser utilizada em formulações de enzimas que necessitem de suplementação de betaglucosidases. Estudos mais aprofundados poderão ser realizados para avaliar o aparato proteico e enzimático produzido pelo fungo L3 no processo de degradação de materiais lignocelulósicos.

## Referências

- Adsul M, Sharma B, Sinhanian RR, Saini JK, Sharma A, Mathur A, Gupta R, Tuli DK 2014. Blending of cellulolytic enzyme preparations from diferente fungal sources for improved cellulose hydrolysis by increasing synergism. *RSC Advances*, 4: 44726-44732.
- Ahamed A, Vermette P 2008. Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMS as fed batch in a stirred tank bioreactor. *Biochem. Eng. J.* v. 42, p.41-46.
- Amorea A, Faraco V 2012. Potential of fungi as category I Consolidated BioProcessing organisms for cellulosic ethanol production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* v. 16, p.3286 - 3301.
- Bradford MM 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* v. 72, p.248.
- Castellani A 1939. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 42, 225-226.
- Datshtban M, Buchkowski R, Qin W 2011. Effect of Different carbon sources on cellulose production by *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) strains. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2(3): 274-286.
- Eveleigh DE, Mandels M, Roche C 2009. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology for Biofuels.* 2:21.
- Gan Q, Allen SJ, Taylor G 2003. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modeling. *Process Biochemistry.* v. 38, p. 1003/1018.
- Ghose TK 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure & App. Chem.* Vol. 59, N. 2, p. 257-268.
- Horn S, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Eijsink V 2012. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels.* v. 5, p. 45.

- Lombard V, Golaconda R H, Drula E, Coutinho P M, Henrissat B 2014 The Carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* 42: D490–D495. [PMID: 24270786]. Carbohydrate Active Enzymes database [on line]. Disponível em: < <http://www.cazy.org/> > Acesso em 27/04/2018.
- Lynd LR, Weimer PJ, Zyl WHV, Pretorius I 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v. 66, p.506.
- Mandels M, Weber J 1969. The production of Cellulases. *Advances in Chemistry*, vol. 95: 391-414.
- Mohanram S, Amat D, Choudhary J, Arora A, Nain L 2013. Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries. *Sustainable Chemical Processes*, v.1, p.15.
- Obeng EM, Adam SNN, Budiman C, Ongkudon CM, Mass R, Jose J 2017. Lignocellulases: a review of emerging and developing enzymes, systems, and practices. *Bioresources and Bioprocessing*, 4:16.
- Ogeda TL, Petri DFS 2010. Hidrólise Enzimática da Biomassa. *Química Nova*, Vol.33 No. 7.
- Samson A, Pitt JI, Pitt LL 1990. Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification. *Plenum Press*, New York, USA.
- Singh G, Verma A, Kumar V 2016. Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of betaglucosidases. *3 Biotech*, vol. 6 (1) app. 3.
- Teixeira MFS, Silva TA, Palheta RA, Carneiro ALB, Atayde HM 2011. Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada (Aplicações Biotecnológicas). Manaus: Edua, 255p.
- Tolan JS, Iogen's 2002. Process for producing ethanol from cellulosic biomass. *Clean Techn Environ Policy*. v.3, p.339–45.
- Zhang YHP, Hong J, Ye X 2009. Cellulase Assays. *Methods in Molecular Biology*. 581:213–231.

## Seleção de microrganismos com potencial para produção de lipases e biossurfactantes

Ingrid Reis da Silva<sup>1</sup>, Ivanete Ferreira de Souza<sup>1</sup>, Waleria Dasso Pinheiro Rosangela Santana Martins de Matos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA)  
Emails: ingridreis.alvrinho@gmail.com, ivaf300@gmail.com

### Resumo

Biossurfactantes são compostos tensoativos produzidos por algumas bactérias, bolores e leveduras. Apresentam algumas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, como a biodegradabilidade, baixa toxicidade e capacidade de reduzir a tensão superficial. Dessa forma podem ser aplicadas em vários setores industriais, tais como: alimentar, farmacêutico, cosméticos e petrolíferos. Neste sentido, a busca por novos microrganismos produtores de compostos enzimáticos e tensoativos é de interesse estratégico. Este estudo objetivou-se selecionar microrganismos com potencial para a produção de lipases e biossurfactantes por microrganismos obtidos da Coleção de Culturas do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA). Foram avaliados 50 fungos e 50 bactérias, onde a presença de lipases foi estudada por meio de dois métodos qualitativos: (i) hidrólise do substrato oleoso na presença de rodamina B; (ii) por adição de Tween 80, indicativo da hidrólise de éster. Dos microrganismos avaliados, 19 fungos e 9 bactérias indicaram resultados positivos apenas no teste enzimático na presença de rodamina B. No teste de distorção ótica 16 fungos e 12 bactérias indicaram resultados positivos. Foram selecionadas 39 cepas para dar continuidade nos ensaios para a produção de biossurfactantes, onde foram realizados os seguintes testes: colapso da gota, índice de emulsificação e estabilidade da emulsão. Do total de cepas avaliadas, 6 fungos e 2 bactérias produziram boas emulsões (acima de 40%), com máximo de 76% para a cepa CBA 22062 e mínimo de 52% para a cepa CBA 447. As cepas obtiveram bons resultados nos testes preliminares, indicando que a produção de biossurfactante por fermentação pode ser um processo viável, uma vez que os índices de emulsificação se mostraram satisfatórios. Os resultados obtidos com o fungo CBA 22043, e as bactérias CBA 1529 e CBA 1848 mostraram ainda que é possível a obtenção de lipases e biossurfactantes em um mesmo bioprocessos.

**Palavras chave:** Metabolismo microbiano, biotecnologia, biorremediação.

### Introdução

A utilização de enzimas microbianas nos processamentos industriais, permite a obtenção de um produto final mais desejável, tanto do ponto de vista econômico quanto biotecnológico. A preferência pelas enzimas microbianas fundamenta-se: a) pela facilidade de obtenção de grandes populações celulares produtoras de enzimas; b) facilidade de seleção de linhagens de alta produtividade por manipulação genética; c) procedimento de extração de enzimas simples e econômico; d) a não sazonalidade do produto (Fungaro e Maccheroni Jr., 2002).

As enzimas industriais são obtidas principalmente de microrganismos do solo. Cerca de 50% das enzimas industriais originam-se de fungos e leveduras, 35% de bactérias e 15% são de origem animal e vegetal (Fungaro e Maccheroni Jr., 2002). As lipases são enzimas que catalizam a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol (TAG), fornecendo diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), glicerol e ácidos graxos livres. As lipases e esterases podem ser distinguidas com base em seus espectros de substratos. As lipases verdadeiras têm preferência em catalisar a hidrólise de ácidos graxos de cadeia longa ( $\geq 10$  carbonos), enquanto as esterases tem preferência por ligações de ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia curta ( $< 10$  carbonos) (Carvalho *et al.*, 2005; Chahiniana e Sarda 2009; Kumar *et al.* 2012).

As lipases de origem microbiana são as mais utilizadas na indústria, pois apresentam procedimento de isolamento mais simples, são geralmente mais estáveis e com propriedades bem mais diversificadas que as lipases de outras fontes (Carvalho *et al.*, 2005). Diante dessas características, possuem potencial para uma variedade de aplicações de uso industrial, na produção de alimentos e detergentes, no tratamento biológico de águas residuárias, em medicamentos e cosméticos (Burkert *et al.*, 2004; Roveda *et al.*, 2010).

As lipases também podem ser utilizadas para produção de biossurfactantes através de síntese orgânica, catalisando a esterificação dos ácidos graxos e açúcares (Colla *et al.*, 2010).

Os biossurfactantes são substâncias que apresentam estrutura molecular com grupos hidrofílicos e hidrofóbicos e possuem a capacidade de reduzir a tensão superficial de misturas com fases e polaridades diferentes a partir da formação de agregados moleculares ou micelas (Mahjoubi *et al.*, 2013). Estas propriedades fazem destas moléculas ideais para uma ampla gama de aplicações industriais, que envolvem lubrificação, emulsificação, capacidade molhante, capacidade espumante, detergência, dispersão de fases e solubilização (Araujo e Freire, 2013).

A busca por microrganismos isolados de distintos ambientes, especialmente os de locais não impactados, é de interesse estratégico, pois além de tornar possível o desenvolvimento de novos sistemas de produção enzimática e de biotensoativos, pode minimizar os impactos ambientais causados pela síntese destes compostos nos tratamentos convencionais. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de cepas bacterianas e fúngicas da coleção de culturas do CBA em produzir lipases e biossurfactantes.

## Material e Métodos

Foram avaliadas 100 cepas microbianas, sendo 50 de bactérias e 50 de fungos da Coleção de Culturas do Laboratório de Bioprospecção do Centro de Biotecnologia da Amazônia. Das 100 cepas, 50% são endófitas e 50% são provenientes de amostras de solo coletadas em várias regiões da cidade de Manaus- AM.

Os fungos foram reativados em placas e após crescimento, pequenos fragmentos de micélio foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 150 mL com 50 mL de meio líquido batata – dextrose (BD) acrescido de 0,2% de extrato de levedura sob condições estéreis, conforme o método descrito por Souza *et al.* (2004) com modificações. Para obtenção dos metabólitos bacterianos, transferiu-se asepticamente 5mL do meio de reativação para Erlenmeyers de 150 mL, contendo 50 mL de meio LB (Luria Bertani). Os frascos foram incubados sem agitação por 14 dias a temperatura de 25°C para os fungos. As bactérias foram incubadas por 72 horas, a 28°C a 150 rpm. Após o período de incubação, o caldo de fermentação foi filtrado para separação do sobrenadante e do micélio. Os metabólitos secundários obtidos, foram centrifugados e os sobrenadantes foram utilizados nos testes qualitativos de atividade enzimática e da produção de biossurfactantes.

O teste qualitativo de atividade de lipases em meio com o corante rodamina B foi realizado em placas seguindo o método modificado de Kouker e Jaeger (1987). O meio foi constituído por rodamina B 0,001% (m/v), caldo nutriente (8 g.L<sup>-1</sup>), NaCl (4 g.L<sup>-1</sup>), ágar (10 g.L<sup>-1</sup>) e óleo de soja 2,5% (m/v). Os metabólitos foram inoculados individualmente no centro de cada placa e incubados a 25°C por 5 dias, sendo então analisadas sob luz ultravioleta de 365 nm. Os resultados foram considerados positivos para os meios que apresentaram fluorescência alaranjada em presença de luz ultravioleta, proveniente da ativação interfacial ocasionada pela reação enzimática. Os testes foram realizados em triplicatas.

Para o teste de hidrólise de ésteres, foi utilizada a metodologia modificada de Sierra (1957), em meio contendo Tween 80. O meio disperso em placas de Petri foi constituído por bacto peptona (10 g.L<sup>-1</sup>), NaCl (5 g.L<sup>-1</sup>), CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O (0,1 g.L<sup>-1</sup>) e Tween 80 (10 mL.L<sup>-1</sup>). Cada metabólito foi inoculado individualmente no centro de cada placa e incubados a 25°C por 5 dias. A visualização de um halo opaco ao redor das colônias indicava resultado positivo devido ao sal de cálcio, insolúvel em ácidos graxos, provenientes da hidrólise do éster. Os testes foram realizados em triplicatas.

O método de indicação da presença de biossurfactante foi realizado conforme descrito por Chen *et al.* (2007). Uma amostra de 100 µL do metabólito livre de células foi transferida para poços de placa de

Elisa (em triplicata) e sobrepostas a um papel milimetrado. Para fins de comparação entre os resultados, foi realizada uma alternância dos poços entre água destilada e as amostras dos caldos. A diminuição significativa da imagem da amostra, em relação à imagem do poço com água destilada é indicativo da presença de biossurfactante.

Para a síntese de biossurfactante (MSB), foram realizados os cultivos de cada isolado em Erlenmeyers de 150 mL, contendo 50 mL de meio extrato de malte 2,5% (m/v). Um disco de micélio de 9 mm de cada fungo e uma alíquota de 5 mL do inóculo de cada bactéria foram adicionados aos frascos contendo o meio de cultura. Os fungos foram incubados sem agitação a 25°C por 14 dias. As bactérias foram incubadas por 72 horas, a 28°C a 150 rpm. A extração do metabólito biossurfactante (MSB) foi realizada pela centrifugação do caldo a 6.000 rpm e 4°C durante 15 minutos, sendo o sobrenadante livre de células utilizado para os testes de distorção ótica, colapso da gota, índice de emulsificação e estabilidade da emulsão. Os cultivos foram realizados em triplicata.

A produção de biossurfactantes pelos isolados foi avaliada através do teste do colapso da gota descrito por Bodour e Miller-Maier (1998). Este teste foi realizado com o meio de cultivo após as 72 horas de crescimento. Em uma placa contendo 96 poços, foi dispensado 10 µL de óleo mineral e deixados em repouso por 24 horas. Na placa untada foram dispensadas alíquotas de 10 µL do MSB, em triplicata. Após 1 minuto, o espalhamento da gota sobre a superfície oleosa foi considerado como resultado positivo, indicando a produção de biossurfactantes. Foi utilizado água destilada autoclavada como controle negativo e como controle positivo, SDS 2.5%.

Os isolados selecionados no teste de colapso da gota foram avaliados quanto ao Índice de Emulsificação. Este procedimento consistiu em colocar uma alíquota de 2 mL de cada MSB em tubos de ensaio, adicionando o mesmo volume de querosene comercial. Agitou-se em vortex por dois minutos em alta rotação (Cooper e Goldenberg, 1987; Maklar e Cameotra, 1997). Após 24 horas calculou-se o índice de emulsificação pela equação: Índice de Emulsificação (%) =  $\frac{He}{Ht} \times 100$ , onde He = altura da emulsão; Ht = altura total do líquido. O teste do Índice de Emulsificação foi conduzido em triplicatas. A estabilidade das emulsões foi avaliada após 168 horas. O surfactante sintético Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) foi utilizado como controle positivo na determinação do índice de emulsificação na concentração de 1g/L<sup>-1</sup>. Foram consideradas boas emulsões aquelas que apresentaram índice de emulsificação acima de 40% (Bosch *et al.*, 1988).

## Resultados e discussão

Foram avaliados a presença de lipase de 50 fungos e 50 bactérias, em meio de dois métodos qualitativos: (i) hidrólise do substrato oleoso na presença de rodamina B; (ii) por adição de Tween 80, indicativo da hidrólise de éster. Dos microrganismos avaliados, 19 fungos e 9 bactérias indicaram resultados positivos apenas no teste enzimático na presença de rodamina B. No teste de distorção ótica, 16 fungos e 12 bactérias indicaram resultados positivos. (Tabelas 1 e 2).

As cepas que apresentaram resultados positivos nos ensaios de atividade lipolítica e distorção ótica foram selecionadas para dar continuidade nos ensaios para a produção de biossurfactantes, onde foram realizados os seguintes testes: colapso da gota, índice de emulsificação e estabilidade da emulsão após 168 horas. Do total de 39 cepas avaliadas, 7 fungos e 3 bactérias obtiveram resultado positivo no teste de colapso da gota, indicando a produção de biossurfactantes por esses microrganismos. Na avaliação da produção de emulsificação utilizando querosene, 6 fungos e 2 bactérias produziram boas emulsões (acima de 40%) como pode ser observado na Tabela 3.

As 8 cepas que produziram bons índices de emulsificação e estabilidade da emulsão foram: CBA 447, CBA 22043, CBA 22062, CBA 22087, CBA 22106, CBA 22107, CBA 1529 e CBA 1848, com máximo de 76% para a cepa CBA 22062 e mínimo de 52% para a cepa CBA 447 como pode ser observado na tabela 4 e Figura 1. O SDS obteve índice de emulsificação de 90%.

Os resultados positivos na seleção de fungos produtores de lipase e de biossurfactante apresentados na Tabela 4, demonstraram que o fungo CBA 22043, e as bactérias CBA 1529 e CBA 1848, dentro das

**Tabela 1.** Atividade lipolítica dos fungos da coleção de culturas do CBA.

Isolado	Óleo veg. e rod. B	Tween 80	Distorção ótica	
CBA 22	+	-	-	
CBA 243	+	-	+	
CBA 251	+	-	-	
CBA 2114	+	-	-	
CBA 2236	+	-	+	
CBA 21940	+	-	-	
CBA 21964	+	-	-	
CBA 21965	+	-	-	
CBA 21969	+	-	+	
CBA 21970	+	-	-	
CBA 21972	+	-	-	
CBA 21987	+	-	+	
CBA 22005	+	-	+	
CBA 22006	+	-	+	
CBA 22038	+	-	-	
CBA 22043	+	-	+	
CBA 22062	-	-	+	
CBA 22065	-	-	+	
CBA 22074	-	-	+	
CBA 22087	-	-	+	
CBA 22089	+	-	-	
CBA 22090	-	-	+	
CBA 22106	-	-	+	
CBA 22107	-	-	+	
CBA 447	-	-	+	
CBA 4316	+	-	+	
CBA 4403	+	-	-	
CBA 4404	-	-	-	
Total	28	19	0	16

(+) = indicativo da reação; (-) = ausência de reação

**Tabela 2.** Atividade lipolítica das bactérias da coleção de culturas do CBA.  
(+) = indicativo da reação; (-) = ausência de reação.

Bactérias			
Isolado	Óleo veg. e rod. B	Tween 80	Distorção ótica
CBA 1508	-	-	+
CBA 1529	+	-	+
CBA 1800	+	-	+
CBA 1809	-	-	+
CBA 1811	+	-	+
CBA 1812	+	-	+
CBA 1820	-	-	+
CBA 1826	+	-	+
CBA 1844	+	-	+
CBA 1848	+	-	+
CBA 1856	+	-	+
CBA 1862	+	-	+
Total	9	0	12

**Tabela 3.** Resultados positivos para produção de biossurfactantes: Teste do colapso da gota, índice de emulsificação utilizando querosene comercial (IE%) e estabilidade da emulsão.

Fungos					
	Origem	Isolado	Colapso da gota	IE24 %	Estabilidade da Emulsão 168h (IE168 %)
1	Endófitico	CBA 243	+++	---	---
2	Endófitico	CBA 22043	+++	70	69
3	Endófitico	CBA 22062	+++	76	74
4	Endófitico	CBA 22087	+++	60	50
5	Endófitico	CBA 22106	+++	64	63
6	Endófitico	CBA 22107	+++	63	63
7	Solo	CBA 447	+++	52	50
		Total 7	7	6	6
Bactérias					
	Origem	Isolado	Colapso da gota	IE %	Estabilidade da Emulsão 168h
1	Endófitico	CBA 1529	+++	68	68
2	Solo	CBA 1848	+++	67	67
3	Solo	CBA 1856	+++	---	---
		SDS 1g/L-1		90	90
		Total 3	3	2	2

(+ + +) Forte atividade; (+ +) moderada atividade; (+ -) fraca atividade; (- -) nenhuma atividade.

**Figura 1.** Cepas produtoras de bons índices de emulsificação: CBA 447, CBA 1529, CBA 22043, CBA 22087, CBA 22106, CBA 22107e CBA 22062.**Tabela 4.** Dados dos fungos e bactérias produtores de lipase e biossurfactante.

Fungos						
	Origem	Isolado	Atividade Lipolítica	Colapso da gota	IE24 %	Estabilidade da Emulsão 168h (IE168 %)
1	Endófitico	CBA 22043	+++	+++	70	69
2	Endófitico	CBA 22062	---	+++	76	74
3	Endófitico	CBA 22087	---	+++	60	50
4	Endófitico	CBA 22106	---	+++	64	63
5	Endófitico	CBA 22107	---	+++	63	63
6	Solo	CBA 447	---	+++	52	50
		Total 6	1	6	6	5
Bactérias						
	Origem	Isolado	Atividade Lipolítica	Colapso da gota	IE %	Estabilidade da Emulsão 168h (IE 168%)
1	Solo	CBA 1529	+++	+++	68	68
2	Solo	CBA 1848	+++	+++	67	67
		Total 2	2	2	2	2

condições experimentais adotadas, podem ser considerados microrganismos capazes de produzir lipases e biossurfactantes.

Os microrganismos selecionados foram sujeitos a uma seleção qualitativa de produção de lipase sobre o óleo vegetal e rodamina B e teste de hidrólise de ésteres com o Tween 80. A ação da enzima lipase sobre os triglicerídeos e ésteres de cadeia longa ( $\geq 10$  carbonos) foi verificada no teste com óleo de soja e rodamina B, no qual apresentou 28 resultados positivos (19 fungos e 9 bactérias), sendo em sua maioria, fungos endofíticos. A ação enzimática sobre ésteres de cadeia curta ( $< 10$  carbonos), utilizando Tween 80, não apresentou resultados positivos, como pode ser observado na Tabela 1 e 2. O Tween 80 é hidrolisado raramente por esterases e principalmente por lipases, uma vez que este contém ésteres de ácidos oleicos.

A presença de biossurfactante foi avaliada qualitativamente através do teste de distorção ótica. O teste com microplacas, de acordo com a metodologia de Chen *et al.* (2007) compara de forma visual, a presença de surfactante no meio, sendo considerado um indicativo simples e eficiente. A presença de surfactante no meio aquoso ocasiona uma distorção da imagem quadriculada abaixo da placa. Conforme Tabelas 1 e 2, 16 fungos e 12 bactérias apresentaram distorção ótica na imagem abaixo da placa. Foram selecionadas 39 cepas que indicaram resultado positivo nos testes de lipase e distorção ótica para dar continuidade nos ensaios para a produção de biossurfactantes. Dentre elas, 27 fungos e 12 bactérias foram avaliados e a presença de biossurfactantes foi determinada pelo teste de colapso da gota, índice de emulsificação (IE%) e estabilidade da emulsão em 168 horas. No teste de colapso da gota, 7 fungos e 3 bactérias mostraram resultados positivos, indicando a produção de biossurfactantes (Tabela 3). Safary *et al.* (2010) estudaram a capacidade de microrganismos em produzir biossurfactantes utilizando o teste do colapso da gota e distorção ótica. Esse estudo demonstrou bons resultados, comprovando que o teste do colapso da gota, quando usado em conjunto com outros testes como distorção ótica, é eficiente na prospecção de microrganismos produtores de compostos tensoativos.

Um importante parâmetro de avaliação do poder de um emulsificante é o Índice de Emulsificação (IE) e estabilidade da emulsão (Cooper e Goldenberg, 1987; Nitschke, 2004; Costa, 2005). No teste utilizando o querosene como composto hidrofóbico, das cepas avaliadas, 6 fungos e 2 bactérias apresentaram IE acima de 40%, com máximo de 76% para a cepa CBA 22062 e mínimo de 52% para a cepa CBA 447. Kim (2014) obteve valores de emulsão de 57,6% utilizando o querosene e o biossurfactante foi produzido por uma cepa identificada como *Bacillus pumilus*.

Como pode ser observado na tabela 3, as 8 cepas que produziram bons índices de emulsificação também apresentaram resultados positivos no teste do colapso da gota (CBA 447, CBA 22043, CBA 22062, CBA 22087, CBA 22106, CBA 22107, CBA 1529 e CBA 1848), como pode ser observado na tabela 3. As cepas CBA 243, CBA 1856 apesar de terem desempenho positivo no teste do colapso da gota, não produziram emulsão com o querosene testado. Esses resultados confirmam que o teste de colapso da gota pode ser utilizado para prospectar biossurfactantes.

As 8 cepas permaneceram estáveis após 168 horas de observação na determinação com o querosene. De acordo com Willumsen e Karlson (1997), emulsões que após 24 horas de formadas, mantêm mais de 50% do seu volume original são consideradas estáveis. A produção de emulsões e a capacidade de mantê-las estáveis são características essenciais na prospecção de microrganismos produtores de biossurfactantes (Pinto *et al.*, 2009). Os resultados indicam, portanto, que os isolados produziram emulsões com boa qualidade.

Considerando os resultados positivos e critérios estabelecidos de seleção de fungos produtores de lipase e de biossurfactante apresentados na Tabela 4, o fungo CBA 22043 e as bactérias CBA 1529 e CBA 1848, dentro das condições experimentais adotadas, podem ser considerados microrganismos capazes de produzir lipases e biossurfactantes. Martins *et al.* (2008) confirmaram que é possível a obtenção de lipases e biossurfactantes em um mesmo bioprocessamento, demonstrando que a produção de surfactantes não interfere na produção de lipases e vice-versa. Colla *et al.*, (2010), também demonstraram que é possível a obtenção destes biocompostos em um único bioprocessamento e sugere estudos de ampliação de escala para verificação da viabilidade econômica do processo.

## Conclusões

É possível a obtenção de lipases e biossurfactantes em um mesmo bioprocessos.

Os resultados do teste de distorção ótica, colapso da gota, índice de emulsificação e estabilidade da emulsão, indicaram que as cepas testadas são capazes de produzir metabólitos com propriedades tensoativas e emulsificantes.

As cepas que apresentaram bons volumes de emulsão foram capazes de mantê-las estáveis por até 168 horas, evidenciando um elevado potencial biotecnológico.

## Referências

- Araujo LV, Freire DMG 2013. Biossurfactantes: Propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. *Química Nova*, 858.
- Bodour AA, Miller-Maier RM 1998. Application of a modified drop collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 32(3):273-280.
- Bosch MP, Robert M, Mercade E, Guinea L 1988. Surface-active compounds on microbial cultures. *Tenside Surfactants Detergents*. 25:208-211.
- Burkert JFM, Maugeri F, Rodrigues MI 2004. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresource Technology*, 91:77-84.
- Carvalho PO, Calafatti AS, Marassi M, Silva DM, Contesini FJ, Bizaco R 2005. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. *Química Nova*, 28(4):614-621.
- Chahiniana H, Sarda L 2009. Distinction Between Esterases and Lipases: Comparative Biochemical Properties of Sequence-Related Carboxylesterases. *Protein & Peptide Letters*, 16:1149-1161.
- Chen C, Baker SC, Darton RC 2007. The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. *Journal of microbiological methods*, 70:503-510.
- Colla LM, Rizzardi J, Pinto MH, Reinehr CO, Bertolin TE, Costa JAV 2010. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocess. *Bioresource Technology*, 101:8308-8314.
- Cooper DG, Goldenberg BG 1987. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(2):224-229.
- Costa GAN. *Produção biotecnológica de surfactante de Bacillus subtilis em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações*. Campinas, 2005. 87 p. Dissertação - (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.
- Fungaro MHP, Maccheroni Jr. W 2002. Melhoramento genético para produção de enzimas aplicadas à Indústria de Alimentos. In: Melo, IS, Valadares-Inglis MC, Nass LL, Valois ACC. (Eds.). *Recursos Genéticos e Melhoramento-Microrganismo*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. pp. 426-453.
- Kim J 2014. Isolation and Characterization of a Biosurfactant – producing Bacterium *Bacillus pumilus* IJ-1 from Contaminated Crude Oil Collected in Teaken, Korea. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 57:5-14.
- Kouker G, Jaeger K 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial ENGEVISTA, V. 17, n. 3, p. 385-397, setembro 2015 396 lipases. *Applied and environmental microbiology*, 53:211-213.
- Kumar D, Kumar L, Nagar S, Raina C, Parshad R, Gupta VK 2012. Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. *Archives of Applied Science Research*, 4:1763-1770.
- Makkar RS, Cameotra SS 1997. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18(1):37-42.
- Mahjoubi M, Jaouani A, Guesni A, Ben AS, Jouini A, Cherif H, Najjari A, Boudabous A, Koubaa N, Cheriff A 2013. Hydrocarbonoclastic bacteria isolated from petroleum contaminated sites in Tunisia: isolation, identification and characterization of the biotechnological potential. *New Biotechnology*, 30(6):723-733.
- Martins VG, Kalil SJ, Costa JAV 2008. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. *Química Nova*, 31:1942-1947.

- Nitschke, M. *Produção e caracterização de biossurfatante de Bacillus subtilis utilizando manipueira como substrato*. Campinas, 2004. 88 p. Tese - (Doutorado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- Pinto MH, Martins RG, Costa JAV 2009. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. *Química Nova*, 32(8):2104-2108.
- Roveda M, Hemkermeier M, Colla LM 2010. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados de efluentes de laticínios por fermentação submersa. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30:126-131.
- Safary A. *et al.* 2010. Isolation and Characterization of Biosurfactant Producing Bacteria from Caspian Sea. *Biotechnology*, 9(3):378-382.
- Sierra, G 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*, 23:15-22.
- Souza AQL, Souza ADL, Astolfi FS 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazônica*, 34:185-195.
- Willumsen PA, Karlson U 1997. Screening of bacteria, isolated from PAH- contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation*, 7(5):415-423.

## Avaliação do crescimento e produção de proteases de culturas depositadas na Coleção de Fungos da Amazônia

Thayana Cruz de Souza<sup>1</sup>, Josy Caldas Rodrigues<sup>1</sup>, Clarice Virginia Santos Goiabeira<sup>1</sup>  
Wim Maurits Sylvain Degrave<sup>2</sup>, Leila de Mendonça Lima<sup>2</sup>,  
Ormezinda Celeste Cristo Fernandes<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Leônidas e Maria Deane-ILMD/Fiocruz/Amazonas, Rua Teresina, 476, Adrianópolis, Manaus, AM, 69057-070 Brazil.

<sup>2</sup> Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz/Rio de Janeiro, Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, 21040-360 Brazil  
Emails: thayanacruz@gmail.com, ormezinda.fernandes@fiocruz.br

### Resumo

As proteases microbianas representam aproximadamente 60% de toda a venda mundial de enzimas, e os fungos demonstram ser excelente fonte para obtenção dessas enzimas. Dessa forma, as condições precisas e o correto estágio de desenvolvimento do fungo devem ser estabelecidos para que seja conseguida a produção máxima da enzima de interesse. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento e a atividade de proteases de *Penicillium* sp. CFAM 107, *Penicillium variable* CFAM 521, *Penicillium citrinum* CFAM 592 e *Aspergillus flavus* CFAM 367. Os microrganismos foram reativados da Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM), autenticados e identificados em nível de espécie. A avaliação do crescimento e a investigação da produção de proteases foram realizados por fermentação submersa durante sete dias a 28°C/150 rpm em solução de Manachini. A cada 24 horas, as amostras foram retiradas e submetidas a filtração a vácuo, para separação e pesagem da biomassa e determinação da atividade proteolítica no extrato bruto. As amostras *Penicillium* sp. CFAM 107, *Penicillium citrinum* CFAM 592 e *Aspergillus flavus* CFAM 367 apresentaram crescimento diáuxico com produção de protease na fase log variando de 75 a 386 U/ml, enquanto *Penicillium variable* CFAM 521 foi o único que demonstrou fase lag e com atividade proteolítica inferior a 60 U/ml. Neste trabalho, os microrganismos se comportaram de maneiras diferentes mesmo cultivados em condições similares, podendo se concluir que cada fungo é único no seu desenvolvimento anatômico, morfológico e fisiológico, ainda que se esteja avaliando espécies do mesmo gênero.

**Palavras chave:** *Aspergillus*, *Penicillium*, protease

### Introdução

A ação hidrolítica específica das enzimas proteolíticas possui grande aplicação em diferentes setores, podendo ser de interesse para as indústrias de alimentos, couro, cosméticos, detergentes e farmacêutica (Savitha *et al.*, 2011). Acredita-se que a demanda global de enzimas atinja 7,6 bilhões em 2020, e as proteases destacam-se como uma das mais importantes para as indústrias, movimentando cerca de 1,2 bilhões de dólares, uma vez que desempenham importante papel na biotecnologia (GRAND VIEW RESEARCH, 2014).

As proteases microbianas representam aproximadamente 40% de toda a venda mundial de enzimas (Fedatto, 2004), e por sua vez, são enzimas preferidas quando comparadas às de origem animal e vegetal pela ampla diversidade bioquímica, susceptibilidade à manipulação genética, e rápida produção a um baixo custo (Gurung *et al.*, 2013).

Vale ressaltar que os fungos têm sido comumente utilizados como produtores de proteases obtidas por processos fermentativos que proporcionam a vantagem de não tornar necessário o uso de métodos caros de filtração, garantindo um extrato livre de contaminação (Vishwanatta *et al.*, 2010). Geralmente, as enzimas produzidas por fungos são extracelulares, o que facilita o processo de recuperação do meio de fermentação. Além disso, o uso de fungos como produtores de enzimas é mais seguro do que bactérias, pois eles normalmente são considerados como GRAS (*Generally Regarded As Safe*) (Souza *et al.*, 2015).

O sucesso para a produção da protease, considerada um metabólito fúngico, requer um conhecimento detalhado das características de crescimento e da fisiologia do fungo em questão. Por isso, para cada fermentação, as condições precisas e o correto estágio de desenvolvimento do fungo devem ser estabelecidos para que seja conseguida a produção máxima do metabólito de interesse (Papagianni, 2004). Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o crescimento e o perfil de produção de proteases das culturas fúngicas depositadas na Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM): *Penicillium* sp. CFAM 107, *Penicillium variabile* CFAM 521, *Penicillium citrinum* CFAM 592, *Aspergillus flavus* CFAM 367.

## Material e Métodos

Neste estudo, foram avaliadas quatro culturas depositadas na Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM) do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz) para avaliar o crescimento e o perfil de produção de proteases. São elas: *Penicillium* sp. CFAM 107, *Penicillium variabile* CFAM 521, *Penicillium citrinum* CFAM 592, *Aspergillus flavus* CFAM 367.

Para obtenção de culturas viáveis e puras, as espécies preservadas em água destilada esterilizada foram reativadas em meio ágar Extrato de Malte (MEA) em placas de Petri ( $\varnothing = 100$  mm x 15 mm) e os cultivos foram mantidos a 25 °C por sete dias (cultura estoque).

*Aspergillus flavus* CFAM 367 foi autenticado com base nas características morfológicas, conforme descrita por Raper e Fennel (1977) e Klich e Pitt (1988), enquanto que as culturas do gênero *Penicillium* foram identificadas em nível de espécie de acordo com Pitt (1979).

Para a autenticação e identificação taxonômica das espécies, foram observadas as características macromorfológicas (coloração, consistência, e diâmetro das colônias) e micromorfológicas (estruturas somáticas e reprodutivas) através do cultivo nos meios de cultura Ágar Czapek (CZ) Ágar Extrato de Malte (MEA) Ágar Glicerol 25% Nitrato (G25N) Ágar Czapek Extrato de Levedura (CYA) e Ágar Czapek 20% Sacarose (CY20S). Em cada placa foi feito o microcultivo e foram inoculados três pontos equidistantes para obtenção da macrocolônia. Os cultivos foram incubados a 25 °C durante sete dias.

A avaliação do crescimento de *Penicillium* sp. CFAM 107, *Penicillium variabile* CFAM 521, *Penicillium citrinum* CFAM 592, *Aspergillus flavus* CFAM 367 e a investigação da produção de proteases foram realizadas por fermentação submersa durante sete dias a 28 °C/150 rpm.

Os cultivos foram preparados em frascos Erlenmeyers de 50 mL contendo 30 mL da solução de Manachini (1987) suplementado com gelatina a 0,5%, pH 5,5. Em cada frasco foram inoculados três discos de cultura medindo 5 mm de diâmetro, obtidos da cultura estoque em ágar MEA. A cada 24 horas, as amostras foram retiradas para separação e pesagem da biomassa e determinação da atividade proteolítica no extrato bruto. O extrato bruto foi separado da biomassa por filtração a vácuo utilizando papel de filtro Whatman n°1 e membrana filtrante (0,45 $\mu$ m), em seguida, a biomassa foi desidratada a 80 °C.

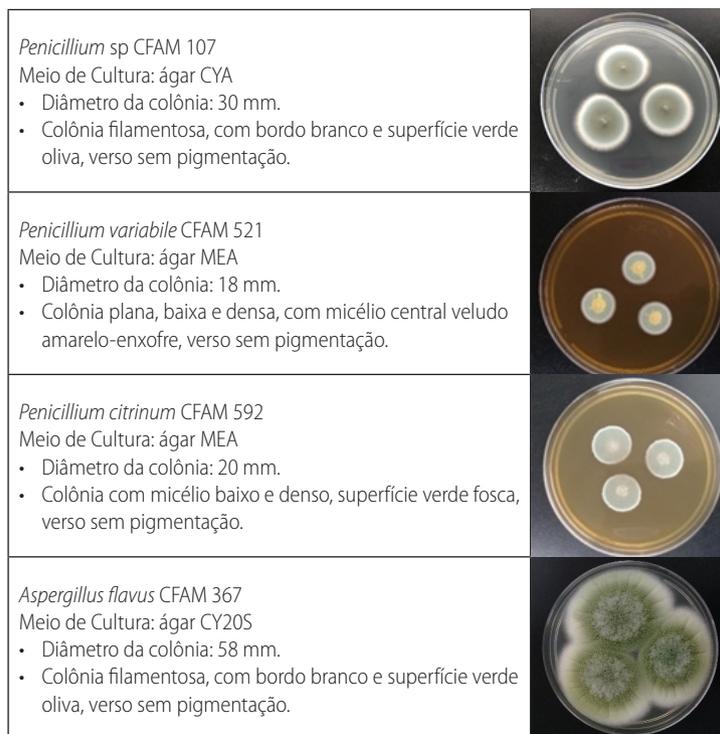
O extrato enzimático bruto foi submetido à avaliação proteolítica quantitativa, utilizando azocaseína 1,0% (p/v) (Sigma, St. Luis, MO USA), em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,2 (Alencar *et al.*, 2015).

Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzimas capazes de produzir um aumento na absorvância de 0,01 em 1 hora a 440 nm, sendo expressa em U/mL, segundo Souza *et al.*, (2015).

## Resultados e Discussão

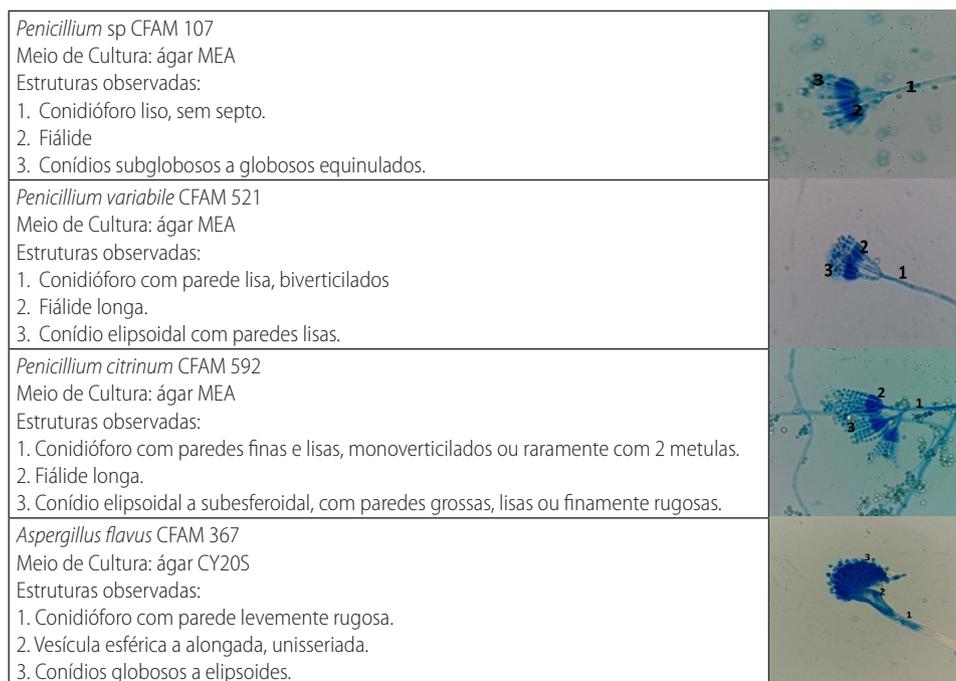
A preservação de fungos filamentosos em água destilada esterilizada (método de Castellani) vem sendo usada em coleções microbiológicas como um método de conservação, todavia as vantagens e desvantagens desse método estão associadas à fisiologia do microrganismo (Bezerra *et al.*, 2006).

Os resultados do processo de autenticação demonstraram a viabilidade e a pureza de *Penicillium* sp. CFAM 107, *Penicillium variabile* CFAM 521, *Penicillium citrinum* CFAM 592 e *Aspergillus flavus* CFAM 367, apesar da preservação dessa espécie pelo método de Castellani durante 11 anos na Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM). As características morfológicas persistiram de acordo com as descritas por Raper e Fennel (1977) e Pitt (1979) (Figuras 1 e 2).



**Figura 1.** Aspectos macroscópicos das culturas fúngicas

As culturas de *Penicillium* utilizadas neste estudo, estavam depositadas na coleção com informação quanto ao gênero, vale ressaltar que este trabalho possibilitou a identificação taxonômica em nível de espécie de *Penicillium variabile* CFAM 521 e *Penicillium citrinum* CFAM 592, contribuindo para a atualização dos dados da CFAM referente a estas cepas.



**Figura 2.** Aspectos micromorfológicos das culturas fúngicas

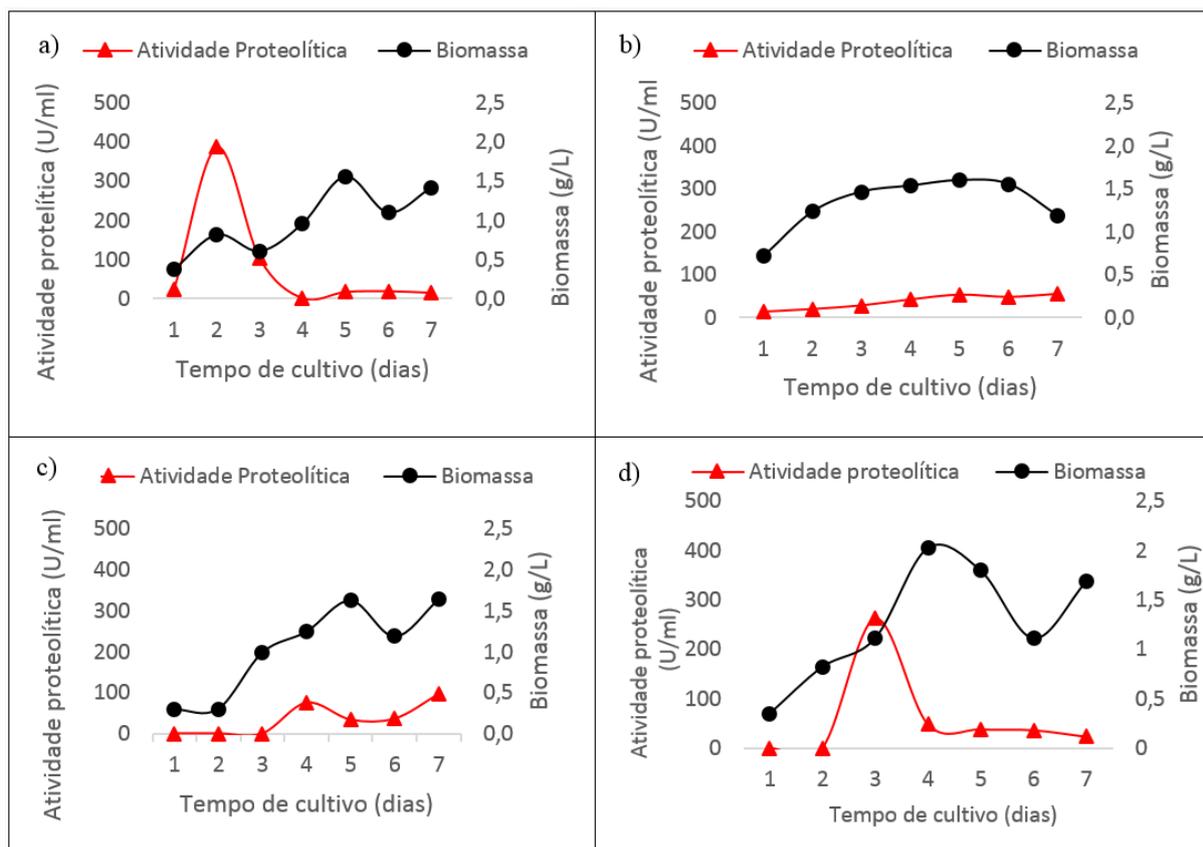
O conhecimento das características de crescimento de um organismo é essencial em biotecnologia para a eficácia do bioprocesso. Devido a isto, foi realizado o acompanhamento do crescimento das culturas fúngicas durante sete dias, para identificar o período em que ocorria a secreção de proteases para o meio de cultura. A figura 3 demonstra os resultados obtidos.

Observou-se que as culturas *Penicillium* sp. CFAM 107, *Penicillium citrinum* CFAM 592 e *Aspergillus flavus* CFAM 367 quando cultivadas em solução de Manachini, apresentaram crescimento do tipo diáuxico, sem expressão da fase lag (fase de adaptação). A ausência dessa fase está associada às condições fisiológicas da cultura utilizada como inóculo, a concentração do inóculo e condições nutricionais.

No crescimento do tipo diáuxico são observadas duas fases logs, isso ocorre porque um dos substratos é catabolizado preferencialmente (Teixeira *et al.*, 2011). Dessa forma, um substrato pode reprimir a quebra dos outros substratos presentes no meio de fermentação, e só é induzida após o primeiro substrato ter sido completamente metabolizado (Crueger & Crueger, 1990).

Com relação à atividade proteolítica, as maiores atividades foram obtidas de *Penicillium* sp. CFAM 107, no segundo dia de fermentação com 386 U/mL, no final da fase log. As outras duas espécies de *Penicillium* apresentaram valores inferiores e a partir do quarto dia de fermentação: 41 U/ml na fase lag e 75 U/ml na fase log para *Penicillium variable* CFAM 521 e *Penicillium citrinum* CFAM 592, respectivamente. *Aspergillus flavus* CFAM 367 apresentou pico de atividade enzimática no terceiro dia de fermentação (262 U/ml), durante a fase log.

Dessa forma, percebe-se que *Penicillium* sp. CFAM 107 demonstrou ser produtor de protease em maiores quantidades e em curto tempo em relação aos demais fungos analisados. A atividade proteolítica foi expressiva apenas no segundo dia de fermentação submersa (Figura 3a).



**Figura 3.** Crescimento de fungos (—●—) e atividade proteolítica (—▲—) nos cultivos em solução de Manachini. a. *Penicillium* sp. CFAM 107; b. *Penicillium variable* CFAM 521; c. *Penicillium citrinum* CFAM 592; d. *Aspergillus flavus* CFAM 367.

Investigações na produção de proteases por culturas fúngicas demonstram que há uma variação na quantidade de enzima produzida de acordo com a cultura utilizada (Merheb *et al.*, 2007). Neste trabalho, os microrganismos se comportaram de maneiras diferentes mesmo cultivados em condições similares, pois cada fungo é único no seu desenvolvimento anatômico, morfológico e fisiológico. Por isso, para cada fermentação, as condições precisas e o correto estágio de desenvolvimento de cada cultivo devem ser estabelecidos para que seja conseguida a produção máxima do metabólito de interesse (Papagianni, 2004).

## Conclusões

O método de preservação utilizado na Coleção de Fungos da Amazônia mostrou-se adequado para manutenção da viabilidade das linhagens analisadas neste estudo, garantindo a produção de metabólitos de interesse para as pesquisas biotecnológicas.

As espécies em estudo apresentaram exigências nutricionais para produção de proteases. *Penicillium* sp. CFAM 107, *Penicillium citrinum* CFAM 592 e *Aspergillus flavus* CFAM 367 apresentaram crescimento do tipo diáuxico e produção de proteases a partir do segundo dia de fermentação. Essas informações são relevantes para otimizar e melhorar o custo benefício da produção de proteases para aplicação industrial.

## Referências

- Alencar RB., Biondi MM, Paiva PMG, Vieira VLA, Carvalho Jr LB, Bezerra RS 2003. Alkaline proteases from digestive tract of four tropical fishes. *Braz. J. Food Technol.* 6:279-84,
- Bezerra CCF, Lima RF, Lazera MS, Wanke B, Borba CM 2006. Viabilidade e autenticação molecular de cepas de *Coccidioides immitis* da Coleção de Culturas do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 39(3): 241-244.
- Fedatto LM 2004. Caracterização de proteases extracelulares produzidas *Xylella fastidiosa* de citros e videira. Mestrado (Ecologia de Agroecossistemas) – Universidade de São Paulo. Piracicaba, São Paulo. 67 p.
- Grand View Research I 2014. Global Enzymes Market by Product (Carbohydrase Proteases, Lipases, Polymerases e Nucleases) Expected to Reach USD 7,652.0 Million by 2020.
- Gurung N, Ray S, Bose S, Rai V 2013. A Broader View: Microbial Enzymes and Their 112 Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. *BioMed Research International.* DOI: 10,1155/2013/329121, p. 1-18.
- Klich MA, Pitt JI 1988. A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs. 1. ed. *Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization.*
- Manachini PL, Fortina MG, Parini C 1987. Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnology Letters* 9: 219-224.
- Merheb CW, Cabral, H, Gomes E, Da-Silva R 2007. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chemistry* v.104. p. 127-131.
- Papagianni M 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, v. 22, p. 189-259.
- Pitt JI 1979. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. *Academic Press Inc*, London.
- Raper KB, Fennel DI 1977. The genus *Aspergillus*.
- Savitha S. *et al.* 2011. Fungal protease: Production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. *J Taiwan Inst Chem Eng*, v. 42, p. 298-304.
- Souza TC, Araújo CPM, Rodrigues JC, Filho, RFC, Fernandes OCC 2015. Análise Quantitativa da Produção de Proteases por *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp da Coleção de Fungos da Amazônia –CFAM/FIOCRUZ-AM em Diferentes Condições de Cultivo. *Scientia Amazonia*, v.4, n.2, 107-113.
- Souza PM, Bittencourt MLA, Caprara CC, Freitas M, Almeida RPC, Silveira D, Fonseca YM, Filho EXF, Junior AP, Magalhães PO 2015. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Braz. J. Microbiol.* vol.46 no.2 São Paulo abr./june. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246220140359>
- Vishwanatta KS, Appu Rao AG, Singh SA 2010. Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1849-1859.

## Análise de compostos poliméricos de *Pestalotiopsis microspora* por HPLC-ESI-MS para uso em Odontologia

Ana Paula Coelho Vieira<sup>1</sup>, Zacarias Filho R.P.<sup>1</sup>, Elissandro Fonseca Banhos<sup>1</sup>,  
Lizandro Manzato<sup>2</sup>, Afonso Duarte Leão de Souza<sup>3</sup>, Antonia Queiroz Lima de Souza<sup>3</sup>

<sup>1</sup> PG em Biodiversidade e Biotecnologia - Universidade do Estado do Amazonas

<sup>2</sup> Pesquisador - Instituto Federal do Amazonas

<sup>3</sup> Pesquisador - Universidade Federal do Amazonas

Emails: apcvieira@gmail.com, zacariasfilho@gmail.com, sandrobanhos@yahoo.com.br,  
lizandro.manzato@gmail.com souzadq@gmail.com, antoniaqlsouza@gmail.com

### Resumo

Os fungos produzem uma enorme variedade de macromoléculas ainda pouco explorada como potencial utilização nas indústrias farmacêuticas, alimentícias, têxtil, de pintura, cosmética e de papel, ou mesmo na produção de emulsificadores (Quitosana), estabilizantes (ácido hialurônico) e até agentes particionantes. Os fungos endofíticos amazônicos representam um potencial de matéria prima na produção e incorporação desses compostos em produtos existentes ou mesmo no desenvolvimento de novos biomateriais. O objetivo desta pesquisa foi extrair e pré-purificar exo e polissacarídeos do *Pestalotiopsis microspora* com a finalidade de caracterizar os biopolímeros solúveis e insolúveis. O *P. microspora* foi crescido em BDL por 30 dias a temperatura ambiente e seus exo e polissacarídeos foram extraídos com metanol a 40 C, depois foram concentrados e redissolvidos em água para a pré-purificação com MWCO de 30 e 3 kDa. Em seguida, das frações com mais de 30 kDa, de 30 a 3 kDa e menores que 3 kDa foram analisadas em espectrometria de massas (HPLS-ESI-MS). Os resultados mostraram maior concentração de moléculas na forma de dímeros e trímeros em sua maioria para os polissacarídeos do extrato solúvel do micélio do intervalo de 30 a 3 kDa, e a para as amostras menores que 3 kDa observou-se a presença de ácido glucônico, manose, xylose e galactose. Estes resultados permitem dar prosseguimento para a bioprospecção destes como blendas ou novos materiais odontológicos.

**Palavras-chave:** biopolímeros, fungos endofíticos, polissacarídeos

### Introdução

A Amazônia Legal tem extensão de 5.500.000 km<sup>2</sup>, sendo que 28 % dela corresponde ao Estado do Amazonas, maior unidade territorial federativa do Brasil. Nesta vasta extensão territorial se encontra parte da floresta Amazônica brasileira, rica em variedade de espécies macroscópicas e maior ainda quando se estuda seu potencial microbiótico (Souza, 2001). Esta diversidade da microbiota apresenta um imenso potencial farmacológico e biotecnológico a ser explorado. Os fungos representam uma grande e inexplorada porção desta microbiota, dentre eles os endófitos, encontrados no interior de espécies vegetais, responsáveis pela secreção de metabólitos que contribuem com a planta mantendo-a viva, por meio de produção de nutrientes, afastando seus predadores ou até mesmo atraindo insetos para a polinização. Os polissacarídeos (PS) são macromoléculas naturais responsáveis pela manutenção da vida, e compõem o grupo de compostos mais abundantes da biosfera, também são chamados de glicanas (Silva, 2006, Poli 1999). Nos vegetais eles correspondem a celulose, lignina, pectina e ao amido, reserva de energia, nos animais corresponde ao glicogênio, enquanto que nos microrganismos eles podem fazer parte da parede celular ou ser excretados por estes. Os PS são polímeros de monossacarídeos, com propriedades específicas inerentes aos fungos de onde são extraídos, ou secretados nas culturas (Barbosa, 2004; Moreno, 1998). Os exopolissacarídeos (EPS), termo usado primeiramente por Sutherland (1972), são polissacarídeos extracelulares (presentes no meio de cultura, produzidos durante o processo de cultivo) na forma de polímeros de alto peso molecular compostos de açúcares e secretados por microrganismos, funcionando como um sistema químico de adaptação às adversidades providas pelo ambiente.

Como via de regra a produção de EPS depende da necessidade imposta por nichos ecológicos do ambiente natural e sua produção envolve um gasto de 70 % da energia total de reserva, representando um importante investimento de carbono para o microrganismo. Esta demanda de energia (carbono) gasta na sua produção, tem um exigência metabólica compensada pelas vantagens na forma de estratégias de crescimento, tais como mecanismos de adesão à superfícies ou na obtenção de nutrientes, proteção contra variações de temperatura, de salinidade e de possíveis predadores (Papinutti, 2010). A composição do meio e as condições de cultivo interferem diretamente na produção dos EPS microbianos. (Canilha, 2005; Jin, 2011; Jing, 2015; Freitas, 2009).

Dentre os tipos de biomateriais utilizáveis na saúde podemos citar: biocompósitos de cadeias organizadas ou heterogêneas, que possibilitam a extração de polímeros e copolímeros que podem ser incorporadas formando blendas de materiais de sustentação como: poliuretanas, silicones, acrílicos, metais (titânio e Nitinol (NiTi)), alumina (cerâmicas vítreas), hidroxiapatitas naturais e sintéticas, ou blendas de materiais reabsorvíveis como os hidrogéis (Ruel-Gariepy, 2004), além de exercerem atividades na forma de polímeros inteligentes (não-newtonianos) como biomateriais, biotécidos, materiais porosos, condutores de eletricidade, materiais que imobilizam biomoléculas, micropartículas e nanopartículas incorporadas, todos os tipos de materiais usados em saúde que podem sofrer influência de biocompostos, incorporados ou associados.

Atualmente originárias das plantas (goma arábica e pectina), das algas (alginato, ágar ágar) dos crustáceos (quitina) e os PS de origem fúngica já comercialmente lucrativos (goma xantana, gellan, pulullam alginato) correspondem a uma pequena parcela do mercado (Canilha, 2005, Veiga 2007, Vijayabaskar, 2011). Alguns fluídos fúngicos apresentam comportamento não newtoniano, possibilitando a agregação em matérias primas levando a melhora da resistência de tração, além do conhecido efeito bactericida, antimicótico e antitumoral (Yu, 2004, 2007, 2009; Barbosa, 2004; Figueiredo, 2007; Chen, 2007; Shih, 2010, Wong, 2003).

Para este trabalho foi selecionado o fungo endofítico *Pestalotiopsis microspora* (AnspCg1 1.3a), reativado da coleção de trabalho do Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia da Universidade Federal do Amazonas (LabMicrA/UFAM) por apresentar maior rendimento de PS, grande potencial excretor de EPS, além de fase gel bem definida. Tanto o cultivo quanto o tratamento dos compostos e caracterização por HPLC-ESI-MS foram direcionados à bioprospecção para uso em odontologia, por meio de incorporação em materiais de sustentação e forma de compostos biocompatíveis, bacteriostáticos com comportamento de líquido não newtonianos a fim de otimizar biotecnologicamente produtos existentes, para potencializar suas características físicas e químicas. (Paterson, 2008, Lu, 2004, Aly, 2010, Chupa, 2009).

Objetivando avaliar a presença de exo e polissacarídeos do fungo endolítico *Pestalotiopsis microspora* e caracterizar os extratos pré-purificados por espectrometria líquida de massas visando sua viabilidade para o desenvolvimento de biomateriais odontológicos.

## **Material e Métodos**

Para este estudo foi selecionado o fungo endofítico AnspCg1 1.3a (*Pestalotiopsis microspora*) do acervo do LabMicrA-UFAM, crescido por 8 dias, em BDA, à temperatura de 26 °C e depois foram cultivados em 60 Erlemeyer de 1000 mL contendo 300 mL de meio de cultura BDL (batata, dextrose acrescida de 2% de extrato de levedura) contendo três fragmentos de 8 mm de diâmetro do ágar com micélio., por um período de 30 dias a temperatura ambiente.

Após este período o material foi filtrado a vácuo e separado em: meio líquido (ML) e micélio (MI), em seguida o ML foi saturado com Metanol (4:1) deixado sob refrigeração à 4 °C e após 48 h foi centrifugado à 12000g por 20 minutos (CR 21GIII - High Speed Refrigerated Centrifuge - Hitachi) na mesma temperatura e o precipitado recolhido (palet). O MI foi extraído com metanol, suficiente para cobrir o micélio e este foi filtrado 48 h depois e repetido o processo de extração. Após a obtenção dos extratos do MI os compostos foram concentrados em rota evaporador e a fase aquosa deste extrato e do ML foram liofilizados e depois hidratados com água milli-Q estéril.

**Tabela 1.** Extratos de *P. micorpora* por HPLC-ESI-MS dos exo e polissacarídeos nos intervalos maiores de 30 kDa, de 30 a 3 kDa e menores que 3 kDa.

Polissacarídeo dos extratos de <i>P. micorpora</i> dialisado -	Intervalos utilizados	Identificação da amostra
Polissacarídeo insolúvel	maiores que 30kDa	PES Mic>30Da
Polissacarídeo solúvel	intervalo entre 30kDa e 3kDa	30kDa>PesMic>3kDa (Palet)
Polissacarídeos soluveis	menores que 3kDa	PesMic < 3kDa (Palet)
Exopolissacarídeo insolúvel	maiores que 30kDa	PES ML>30kDa
Exopolissacarídeo solúvel	intervalo entre 30kDa e 3kDa	30kDa>PesML>3kDa (Palet)

A pré-purificação foi realizada em tubos de diálise de uso único, Vivaspin® Turbo 15 nos tamanhos de 3kDa e 30kDa, centrifugados a 4000 rpm por 60 min. sob temperatura de 20 °C conforme indicação do fabricante (Copyright © Vivaproducts, 1998-2016). Os extratos obtidos estão distribuídos conforme Tabela 1. Em seguida os extratos seguiram para análise por HPLC-ESI-MS.

Para linhagem *P. microspora* (AnspCg1.1.3a) foi realizada análise de HPLC-ESI-MS em coluna C18, da Phenomenex com analisador de espectrometria de massas ajustado para a faixa de 100 a 1000 e usando 10 µL em cada injeção. O modo de eluição do gradiente linear consistiu de 100 % de água.

## Resultados e Discussão

A produção dos PS de *P. microspora* obtidos do micélio rederam 21g de extrato bruto do micélio para 28 L de meio de cultivo e destes 30% foram de PS solúveis, enquanto que dos EPS foram obtidos 10 g, destes aproximadamente 5 % eram também solúveis. Após a centrifugação com as peneiras moleculares de MWCO de 30 e 3 kDa foram obtidos três extratos pré-purificados: 1. Maiores de 30 kDa (insolúveis), 2. Com tamanho entre 30 a 3 kDa (gelatinosos) e 3. Menores de 3 kDa (solúveis).

Após análise dos picos de eluição foi detectada a presença de PS de espectro que indicam a presença de dímeros para os intervalos entre 255 m/z e 393 m/z, sequencialmente. tanto para o extrato do MI quanto para do ML. Obtendo se 3 amostras de cada um desses extratos pré-purificados. Onde 30kDa > PES MI > 3kDa, corresponde ao intervalo da pré-purificação, dos extratos de *Pestalotiopsis* do ML (EPS), cujas as moléculas são hidrossolúveis com tamanho entre 30 e 3 kDa e os sacarídeos encontrados foram o mais próximo de glicose. Onde 30kDa > PesMic > 3kDa corresponde ao intervalo das pré-purificações que as moléculas solúveis são correspondentes ao precipitado do micélio, correspondendo aos PS. O resultado das análises dos extratos dialisados está na Tabela 2, conforme análise observou-se a presença de HO(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>OCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COO(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>OH, BSuB, enquanto que o ácido glucônico se mostrou bem distinto. Os resultados foram analisados e os intervalos achados se comportaram conforme a literatura para as leituras de mesmo alcance de acordo com Wu et al, 2014; Gariépy, et al. 2004; Rizzarelli e Carroccio, 2014.

Segundo Silva (2006) e Cunha (2008), estudos sobre o efeito do substrato limitante na síntese de exopolissacarídeos, por vários tipos diferentes de microrganismos, demonstraram claramente que a composição do meio pode afetar a síntese de glucanas fúngicas. Alterações no pH, temperatura, concentração iônica, alta solubilidade, afetaram a produção do EPS produzido bem como interações sinérgicas com outros polissacarídeos.

**Tabela 2.** Picos da análise dos extratos de *P. micorpora* por HPLC-ESI-MS dos exo e polissacarídeos nos intervalos de de 30 kDa, de 30 a 3 kDa e menores que 3 kDa

Extrato pré-purificado	m/z	Sacarídeos
<b>30kDa&gt;PES MI&gt;3kDa</b>	429	glicose
<b>30kDa&gt;PesMic&gt;3kDa</b>	263	HO(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> OCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COO(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> OH BSuB
<b>Pes Mic &lt; 3kDa</b>	199	ácido gluconico
<b>Pes MI&lt;3kDa</b>	217	desconhecido

A influência das condições da cultura na produção de EPS pelos foi estudada por Barbosa (2004) e verificou-se que, ao aumentar a concentração de açúcar no meio, a produção do EPS não aumentou e quando o meio foi suplementado com etanol houve aumento na produção do polímero. Em meios fúngicos o comportamento se manteve semelhante, sendo o meio fator limitante para o crescimento quando levado em consideração a oferta de nutrientes.

Papinutti (2010) avaliou EPSs produzidos por *Ganoderma lucidum*, em diferentes meios de cultura tendo como parâmetro a produção de celulose e glicose, observou que o pH do meio um fator chave que afetou significativamente a produção de biomassa fúngica e conseqüentemente a produção de EPS, em meios ácidos e morte celular após 8 dias em pH 6. Outro fator avaliado foi em relação ao stress causado pela escassez de água por meio de adição de polietileno glicol, observou-se produção de EPS específicos neste ambiente, semelhante ao notado com a diminuição do pH. *P. microspora* manteve seu pH praticamente inalterado durante todo o seu cultivo (5,5) e também houve pouca redução das fontes de carbono. Em estudos recentes com este fungo verificou-se que a curva de sobrevivência deste chegou a 60 dias, iniciando a morte celular após 40 dias e chegando ao apice de sua biomassa por volta dos 25 dias. O aumento de viscosidade do meio de cultura e o aumento de biomassa de *P. microspora*, fazem desta linhagem uma potencial produtora de EPS e PS com aplicação industrial.

Souza *et al.*, (2004) estudou o potencial antimicrobiano de fungos endofítico da Amazônia e mostrou que os mesmos apresentavam metabólitos extracelulares com potencial inibidor de microrganismos patogênicos, contudo eles caracterizaram micromoléculas. Também constatou por diálise que o tamanho das moléculas bioativas eram menores que 12000 daltons. Chen (2011) através de estudo de caracterização das propriedades antioxidantes dos EPS produzidos por fungo endofítico *Aspergillus* sp., observou que o tamanho de membrana de diálise para EPS variam de 5 kDa a 2k Daltons enquanto Jing (2015), usou uma membrana de 500 Daltons para *Cordyceps militares*. Na revisão de literatura os maiores pesquisadores de endofitos na atualidade são os chineses e o brasileiros (Souza, 2004), os primeiros trabalham com *Aspergillus* e *Cordyceps* em sua maioria, iniciando desde 2005 (Buenz; Paterson, 2008; Li, 2005) estudos com ervas usadas em medicina tradicional chinesa, partindo do princípio de sua ação descrita nessa literatura (Liu, 2007, Li, 2005). Vale ressaltar que os PS e os EPS podem apresentar atividade antimicrobiana, pois muitas das cadeias de PS estão ligadas a micromoléculas, como ácidos e outras.

Wu (2014) analisou polissacarídeos com interesse em compostos bioativos aplicados à alimentação (emulsificantes), biocompatibilidade, atividade antimicrobiana e imunoterapêuticos, buscando caracteres por espectrometria de coluna pre-derivada de Espectrometria de Massas com ionização por eletrospray (electrospray ionisation mass spectrometry - HPLC/ESI/MS) e observou a presença dos seguintes sacarídeos manose, rhamnose, glicose, galactose, xilose.

De acordo com Cord-Landwehr (2016) a produção de quitina pelos *Pestalotiopsis* sp. se dá com a finalidade de interferir no sistema imunológico da planta hospedeira impedindo que seu sistema imune ataque o endofito. Esta mesma ação espera se empregando esse polissacarídeo na forma de hidrogel, podendo ser empregado na distribuição de medicamentos por biotécidos em engenharia de tecidual ou compartilhado em materiais odontológicos.

## Conclusões

De acordo com resultados encontrados nesta pesquisa foi possível selecionar extratos de polissacarídeos solúveis e insolúveis a partir de extração do *P. microspora*.

Nas análises de HPLC-ESI-MS foram encontrados moléculas de glicose ácido glucônico e de  $\text{HO}(\text{CH}_2)_4\text{OCO}(\text{CH}_2)_2\text{COO}(\text{CH}_2)_4\text{OH}$ , BSuB, que podem ser usadas na produção de blendas de enxertia óssea associadas a hidroxapatitas, como emulsificantes em materiais de moldagem e síntese de ácido hialurônico (HA) usados em procedimentos estéticos e reabilitadores.

Atualmente esse material é de amplo uso em procedimentos de harmonização orofacial, e são extraídos de origem animal ou sintetizados, sendo os sintéticos mais procurados por sua estabilidade e menor potencial alérgico.

## Referências

- Aly AH, Debbab A, Kjer J, Proksch P 2010. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Divers* 41:1–16.
- Barbosa, A M. *et al.* 2004. Produção e Aplicações de Exopolissacarídeos Fúngicos. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 25, n. 1, p. 29-42, jan./jun.
- Canilha, L, Silva, DDV, Carvalho, W, Mancilha, M 2005. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa. Parte 3: polissacarídeos e enzimas. *Revista Analytica*, 20, 332–341.
- Chen Y. *et al.* 2011. Structural characterization and antioxidant properties of an exopolysaccharide produced by the mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. Y16. *Bioresource Technology*, 102: 8179–8184.
- Chen W, Zhao Z, Chen SF, Li, YQ 2008. Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect in vitro. *Bioresource Technology* 99:3187–3194.
- Chupa JM, Foster, AM, Sumner, SR, Madihally, SV, Matthew, HWT 2000. Vascular cell responses to polysaccharide materials: in vitro and in vivo evaluations. *Biomaterials* 21: 2315-2322.
- Cord-Landwehr, S. *et al.* 2016. A chitin deacetylase from the endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. efficiently inactivates the elicitor activity of chitin oligomers in rice cells. *Sci. Rep.* 6:38018.
- Cunha, MAA, Pawalak, MP Fabris, Barbosa, AM, Deekker, RFH 2008. Produção de exopolissacarídeo pelo fungo *Ascomiceto Batryspheariarthodinal*. ISSN 1981-336x/ v.02, n20.
- Freitas, F *et al.* 2009. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. *Bioresource Technology* 100:859–865. In, M L LUZ, Q, HUANG, M, WANG, Y M, Wang YZ 2011. Sulfated modification and antioxidant activity of exopolysaccharides produce by *Enterobacter cloacae* Z0206. *Int. J. Biol. Macromol.* 248:607 – 612.
- Jing Y *et al.* 2015. Structural Characterization and Biological Activities of a Novel Polysaccharide from Cultured *Cordyceps militaris* and Its Sulfated Derivative. *J. Agric. Food Chem.* 63, 3464 – 3471.
- Jing YS, Cui XL, Chen ZY, Huang LJ, Song IY, Yu RM 2014. Elucidation and biological activities of a new polysaccharide from cultured *Cordyceps militaris*. *Carbohydr. Polym.* 102, 288 – 296.
- Li H, Qing C, Zhang Y, Zaho Z 2005. Screening for endophytic fungi with antitumor and antifungal activities from Chinese medicinal plants. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 1515-1519.
- Liu AR, Xu T, Guo ID 2007. Molecular and morphological description of *Pestalotiopsis hainanensis* sp. nov., a new endophyte from a tropical region of China. *Fungal Divers*, 24: 23-36.
- Lu Y, Chen SC 2004. Micro and nano-fabrication of biodegradable polymers for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 56:1621–33.
- Moore MNDO 2006. Nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environ. Int.* 32 (8):967 – 976.
- Papinutti I 2010. Effects of nutrients, pH and water potential on exopolysaccharides production by a fungal strain belonging to *Ganoderma lucidum* complex. *oresource Technology* 101:1941–1946.
- Paterson RRM 2008. Fungal enzyme inhibitors as pharmaceuticals, toxins, and scourge of PCR. *Curr. Enzyme Inhib.* 4:46–59.
- Ruel-Gariepy E, JC Leroux 2004. In situ-forming hydrogels—review of temperature - . Sensitive systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58:409–426.
- Shih IL *et al.* 2010. Microbial Exo-Polysaccharides for Biomedical Applications. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 10:1345-1355.
- Silva MLC. *et al.* 2006. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. *Quím. Nova*, São Paulo, 29(1)85-92, Feb.
- Souza AQL. *et al.* 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* Benth. *Acta Amazonica*, 34(2):185-195.
- Sutherland IW 1972. *Advances in Microbial Physiology*, Vol: 8, Issue: C, Page: 143-213.
- Vijayabaskar P, Babinastarlin S, Shankar T, Sivakumar, T, Anandapandian KTK 2011. Quantification and Characterization of Exopolysaccharides from (MTCC 121). *Advances in Biological Research* 5 (2):71-76.

- Wu X, Wei J, Lu J, Yu Y, Wu B 2014. Analysis of the monosaccharide composition of water-soluble polysaccharides from *Sargassum fusiforme* by high performance liquid chromatography/electrospray ionisation mass spectrometry. *Food Chemistry*,145(15):976-983.
- Yu R. *et al.* 2004. Isolation and biological properties of polysaccharide CPS-1 from cultured *Cordyceps militaris*. *Fitoterapia* 75: 465-472.
- Yu R *et al.*2007. Structural characterization and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of cultured *Cordyceps militaris*. *Carbohydrate Polymers* 70: 430-436.
- Yu RM; Yin Y, Yang W, Ma WL, Yang L, Chen XJ, Zhang Z, Ye B, Song LY 2009. Structural elucidation and biological activity of a novel polysaccharide by alkaline extraction from cultured *Cordyceps militaris*. *Carbohydr. Polym.* 75:166 – 171.

# Obtenção de biomassa de leveduras produtoras de carotenoides em hidrolisado da casca de mandioca

Daiana Rodrigues Torres<sup>1</sup>, João Vicente Braga de Souza<sup>2</sup>, Inês Conceição Roberto<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Escola de Engenharia de Lorena/Universidade de São Paulo – EEL/USP

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Emails: daianatorres@usp.br; ines@debiq.eel.usp.br

## Resumo

O presente trabalho visou o aproveitamento de cascas de mandioca para a obtenção de biomassa de leveduras produtoras de carotenoides. Inicialmente, foi realizado o isolamento e identificação das leveduras a partir de amostras de solo, água e frutos maduros coletadas na Reserva Florestal Adolfo Ducke, Manaus-Amazonas-Brasil. Em uma segunda etapa, foi realizada a coleta, processamento, caracterização das cascas de mandioca quanto ao teor de amido, assim como a obtenção do hidrolisado por catálise ácida empregando  $H_2SO_4$ . O hidrolisado de cascas de mandioca (HCM), contendo  $\sim 48g/L$  de glicose, teve seu pH ajustado para 6,0 e então utilizado como fonte de carbono para o cultivo das leveduras previamente isoladas (solo = 4, água = 2 e fruto = 1), as quais foram identificadas como pertencentes ao gênero *Rhodotorula*. A partir dos cultivos dos isolados em HCM sob agitação de 180 rpm a 30 °C por 96 horas, obteve-se uma produção de biomassa seca variando de 10 à 14 g/L, sendo observada a coloração característica de carotenoides em todas as leveduras. Com base nos resultados obtidos pode-se inferir que o hidrolisado da casca de mandioca apresenta-se como um meio de cultivo favorável ao crescimento de leveduras pigmentadas.

**Palavras-chave:** Leveduras, casca de mandioca, carotenoides.

## Introdução

Os carotenoides são isoprenóides lipofílicos, formados a partir de unidades de isopreno, com 40 carbonos (tetraterpenóides) em suas cadeias e com duplas ligações alternadas e a molécula invertida no centro. Estes pigmentos são encontrados naturalmente em vários seres vivos, desde microrganismos até animais, podendo ser sintetizado por algumas espécies de bactérias, fungos, algas e plantas. Em alguns animais como: peixes, aves e crustáceos, os carotenoides podem ser bioacumulados a partir da alimentação. Esta classe de pigmentos possui coloração que pode variar do amarelo até o vermelho, como exemplo os carotenoides: Lutéina, (amarela) produzida pela microalga *Chlorella sorokinina* (Mulders *et al.*, 2014);  $\beta$ -caroteno (laranja) pela levedura *Rhodotorula rubra* (Banzatto *et al.*, 2013); Bixina (laranja) pela planta Bixa orellana, popularmente conhecida como Urucum (Downham e Collins, 2000) e a Cantaxantina (vermelha) pela actinobactéria *Streptomyces spp.* (Palanichamy *et al.*, 2011). Atualmente já foram identificadas mais de 700 estruturas de moléculas carotenoides (Amorim-Carrilho *et al.*, 2014; Mesquita *et al.*, 2017)).

Industrialmente, os carotenoides são utilizados principalmente para conferir, restaurar ou ainda padronizar a cor de alimentos processados, como em sucos de frutas, massas, bebidas, doces, margarinas, queijos e salsichas. Também são adicionados em rações para animais, incluindo aves, peixes e crustáceos para intensificar a cor de produtos como: gemas de ovos, pele de frangos e carnes de peixes e camarões. Nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos esses pigmentos podem ser utilizados na coloração de cápsulas de medicamentos, suplementos nutricionais e produtos dermatológicos ou ainda compor a formulação destes itens devido à sua ação anti-oxidante e pró-vitamina A (Bhosale e Grade, 2001; Valduga, *et al.*, 2009; Ferreira, 2014).

Devido à larga aplicação industrial apresentada pelos pigmentos carotenoides, a sua obtenção a partir de processos biotecnológicos a partir de microrganismos, tem se mostrado interessante devido a vantagens como: 1) característica natural das substâncias produzidas; 2) menor espaço para a produção; 3) possibilidade de controle das condições de cultivo; 4) não competem com fontes alimentícias e independem da sazonalidade; 5) possibilidade do aproveitamento de subprodutos agroindustriais como fonte de carbono para os cultivos (Ferreira, 2014; Machado e Burkert, 2014; Saha *et al.*, 2015)

As vantagens apresentadas em processos biotecnológicos, por microrganismos tem motivado estudos de prospecção e de técnicas de produção. Alguns processos biotecnológicos de origem microbiana já encontram-se em fase de produção comercial, podendo ser citado a produção de caroteno pelo fungo *Blakeslea Tripora* e a produção de astaxantina pela microalga de água doce *Haematococcus* sp. e pela levedura *Phaffia rhodozyma* (Mezzomo e Ferreira, 2016). Além destes processos, tem-se ainda observado o registro de patentes em diversos países (Tabela 1), que descrevem aspectos relacionados aos processos de produção e extração, manipulação genética de microrganismos produtores e aplicação dos carotenoides em diferentes formulações.

Dentre os tipos de microrganismos produtores de carotenoides, as leveduras, em especial as pertencentes ao gênero *Rhodotorula*, têm se destacado dentro dos bioprocessos devido a sua capacidade de produção de moléculas carotenoides de alta aplicabilidade comercial como o  $\beta$ -caroteno, toruleno e torularodina (Banzatto, 2013), que além de apresentarem ação de pigmentação, possuem também atividades pró-vitáminica e anti-oxidante, podendo ainda apresentar potencial anti-microbiano.

Os carotenoides produzidos por leveduras são acumulados intracelularmente e estão envolvidos nos processos de respostas ao estresse ambiental e nutricional a que estes organismos são submetidos. Desta forma, sua síntese é influenciada por diferentes fatores exógenos, que podem afetar os rendimentos e custos de operação, sendo importante ressaltar que a fonte de carbono tem sido relatada como um dos principais fatores estudados, que influenciam na produção de biomassa pigmentada por carotenoides. No que se refere aos meios de cultivo para a produção biotecnológica de carotenoides, muitos estudos têm empregado o uso de subprodutos agroindustriais como matéria-prima em bioprocessos, visto que possuem em sua composição polissacarídeos, fibras, minerais e proteínas, os quais poderão gerar meios nutritivos para o desenvolvimento de microrganismos.

Dentre os subprodutos agroindustriais destaca-se a casca de mandioca, que é um resíduo sólido, gerado durante o processamento deste tubérculo para a fabricação da farinha ou fécula. Este resíduo é constituído pelas cascas propriamente ditas (película marrom) e por entrecasas, detritos do córtex e pontas de raízes, apresentam em sua composição alto teor de amido, além proteínas e fibras, representando de 10 a 35% do total de raízes processadas, dependendo do tipo de descasque (manual ou mecânico) utilizado no processamento. Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de mandioca, com 10% da produção mundial e produção de 18,8 milhões de toneladas na safra 2017/2018 (IBGE, 2017). Ainda, segundo o Instituto Nacional de Geografia e Estatística - IBGE, esta cultura está amplamente distribuída em todas as regiões do País, sendo a Região Norte líder de produção com 7,2 milhões de toneladas, seguida da região Sul com 4,7 milhões de toneladas e pela Região Nordeste com 3,8 milhões de toneladas.

Assim, diante do grande volume de cascas geradas nas indústrias do processamento da mandioca e do seu alto teor de amido, este subproduto é uma matéria-prima em potencial para a obtenção hidrolisados nutritivos para o cultivo de leveduras pigmentadas. Considerando ainda, a grande demanda de mercado por pigmentos carotenoides (que cresce anualmente a uma taxa de 3,9% com arrecadação de US\$ 1,3

**Tabela 1.** Patentes relacionadas à produção biotecnológica de carotenoides, compilados na base de dados Espacenet Patent, nos últimos cinco anos.

Título da patente	País	Ano de depósito	Nº de reg.
Método para ajustar níveis de produção e composição de carotenoides em <i>Rhodospiridium</i> e <i>Rhodotorula</i> genera	Singapura	2014	SG11201704890UA
Método de produção de astaxantina ou percursoros	França	2016	US2019256838A1
Composto carotenoide contendo crocetina e seu método de preparo	Japão	2016	CN108203378A
Método de cultivo de microalga <i>Coalestrella rubesans</i> para produção de carotenoides e lipídeos	Rússia	2017	RU2661086C1
<i>Rhodotorula mucilaginoso</i> mutante e sua aplicação	China	2017	CN107699502A
Método de rompimento e produção de carotenoides	China	2017	CN107827798A
Algas unicelulares <i>Mallomonas kalinae</i> – produtora do carotenoide fucoxantina	Rússia	2017	WO2018199814A1
Produção de carotenoides e apocarotenoides	Singapura	2018	WO2018156086A1
Composição contendo carotenoides e método de preparo do composto	Japão	2018	WO2019213538A1

bilhões no ano de 2017) e o apelo por pigmentos de origem natural, o presente trabalho poderá contribuir tanto para o desenvolvimento de estudos visando o aproveitamento de cascas de mandioca em processos biotecnológicos, quanto na exploração do potencial de leveduras isoladas na Região Amazônica, com potencial para a produção de pigmentos carotenoides.

## Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório da Fermentação I do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (EEL/USP), sob a coordenação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Inês Conceição Roberto e no Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, sob a coordenação do Prof<sup>o</sup>. Dr. João Vicente Braga de Souza.

O isolamento de leveduras foi realizado a partir de amostras de solo, água e frutos maduros (Buriti, açaí e pupunha) de espécies de plantas nativas da Região Amazônica. As amostras foram coletadas de uma região da mata preservada na Reserva Florestal Adolfo Ducke, Manaus, Amazonas e processadas no Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. Para o isolamento e manutenção das culturas foi utilizado o meio de cultura YEPD (15 g de extrato de levedura, 10 g de peptonas, 20 g de glicose, 15 g de ágar por litro). Para cada amostra foi pesado 1 g em tubos de ensaio, adicionados 9 mL de água peptonada (0,8%) e homogeneizados em vórtex. A partir destas soluções, foram realizadas diluições sucessivas até  $10^{-3}$  em tubos de ensaio contendo água peptonada. De cada diluição, foram retiradas alíquotas de 100  $\mu$ L e adicionadas em placas de Petri contendo o meio YEPD. Com o auxílio de alça Driglalski, a alíquota foi espalhada de forma homogênea na superfície do meio de cultura e as placas incubadas a 28 °C por um período de 48-72 horas (Moreira, 2010). Após este período, apenas colônias que apresentaram coloração entre o amarelo e o vermelho (indicativo da presença de pigmento carotenoides) foram selecionadas para o cultivo em hidrolisado de cascas de mandioca (HCM).

As cascas de mandioca foram doadas pela Empresa Santa Helena Alimentos – SHA Serviços em alimentação, que fornece refeições para o restaurante universitário da Escola de Engenharia de Lorena - EEL. O material coletado foi seco naturalmente até alcançar teor de umidade de aproximadamente 10%. Após secagem, as cascas foram trituradas em moinho de facas e acondicionadas em recipiente plástico hermeticamente fechado até a realização dos experimentos de caracterização e hidrólise. A caracterização quanto ao teor de amido presente nas cascas de mandioca foi realizada de acordo com o método oficial AOAC 996.11 – Determinação padrão de amido em cereais.

Para a obtenção do hidrolisado ácido das cascas de mandioca (HCM), 10 g de cascas seca foram pesadas diretamente em frascos Erlenmeyers (500 mL) e adicionados 100 mL da solução de ácido sulfúrico (1% m/v), como catalisador. Os frascos contendo a mistura reacional, foram levados à autoclave para tratamento térmico a 121 °C por 120 minutos. O hidrolisado obtido foi filtrado em papel filtro qualitativo para separação do sólido residual. A partir do filtrado, foram retiradas alíquotas para determinação dos açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O hidrolisado foi então estocado em freezer (5 °C) até a sua utilização no cultivo das leveduras. Para o cultivo das leveduras em HCM, o pH do hidrolisado foi ajustado para 6,0 com solução de NaOH 10M, centrifugado (5000 rpm, 10 minutos) e esterilizado em autoclave a 110 °C, 0,5 atm, por 10 minutos.

Antes do preparo do inóculo, as leveduras selecionadas foram repicadas em tubos contendo ágar YEPD e incubados por 24 horas a 30 °C. Após esse período, uma alçada de cada cultura foram transferidas para tubos de ensaio contendo água esterilizada e as suspensões obtidas tiveram sua densidade óptica (a 600 nm) ajustada para 0,6 unidades. De cada suspensão foram transferidos 2mL para frascos Erlenmeyers (125 mL), contendo 25mL de HCM. Os frascos foram incubados em equipamento do tipo Shaker com agitação orbital de 180 rpm, a 30 °C, por 96 h. Ao final dos cultivos a biomassa produzida foi recuperada por centrifugação (5000 rpm, por 10 minutos) e após 3 lavagens em água destilada, preparou-se uma suspensão concentrada ( $f = 2,5x$ ) para a determinação da massa seca de biomassa. A massa seca foi determinada a partir da adição de uma alíquota (5 ml) da suspensão concentrada em cadinhos de porcelana previamente tarados e secos em estufa a 105 °C até obtenção de peso constante e assim, determinada a biomassa seca produzida.

## Resultados e Discussão

No processo de isolamento das leveduras, foram obtidas sete culturas isoladas, conforme ilustrado na Tabela 2, sendo quatro isoladas de amostras de solo, duas de amostras de água e uma de amostra de fruto de açaí. A partir das características apresentadas em testes macro/micromorfológicos e em testes bioquímicos, estas leveduras foram classificadas como pertencentes ao gênero *Rhodotorula*, e receberam uma nomenclatura provisória: Rh S1; Rh S2; Rh S3; Rh S4, para os isolados de amostras de solo; Rh RNA e Rh RNB, para os isolados de água do Rio Negro e Rh A1, para o isolado de fruto (Açaí).

Quanto as cascas de mandioca, estas foram obtidas a partir do processamento manual das raízes e apresentaram teor de amido de 71%. Na literatura são reportados teores de amido em cascas de mandioca que variam entre 47% para cascas obtidas a partir do processamento mecânico (Bayitse *et al.*, 2015) e 67% para o processamento manual (Marx e Nquma, 2013). Observa-se que no presente trabalho, o teor de amido obtido para as cascas de mandioca estão próximos aos relatados por Marx e Nquma (2013), que também obtiveram as cascas a partir do processamento manual, onde as cascas são completamente removidas da polpa, aumentando assim o teor de amido presente nesse material, diferentemente do descasque mecânico que remove a película marrom (fração não-amilácea) que envolve as cascas de mandioca.

Com relação a obtenção do hidrolisado de cascas de mandioca (HCM), nas condições de hidrólise ácida empregadas neste estudo, foi possível obter um licor com 48 g/L ( $\pm 0,6$ ) de glicose. Considerando que o teor de amido obtido na caracterização destas cascas foi de 71%, a eficiência de hidrólise relativa

**Tabela 2.** Ambiente de coleta e características morfológicas das colônias dos isolados.

Ambiente	Imagem dos isolados	Morfologia da colônia
Rh S1 Solo		Cor Rosa, Aspecto liso, circular, levemente brilhante, cremosa, forma convexa.
Rh S2 Solo		Cor laranja, Aspecto liso, circular, levemente brilhante, cremosa, forma convexa.
Rh S3 Solo		Cor rosa, Aspecto liso, circular, levemente brilhante, cremosa, forma convexa.
Rh S4 Solo		Cor laranja, Aspecto liso, circular, levemente brilhante, cremosa, forma convexa
Rh RNA Água		Cor laranja, Aspecto liso, circular, levemente brilhante, mucosa, forma convexa
Rh RNB Água		Cor rosa, Aspecto liso, circular, levemente brilhante, cremosa, forma convexa
Rh A1 Fruto (Açaí)		Cor laranja, Aspecto liso, circular, levemente brilhante, mucosa, forma convexa

a glicose foi de 67,4% ( $\pm 0,5$ ). Jasko *et al.* (2011), avaliando a hidrólise do bagaço de mandioca por via ácida (12% de sólidos, utilizando ácido sulfúrico 250 mM, 121 °C e 1 hora de reação), constataram uma baixa eficiência de hidrólise, 20%. Segundo os autores as fibras presentes no material foram as principais responsáveis pela baixa eficiência de hidrólise. Devido à escassez de dados na literatura referentes à obtenção de hidrolisados açucarados a partir de cascas de mandioca, os resultados obtidos no presente estudo, com 10% de sólidos, são considerados adequados para a posterior utilização em processo fermentativo, uma vez que foram obtidos aproximadamente 50g/L de glicose.

Quanto aos cultivos em HCM, foi possível observar crescimento para todas as leveduras selecionadas, com variação 10,67 à 13,96 em massa seca, conforme pode ser observado na Tabela 3, e que as biomassas obtidas apresentaram coloração característica de acumulação de pigmentos carotenoides.

Visto que todas as leveduras apresentaram crescimento, foi realizada uma análise de variância, a fim de identificar a significância entre os valores de biomassa obtidos. No entanto, como pode ser observado na Tabela 4, não houve diferença significativa ao nível de 95% de confiança, entre as biomassas obtidas, visto que o valor de *F crítico* foi quase três vezes superior ao valor de *F tabelado*.

Os resultados obtidos mostraram que o HCM, contem nutrientes essenciais ao crescimento das leveduras selecionadas como potenciais produtoras de carotenoides. No entanto, o critério de produção de biomassa não é suficiente para destacar a melhor produtora, sendo necessário ainda a quantificação dos carotenoides totais presentes em cada levedura. Sendo assim, etapas de extração e quantificação dos carotenoides estão previstas para trabalhos futuros.

**Tabela 3.** Concentração celular das leveduras selecionadas, após 96 horas de cultivo em HCM.

Levedura	Rh S1	Rh S2	Rh S3	Rh S4	Rh RNA	Rh RNB	Rh A1
Conc. celular (g/L)	13,2 $\pm$ 1,1	12,7 $\pm$ 0,1	11,78 $\pm$ 1,5	13,9 $\pm$ 1,2	11,6 $\pm$ 1,9	10,7 $\pm$ 2,4	13,5 $\pm$ 0,0

**Tabela 4.** Análise de variância para validação da significância as massas obtidas em cada cultivo.

Fonte da variação	SQ	Gl	MQ	F	valor-P*	F crítico
Entre grupos	16,85	6	2,81	1,39	0,34	3,87
Dentro dos grupos	14,17	7	2,02			
Total	31,02	13				

Para  $p \leq 0,05$

## Conclusões

O hidrolisado da casca de mandioca, nas condições de cultivo utilizadas, apresenta-se como um meio de cultivo favorável ao cultivo de leveduras pigmentadas, visto que todos os isolados foram capazes de crescer e acumular pigmento.

Considerando que não foi realizado nenhuma suplementação nutricional ao hidrolisado de cascas de mandioca, pode-se concluir que a utilização deste subproduto apresenta-se como uma fonte de carbono alternativa para o cultivo destas leveduras.

## Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, pelo apoio financeiro.

## Referências

- Amorim-Carrilho KT, Cepeda A, Gente C, Regal P 2014. Review of methods for analysis of carotenoids. *Trends in Analytical Chemistry*, 56:49–73.
- AOAC 2012. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC international. 19. ed. Maryland: AOAC.

- Banzatto D, Freita LA, Mutton MJR 2013. Carotenoid production by *Rhodotorula rubra* cultivated in sugarcane juice, molasses, and syrup. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 33(01):14–18.
- Bayitse R, Hou X, Bjerre AB, Saalia FK 2015. Optimisation of enzymatic hydrolysis of cassava peel to produce fermentable sugars. *AMB Express*, 5(60):1-7.
- Bhosale P, Grade R 2001 . Production of beta-caroteno by a *Rhodotorula glutinis* mutant in sea water medium. *Bioresource Technology*, 76:53–55.
- Downham A, Collins P 2000. Colouring our food in the last and next millennium. *International Journal of Food Science and Technology* 35:5.
- Ferreira MM, Zamith HPS, Abrantes S 2014. Astaxantina: seu uso como corante natural alimentício. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo, 73(1):1-8.
- IBGE 2017. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola Municipal, 2017. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1612>.
- Machado WRC, Burkert JFM 2014. Produção de carotenoides microbianos pela levedura *Sporidiobolus pararoseus* utilizando coprodutos. *Revista de Engenharia e Tecnologia*, 6(2):59–69.
- Marx S, Nquma TY 2013. Cassava as feedstock for ethanol production in South Africa. *African Journal of Biotechnology*, 12(31):4975-4983.
- Mesquita SS, Teixeira CMLL, Servulo EFC 2017. Carotenoides: Propriedades, Aplicações e Mercado. *Rev. Virtual Quim.*, 9(2):672-688.
- Mezzomo N, Ferreira SRS 2016. Carotenoids functionality, sources, and processing by supercritical technology: A review. *Journal of Chemistry*, 2016:1–16.
- Moreira FMS, Huising EJ, Bignell DE 2010. Manual de biologia dos solos tropicais. 1ª ed. Universidade Federal de Lavras, Lavras. Minas Gerais.
- Mulders KJM, Lamers PP, Martens DE, Wijffels RH 2014. Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities. *Journal of Phycology*, 50: 229.
- Palanichamy V, Hundet A, Mitra B, Reddy N 2011. Optimization of cultivation parameters for growth and pigment production by *Streptomyces* spp. solated from marine sediment and rhizosphere soil. *Int. Journal of Plant, Animal and Env. Sciences*, 1:3.
- Saha N, Samanta AK, Chaudhuri S, Dutta D 2015. Characterization and antioxidant potential of a carotenoid from a newly isolated yeast. *Food Science and Biotechnology*, 24(1):117–124.
- Valduga E, Tatsch PO, Tiggemann L, Treichel H, Toniazzo G, Zeni J, Di Luccio M, Fúrigo Júnior A 2009. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. *Química Nova*, 32(9):2429-2436.

## Avaliação da ação leishmanicida de *Fusarium solani* sobre promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania guyanensis*

Tarcila Araújo Alves<sup>1</sup>, Rêgila Mello Nascimento<sup>2</sup>, Lucas de Azevedo Rêgo<sup>3</sup>,  
João Vicente Braga de Souza<sup>4</sup>, Liliane Coelho da Rocha<sup>5</sup>,  
Flávia Regina Almeida Campos Naief Moreira<sup>6</sup>

<sup>1</sup> PG Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas

<sup>2</sup> G Ciências Biológicas, Universidade do Estado do Amazonas

<sup>3</sup> G Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas

<sup>4</sup> Pesquisador, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

<sup>5</sup> Pesquisador, Universidade do Estado do Amazonas

<sup>6</sup> Pesquisador, Universidade Federal do Amazonas

Emails: tarcilaaraujoalves@gmail.com, regilamn@gmail.com, lucas-rego.bio@outlook.com,  
joao.souza@inpa.gov.br, lcrocha@uea.edu.br, fracampos@yahoo.com.br.

### Resumo

A busca por novos tratamentos alternativos para a Leishmaniose Tegumentar Americana se mostra de extrema relevância. Desta forma, a bioprospecção de agentes com atividade anti-leishmania são necessários para a descoberta de novos fármacos mais eficientes e menos invasivos aos pacientes que os tratamentos atuais. Nesse contexto, objetivamos testar a atividade de extratos do fungo isolado do solo amazônico *Fusarium solani* contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania guyanensis*. O fungo isolado e liofilizado foi ressuscitado em meio RPMI para formação dos extratos e por fim filtrados antes de ser aplicado nas amostras em triplicata com os parasitos. O controle negativo foi composto de meio RPMI e o controle positivo de Glucantime®. A concentração do extrato de 750 µg/mL apresentou atividade contra *L. amazonensis*, pois mostrou um menor número de indivíduos vivos/mL que o controle negativo e maior porcentagem de indivíduos mortos que o controle positivo. Os extratos não mostraram efeito significativo contra *L. guyanensis* o que nos sugere que o extrato tem atividade espécie-dependente. Desse modo, é necessária a realização de novos ensaios para melhor compreensão dos mecanismos de ação dos extratos de *F. solani* contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* e análise contra amastigotas das duas espécies.

**Palavras-chave:** Ação anti-leishmania, bioprospecção, fungos de solo, tratamento, LTA.

### Introdução

A Leishmaniose é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das doenças tropicais negligenciadas de maior relevância, entrando para a lista de metas de erradicação até 2022 (OMS, 2017). A Leishmaniose é causada por parasitos do gênero *Leishmania*, e apresenta duas formas distintas morfofisiologicamente em seu desenvolvimento (Scott e Novais, 2016). Os vetores da leishmaniose no Novo Mundo são flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Rath, 2003). Ela se manifesta em dois tipos de infecção: como cutânea ou tegumentar e visceral (Silva, 2012). A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma das doenças infecto-parasitárias com maior disseminação no continente americano segundo a OMS (2017).

No Brasil, a LTA continua sendo uma doença comum à população de baixa renda que habita regiões periurbanas e urbanas (Dantas-Torres, 2006; Brasil, 2017). Os tratamentos utilizados atualmente no Brasil apresentam diversas controvérsias tanto em relação à aplicação quanto à eficiência (Oliveira *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2017). Deste modo, a busca por tratamentos alternativos para a LTA se mostra de extrema relevância.

A bioprospecção de agentes com atividade anti-leishmania, tanto leishmanicida quanto leishmaniostática, são importantes caminhos para a criação de novos fármacos mais eficientes e menos invasivos aos pacientes (Ponte-Sucre *et al.*, 2017). Levando em consideração a grande diversidade fúngica na região amazônica e a utilização destes em diversas áreas da biotecnologia, com ênfase em seu uso como antibióticos, a bioprospecção de fungos com atividade anti-leishmania deve ser incentivada (Abreu *et al.*, 2015).

O gênero *Fusarium* inclui numerosas espécies tóxicas capazes de colonizar os mais diversos ambientes (Zabka e Pavela, 2018; Munkvold, 2017). De acordo com Leslie e Summerell (2006), existem mais de 80 espécies fitopatogênicas de *Fusarium*. A fusariose é uma doença que afeta a casca das plantas adultas e interfere em diversos setores de produção agrícolas, como na do látex (Pizetta, 2017), na produção de orquídeas ornamentais (Srivastava *et al.*, 2017) e na de sementes do sorgo sacarino (*Sorghum bicolor*). A espécie *Fusarium solani* é reconhecidamente fitopatogênica (Al-Hatmi *et al.*, 2018). Porém, esta apresenta grande potencial farmacológico devido a seus metabólitos secundários. Por exemplo, a biossíntese de nanopartículas de prata (AgNP) por *Fusarium oxysporum* que induziram à morte de formas amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis in vitro* (Fanti *et al.*, 2018) e os compostos bioativos obtidos a partir do *F. solani* com atividades antimaláricas, anticancerígenas e antimicrobianas (Kumar *et al.*, 2017), potencial citotóxico e antimicrobiano (Ibrahim *et al.*, 2017). Desse modo, existe grande interesse biotecnológico de mais estudos sobre a função anti-leishmania de *F. solani*. Neste trabalho, temos como objetivo geral avaliar *in vitro* a ação anti-leishmania de substâncias produzidas pelo fungo *Fusarium solani* contra formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*.

## Material e métodos

O bioprocesso para produção dos antimicrobianos foi realizado em Erlenmeyers (150 mL) contendo 50 mL de Caldo Batata Dextrose. Esse meio foi inoculado com  $1 \times 10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup> do fungo *Fusarium solani* e incubados por 14 dias, sob agitação orbital (100 rpm) a 25°C. Após esse período, a biomassa foi separada por filtração, o filtrado foi esterilizado por microfiltração e submetido à liofilização. O concentrado obtido foi submetido à determinação da atividade anti-leishmania.

Foram utilizadas as cepas de referência *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *Leishmania guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147). Os parasitos foram cultivados em meio RPMI 1640 (Himedia) completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFBi) em estufa a 25°C para os bioensaios e criopreservação.

Para a avaliação do crescimento das formas promastigotas de *Leishmania* spp.,  $1 \times 10^6$  promastigotas.mL<sup>-1</sup> foram colocadas em meio de cultura RPMI completo e incubadas em estufa a 25°C +/- 1°C por dez dias. A cada 24 horas, foram retiradas alíquotas diluídas (1:1000) coradas com azul de Tripán para quantificação em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico em aumento de 400 X. A média aritmética das contagens foi utilizada para calcular o número de parasitos em 3 mL de cultura. Para os estudos, foram utilizadas as formas promastigotas de cultivo axênico na fase inicial logarítmica, na qual ocorrem as formas consideradas infectantes. As curvas foram construídas utilizando o software Excel®Microsoft. O terceiro dia de crescimento foi escolhido para a realização dos ensaios com as duas espécies de parasitos (Figura 1).

A atividade anti-leishmania do composto fúngico foi avaliada pela inibição do crescimento e mortalidade das formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. Antes de cada experimento, foi observado a motilidade flagelar e a morfologia. Para a realização do bioensaio as formas promastigotas foram centrifugadas e ajustadas para obtenção da concentração parasitária de  $1,5 \times 10^6$  células/mL.

O controle negativo foi constituído de meio RPMI completo e parasitos (106). O controle positivo utilizado foi Glucantime® na concentração de 30 µg/mL. As concentrações utilizadas para avaliação dos extratos filtrados foram de 750 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL e 125 µg/mL, respectivamente, em volume final de 60 µL por réplica.

A atividade das amostras foi avaliada pela inibição do crescimento e mortalidade de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis* após incubação na presença das mesmas no período de 72 horas, na temperatura de 25 oC em estufa. Foi efetuada a contagem nos períodos de 24, 48 e 72 horas de células vivas e mortas (utilizando o corante Azul de Tripán e avaliando a motilidade celular) em câmara de Neubauer em microscópio óptico, aumento de 400 vezes. As quantificações foram executadas em triplicatas da qual foi retirada a média e desvio padrão do número de parasitos vivos e mortos e a porcentagem de ambos de acordo com o dia. Os valores relativos ao número de mortos encontrados foram utilizados posteriormente

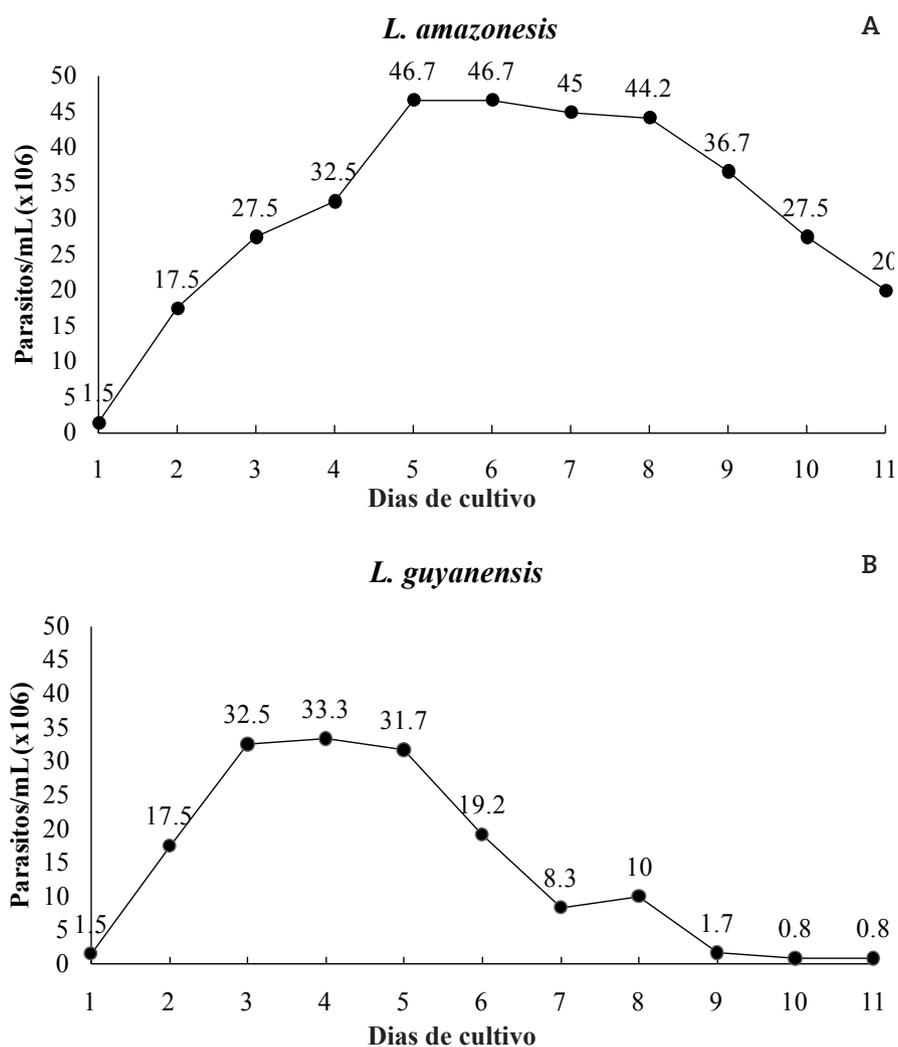


Figura 1. Curva de crescimento de *L. amazonensis* (A) e *L. guyanensis* (B) cultivados durante 10 dias.

para o cálculo da concentração inibitória de 50% (CI50) a partir do cálculo da reta obtido pelo gráfico de porcentagem de indivíduos mortos no programa Excel®Microsoft.

Para a determinação de atividade anti-leishmaniasis foi realizada estatística descritiva (média e desvio padrão entre réplicas) seguida de análise de variância pelo teste de ANOVA: dois critérios para dados paramétricos, sendo adotado o valor de  $p < 0.05$  quando houver diferença significativa entre as médias. Médias diferentes foram analisadas por meio de Teste de Tukey. Para análise de normalidade foi utilizado o teste de Lilifors, com grau de diferença significativa em  $p < 0.05$ . O cálculo de concentração inibitória 50% (CI50) foi realizado através do cálculo da reta do número de parasitos mortos. A Análise estatística foi realizada no programa Biostat 5.0™.

## Resultados e Discussão

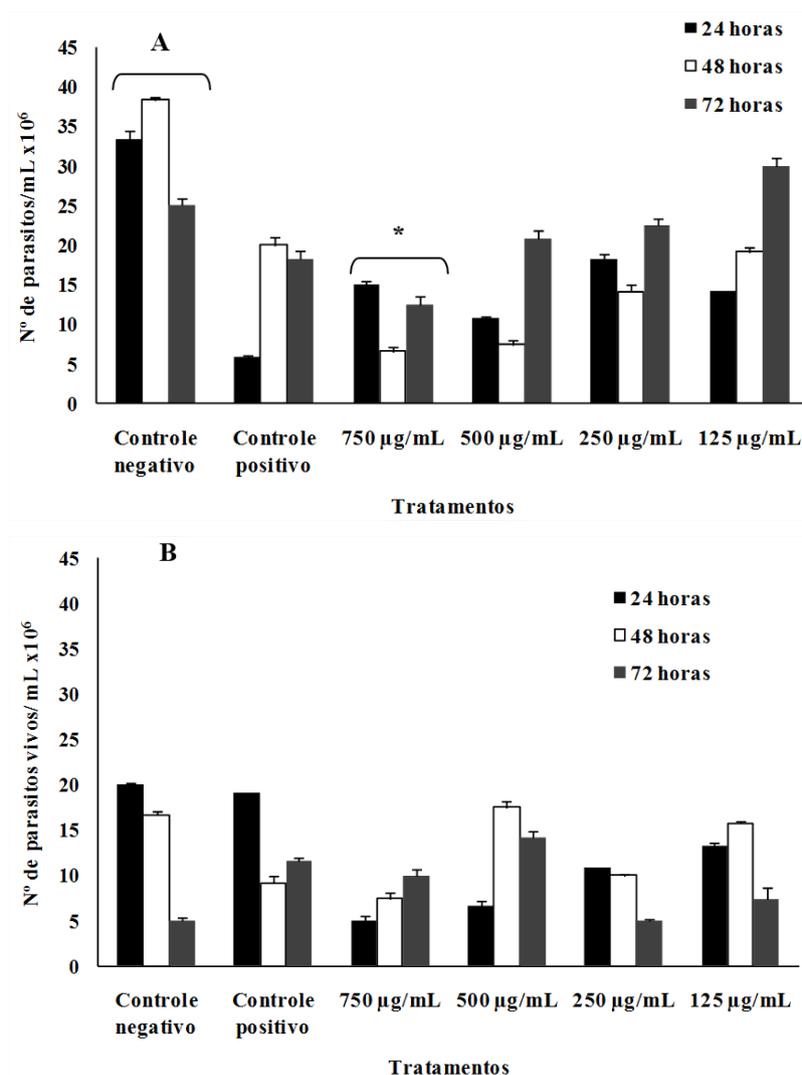
O extrato do filtrado liofilizado de *F. solani* foi efetivo contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* na concentração de 750  $\mu\text{g/mL}$ , como observado na Figura 2 – A, apresentando menor média de parasitas vivos por triplicata que o controle negativo tendo o nível de significância em  $p = 0.0367$  (ANOVA).

Ainda em relação à atividade citotóxica, foi observada efetividade na concentração de 750  $\mu\text{g/mL}$  do extrato filtrado de *F. solani* pelo percentual de 59,7% de parasitos mortos em *L. amazonensis* em relação

aos 46,4% e 44,8 % mortos por Glucantime, respectivamente. A concentração de Glucantime utilizada é a mesma presente em ampolas comerciais utilizadas para o tratamento de LTA. A concentração necessária para atingir o CI50 em *L. amazonensis* foi de 730,2 µg/mL.

Em *L. guyanensis*, no entanto, não foi verificada diferença quanto ao número de parasitos vivos em nenhuma concentração quando comparada ao controle negativo e controle positivo,  $p = 0.5314$  (ANOVA). Desse modo foi constatado que não há atividade leishmanicida nos extratos de *F. solani* para esta espécie, mostrando que o efeito é espécie-dependente (Figura 2-B). Em ambas as espécies não houve diferença significativa no número de parasitos vivos entre os dias de cultivo.

Existem poucos trabalhos descritos em literatura sobre a espécie *L. guyanensis*, mesmo que esta seja uma das maiores causadoras de LTA na Amazônia (Benicio *et al.*, 2011). Contudo, vemos em literatura a alta resistência de *L. guyanensis* aos tratamentos disponíveis. Esta resistência está associada a diversos fatores, principalmente a sua associação a vírus, como o vírus de RNA leishmânico (Ives *et al.*, 2013; Bourreau *et al.*, 2103). Além disso, a resistência quanto às drogas de primeira escolha pode ser associada aos tipos de reprodução realizada pelos parasitas que segundo a simulação realizada por Rougeron *et al.* (2011) pode ser endogâmica e sexuada, sugerindo uma resposta adaptativa do protozoário ao tratamento.



**Figura 2.** Número de parasitos de *L. amazonensis* (A) e *L. guyanensis* (B) tratados com diferentes concentrações de extrato filtrado de *Fusarium solani*. No gráfico, asterisco denota diferença significativa ( $p < 0.05$ , teste de Tukey) entre médias de diferentes tratamentos e o controle negativo durante as 72 horas.

A ação de *F. solani* em promastigotas de *L. amazonensis* é corroborado pelo resultado de Fanti *et al.* (2018), onde o *F. oxysporum*, também apresentou atividade contra essa espécie de *Leishmania*. Neste estudo, a atividade deu-se em função das partículas de prata biogênicas produzidas por *F. oxysporum*.

As concentrações utilizadas no presente estudo foram mais altas devido a menor pureza do extrato em relação à substância pura como descrito por Fanti *et al.* (2018). Contudo, ainda foi verificada maior atividade anti-leishmania do que a realizada pelo isotionato de metilglutamina em dose comercial, ou seja, sua efetividade em formas promastigotas é mais alta que a vista na droga de primeira escolha.

## Conclusões

O extrato filtrado do caldo liofilizado de *F. solani* apresenta atividade leishmanicida espécie-dependente. Este apresentou ação citotóxica somente na espécie *L. amazonensis* em contraposição à *L. guyanensis*.

A concentração inibitória de 50% contra *L. amazonensis*, foi de 730,2 µg/mL. Apesar das diferentes respostas entre as espécies de parasito para a forma promastigotas, sugere-se a realização de teste com a forma amastigotas das duas espécies.

Outros testes também devem ser realizados para melhor entendimento do mecanismo de ação dos extratos filtrados nas formas promastigotas de *L. amazonensis*.

## Referências

- Abreu JAS, Rovida AFS, Pamphile JA 2015. Fungos de Interesse: Aplicações Biotecnológicas. *Revista UNINGÁ Review*, 21(1):55-59.
- Al-Hatmi AMS, Ahmed S A, Van Diepeningen AD, Drogari-Apiranthitou M, Verweij PE, Meis JF, de Hoog GS 2018. *Fusarium metavorans* sp. nov.: The frequent opportunist 'FSSC6'. *Medical Mycology*, 56(1): 144-152.
- Almeida-Campos FR, Castro-Gomes T, Machado-Silva A, Oliveira JS, Santoro MM, Frézard, Horta MF 2013. Activation of *Leishmania* spp. leishporin: evidence that dissociation of an inhibitor not only improves its lipid-binding efficiency but also endows it with the ability to form pores. *Parasitology Research*, 112(9):3305-3314.
- Benicio EA, Gadelha EPN, Talhari A, Silva Jr RM, Ferreira LC, Santos MCC, Mira MT., Oliveira CMC, Talhari C, Talhari S, Machado PR, Schriefer A 2011. Combining diagnostic procedures for the management of leishmaniasis in areas with high prevalence of *Leishmania guyanensis*. *An. Bras. Dermatol.*, 86(6):1141-1144.
- Bourreau E, Ginouves M, Prévot G, Hartley M, Gangneux J, Robert-Gangneux F, Dufour J, Sainte-Marie D, Bertolotti A, Pratlong F, Martin R, Schütz F, Couppié P, Fasel N, Ronet C 2016. Presence of *Leishmania* RNA Virus 1 in *Leishmania guyanensis* increases the risk of first-line treatment failure and symptomatic relapse. *The Journal of Infectious Diseases*, 213(1):105-111.
- BRASIL, Ministério da Saúde. 2017. *Manual de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana/ Organização: gerência técnica de doenças transmitidas por vetores e antrozooses*. - Coordenação de vigilância epidemiológica - Centro Nacional de Epidemiologia - Fundação Nacional de Saúde - Ministério da Saúde. Brasília, 62 p.
- Castro MM, Cossio A, Velasco C, Osorio L 2017. Risk factors for therapeutic failure to meglumine antimoniate and miltefosine in adults and children with cutaneous leishmaniasis in Colombia: A cohort study. *PLoS Negl Trop Dis*, 11(4):0005515.
- Dantas-Torres F 2006. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. *Revista de Saúde Pública*, 40(3):537-541.
- Fanti JR, Tomiotto-Pellissier F, Miranda-Sapla MM, Cataneo AHDC, Andrade CGTJ, Panis C, Rodrigues JHS, Wovk PF., Kuczera D., Costa IN, Nakamura C V, Nakazato G, Durán N, Pavanelli WR, Conchon-Costa I 2018. Biogenic silver nanoparticles inducing *Leishmania amazonensis* promastigote and amastigote death in vitro. *Acta Tropica*, 178: 46-54.
- Ibrahim, SRM 2018 *Fusaruthioamide B*, a new benzamide derivative from the endophytic fungus *Fusarium chlamydosporium* with potent cytotoxic and antimicrobial activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(3):786-790.
- Ives A, Slavica M, Castiglioni P, Prével F, Revaz-Breton M, Hartley M, Launois P, Fasel N, Ronet C 2014. MyD88 and TLR9 dependent immune responses mediate resistance to *Leishmania guyanensis* infections, irrespective of *Leishmania* RNA virus burden. *PLoS ONE*, 9(5):96766.

- Kumar, KP, Javvaji K, Poornachandra Y, Allanki AD, Misra S 2017. Antimicrobial, anti-plasmodial and cytotoxicity properties of bioactive compounds from *Fusarium* sp. USNPF102. *Journal of Microbiology Research*, 7(2):23-30.
- Lainson R, Shaw J 1987. Evolution, classification and geographical distribution. *The Leishmaniasis in Biology and Epidemiology*, W. Peters, R. Killick Kendrick (Eds.), *Academic Press*, London, pp. 1-120
- Lamotte S, Spaéth GF, Rachidi N, Prina E 2017. The enemy within: Targeting host-parasite interaction for antileishmanial drug discovery. *PLoS Negl Trop Dis*, 11(6): e0005480.
- Leslie JF, Summerell BA. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. *Blackwell Willey*, USA, 388 p.
- Müller J 2017. *Qualidade fisiológica e associação de Fusarium spp. a sementes de sorgo sacarino*. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. (Tese. Universidade Federal de Santa Maria, UFSM). 97 p.
- Munkvold GP 2017. *Fusarium* species and their associated mycotoxins. *Methods Mol. Biol.*, 1542:51-106.
- Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira RV, Marzochi MC, Andrade A 2011. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Tropica*, 118(2):87-96.
- OMS. Organização Mundial de Saúde 2017. Essential leishmaniasis maps. Disponível em: <[http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis\\_maps/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html)> Acesso em: 09 dez. 2017.
- Pizetta M 2017. *Caracterização de Fusarium decemcellulare, F. oxysporum e F. incarnatum em seringueira no estado de São Paulo, resistência clonal e sensibilidade a fungicidas*. Botucatu, São Paulo, Brasil. (M.sc. Dissertação. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP). 33p.
- Ponte-Sucre A, Gamarro F, Jean-Claude Dujardin JC, Barrett MP, López-Vélez R, García-Hernández R, Pountain AW, Mwenechanya R, Papadopoulou B 2017. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis*, 11(12): e0006052.
- Rath S, Trivelin LA, Imbrunite TR, Tomazela DM, Jesús MN, Marzal PC, Andrade Junior HF, Tempone AG 2003. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Quím. Nova*, São Paulo, 26(4): 550-555.
- Saravia NG, Valderrama L, Labrada M, Holguín AF, Navas C, Palma G, Weigle KA. 1989. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, 159(4):725-735.
- Scott P, Novais FO 2016. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nature springer*, 16:581-592.
- Srivastava S, Kadooka C, Uchida JY 2017. *Fusarium* species as pathogen on orchids. *Microbiological Research*, 207:188-195.
- Zabka M, Pavela R 2018. Review Chapter: *Fusarium* genus and essential oils. In: Mérillon JM, Riviere C. (eds) *Natural Antimicrobial Agents. Sustainable Development and Biodiversity. Springer cham*, 19(1):95-120.

## Análise bacteriológica de mãos e unhas de estagiários em uma clínica veterinária em Manaus, AM

Ana Sílvia Araújo Aparício<sup>1</sup>, Raquel Silva Lisbôa<sup>2</sup>, Fábio Silva de Souza<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Profissional autônoma, Manaus, Amazonas

<sup>2</sup> Agência de Defesa Agropecuária do Estado de Roraima

<sup>3</sup> Docente do Centro Universitário Estácio da Amazônia, Boa Vista, Roraima

Emails: anasilvia19@gmail.com, raquel.silvalisboa@gmail.com, mvfabiosouza@gmail.com

### Resumo

A microbiota transitória, que coloniza a camada superior da pele, é de mais fácil remoção pela lavagem das mãos e é frequentemente adquirida pelo contato com doentes ou com superfícies contaminadas daí a importância da higienização das mãos na prevenção da transmissão das infecções hospitalares por contato direto ou indireto com pacientes. O trabalho objetivou identificar a presença de bactérias nas mãos e unhas de estagiários de uma clínica veterinária na cidade de Manaus, Amazonas. A amostra foi obtida de 28 alunos estagiários de uma clínica veterinária, sendo 18 estagiários do setor clínico e 10 do setor do laboratório, com idades entre 19 e 38 anos e cursando do 2º ao 10º período de medicina veterinária. Verificou-se que a maior frequência entre os setores da clínica e do laboratório foi de estafilococos Gram-positivos e uma menor quantidade de bacilos Gram-negativos presentes em coletas de amostras dos dois setores. Com a realização deste estudo constatou-se uma necessidade em promover a adesão à higiene das mãos e alertar para a necessidade de programas de informação atualizados, de modo a motivar e sensibilizar os alunos em relação à problemática da má/não higiene das mãos em serviços de saúde de assistência a animais.

**Palavras-chave:** Atendimento, Bactéria, Higiene, Laboratório.

### Introdução

O crescimento de microrganismos pode ser afetado tanto por interações populacionais entre outros microrganismos que compõem o corpo humano ou também por fatores físicos e químicos do ambiente (Rosa e Araújo, 2012). No entanto para Schaechter *et al.* (2002) a microbiota normal embora não cause zoonose e, em alguns casos, até promova benefícios, pode tornar indivíduos doentes ou infectar pessoas próximas.

Price (1938) estabeleceu que a microbiota presente nas mãos pode ser dividida em duas categorias: residente e transitória. A microbiota residente é composta de microrganismos que residem em células superficiais, que se multiplicam e se mantêm em equilíbrio com as defesas do hospedeiro sendo por isso mais resistente à remoção com água e sabão. Já a microbiota transitória, coloniza as camadas superficiais da pele, provenientes de fontes externas, sobrevivendo esporadicamente, podendo se multiplicar e colonizar temporariamente os estratos mais superficiais. As mãos dos profissionais de saúde podem se tornar persistentemente colonizadas por microbiota patogênica como *Staphylococcus aureus*, bacilos Gram-negativos ou leveduras em áreas críticas como unidades com pacientes imunocomprometidos, pacientes cirúrgicos e unidades de cuidados intensivos, que podem ter um papel crucial nas infecções associadas aos cuidados de saúde (WHO, 2009).

É importante salientar que, segundo Santos e Gonçalves (2009), um dos principais meios de veiculação de doenças causadas por bactérias, ocorre por meio das mãos. Por esta razão, a lavagem das mãos é uma ação simples e importante na prevenção de infecções que possam acometer humanos e animais. A higienização das mãos vem sendo reconhecida e recomendada, desde 1846, como prática obrigatória para os profissionais da área da saúde, com base na constatação de sua efetividade na redução das infecções e, conseqüentemente, de mortalidade entre os pacientes (Oliveira e Paula, 2011).

Logo, a importância da higienização das mãos na prevenção da transmissão das infecções hospitalares é baseada na capacidade da pele de abrigar microrganismos e transferi-los de uma superfície para a

outra, por contato direto, pele com pele, ou indireto, por meio de objetos (Santos, 2002). Segundo Mattos *et al.* (1996), a lavagem das mãos quebra a cadeia epidemiológica no elo chamado veículo de transmissão uma vez que elimina e reduz substancialmente a quantidade de microrganismos recolhidos em outros locais e que seriam transportados por meio do contato direto entre pessoas ou indireto por meio de objetos.

Para Santos (2002), a água e o sabão são considerados como maneira simples de higienização das mãos, há também outros produtos antissépticos chamados de soluções de base alcoólica, que diminuem o risco de transmissão microbiana favorecendo a higienização dos profissionais de saúde em ambientes em que utilizam as mãos.

A higiene das mãos pode ser feita por diferentes produtos e técnicas, dependendo apenas do objetivo a qual se destina esta medida individual e simples, menos dispendiosa e mais efetiva na redução das infecções associadas aos cuidados de saúde, contribuindo de igual modo para a redução da morbidade e mortalidade (Brasil, 2010).

Entretanto, vale observar que, com o aumento de novas formas e tipos de microrganismos, a preocupação com infecções em locais de assistência à saúde se tornou um dos principais problemas de saúde pública. Pois estas infecções são impactantes causando um aumento da resistência dos microrganismos a antimicrobianos. No entanto, verifica-se que as mãos dos profissionais da área da saúde servem como veículo de infecções cruzadas no ambiente hospitalar e demais locais de assistência à saúde (Brasil, 2010). Portanto, o estudo teve o objetivo de identificar a presença de bactérias nas mãos e unhas de estagiários de uma clínica veterinária na cidade de Manaus, Amazonas.

## Material e Métodos

Esta pesquisa consistiu em um estudo observacional descritivo do tipo transversal, realizado em uma clínica veterinária situada na cidade de Manaus, AM com preenchimento do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) por parte de todos os participantes.

A amostra foi composta por coleta de material oriundo de 28 estagiários da clínica veterinária, sendo 18 estagiários do setor de Clínica Médica e 10 do setor do Laboratório, nove do sexo masculino e 19 do sexo feminino, com idades entre 19 e 38 anos e cursando do segundo ao décimo períodos de graduação em medicina veterinária.

Na coleta do material foi utilizado swab estéril, de forma angular, passando com movimentos giratórios, da parte inferior da palma até a extremidade de cada dedo. Os movimentos na palma da mão foram do tipo vai-e-vem, de modo a avançar em um dos lados das mãos até onde se iniciam as linhas dos punhos, passando depois entre os dedos e no final embaixo das unhas segundo metodologia de Rosa e Araújo (2012) (Figura 1). As coletas foram realizadas ao final do expediente por volta das 17h. Para cada aluno foram realizadas duas coletas: a primeira sem assepsia das mãos e a segunda após assepsia com escovinha, água e sabão, e posteriormente passagem do álcool 70%, segundo metodologia recomendada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2010). O material de cada coleta foi armazenado em tubos de ensaio rosqueáveis contendo 2mL de água peptonada a 0,1% esterilizada.



**Figura 1.** Coleta do material das mãos e unhas. Em (A) coleta de forma angular, passando com movimentos giratórios, da parte inferior da palma de modo a avançar em um dos lados das mãos até onde se iniciam as linhas dos punhos; (B) passagem do swab entre os dedos; (C) movimentos de vai e vem nas bordas das unhas e passando por último em baixo das unhas.

Logo após as coletas, as amostras armazenadas nos tubos de ensaio foram transportadas, dentro de uma caixa de isopor sem gelo, para um laboratório de análises clínicas veterinário. Dentro de uma capela de fluxo laminar (Esco - Optmair -Laminar flow Cabinet) as amostras de cada estagiário foram semeadas por método de estria em uma placa de Petri com duas divisórias contendo o meio ágar Lúria Bertani (LB), em um dos lados foi semeada amostra de material das mãos e unhas sem assepsia e no outro lado da placa amostra de material após assepsia. Feito este procedimento, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica (ECB 1.2 digital - Odontobrás) a 37 °C por 24 horas para o cultivo bacteriano.

Após 24 horas de incubação, as placas de Petri foram retiradas da estufa e levadas a capela de fluxo laminar para preparação dos esfregaços. As lâminas foram identificadas de acordo com cada coleta realizada com e sem assepsia das mãos, mantendo uma ordem de data e setor do estágio. Para cada lâmina foi colocada uma gota de solução salina fisiológica, e com o auxílio da alça bacteriológica devidamente esterilizada coletou-se uma pequena amostra da colônia. Com movimentos de rotação por meio da alça bacteriológica, o material coletado foi esfregado de forma oval para se obter um esfregaço, bem fino e uniforme, após esse procedimento houve a fixação das lâminas no bico Bunsen passando a lâmina do lado oposto ao esfregaço três vezes na chama rapidamente.

Para a visualização da morfologia bacteriana e diferenciação de bactérias Gram-negativas e positivas, foi realizada a técnica de coloração de Gram (Gram, 1884).

## Resultados e Discussão

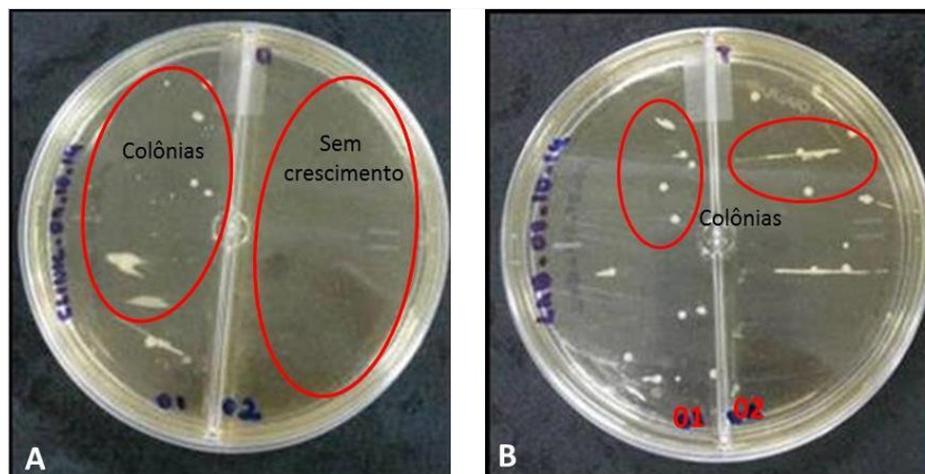
Foram coletadas 28 amostras sem assepsia e 28 amostras após a assepsia das mãos e unhas de estagiários de uma clínica veterinária na cidade de Manaus, AM.

Após as coletas e processamento de todas as amostras e processamento, houve isolamento e crescimento de colônias bacterianas em todas as amostras dos estagiários antes da realização da assepsia. As características morfológicas macroscópicas que as colônias apresentaram foram arredondadas e de coloração branca. Supõe-se que as colônias observadas seriam de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. pois, de acordo com Koneman (2012), as colônias de bactérias deste gênero apresentam-se macroscopicamente com morfologia de aspecto liso, butiráceas e exibem um perfil convexo baixo, com borda contínua e variação de tamanho das colônias na mesma placa de cultura, dando aparência de uma cultura mista. Podendo também demonstrar variações de pigmentação esbranquiçadas, amarelas e laranjadas num período de incubação maior em temperatura ambiente de dois a três dias.

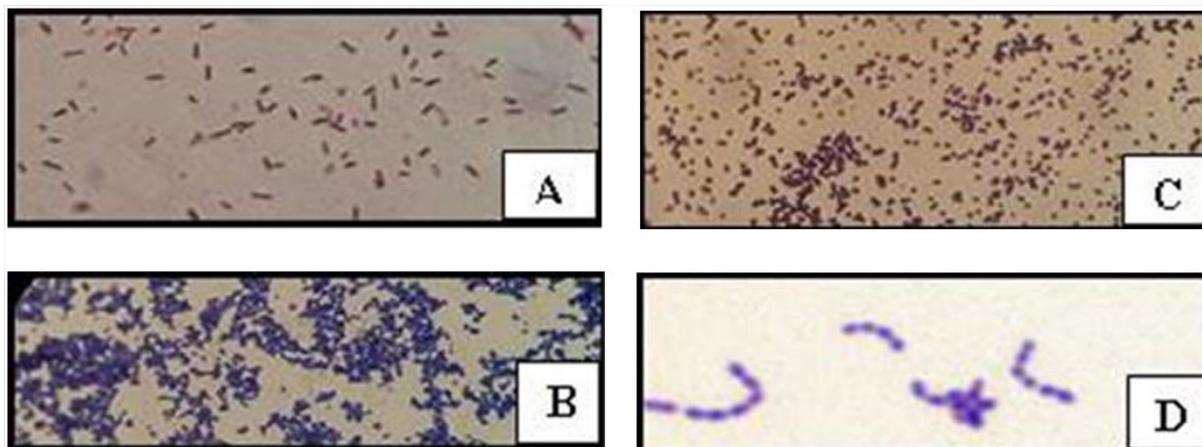
Foi possível visualizar a diferença de quantidade de colônias entre amostras de mãos e unhas sem assepsia e com assepsia, houve uma diminuição da quantidade de colônias em 83,3% (15/18) das placas do setor clínica e em 16,7% (3/18) das placas não houve nenhum crescimento. Nas amostras do setor do laboratório 90% (9/10) das placas apresentaram diminuição da quantidade de colônias e em 10% (1/10) não houve nenhum crescimento (Figura 2). A higienização simples com água e sabão possui como função remover a microbiota transitória que coloniza as camadas superficiais da pele, assim como o suor, a oleosidade e as células mortas, retirando a sujidade propícia à permanência e à proliferação de microrganismos (Brasil, 2010). Porém, esta diminuição só ocorreu após a realização da assepsia das mãos, segundo a metodologia descrita pela Anvisa (Brasil, 2010), a qual especifica que o uso de substâncias com base alcoólica associada à fricção das mãos possui como finalidade a redução da carga microbiana.

Na coloração de Gram foi observada a morfologia isolada de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Na Figura 3, visualizam-se as formas de bactérias encontradas, sendo: estafilococos, estreptococos, diplococos e bacilos. Verificou-se que a maior frequência entre os setores da clínica e do laboratório foi de estafilococos Gram-positivos e foi detectada uma menor quantidade de bacilos Gram-negativos presentes nas coletas de amostras dos dois setores (Tabela 1 e 2).

Foi visualizada nas placas uma quantidade maior de colônias nas amostras de mãos e unhas dos estagiários do laboratório antes da assepsia e ocorreu uma menor diminuição nesta quantidade após a assepsia. Foi observado que estes estagiários realizaram todo procedimento, porém, não tiveram paciência



**Figura 2.** Colônias bacterianas de coloração branca em Meio Ágar Luria-Bertani. (A) amostras oriundas de estagiários de uma clínica veterinária na cidade de Manaus, AM, (01) crescimento bacteriano de amostras coletadas de mão e unha antes da assepsia, (02) ausência de crescimento bacteriano após assepsia das mãos, (B) crescimento bacteriano de amostras coletadas de estagiário do setor de laboratório tanto com assepsia prévia das mãos (01) quanto após assepsia das mãos (02).



**Figura 3.** Características microscópica das bactérias coletadas de mãos e unhas de estagiários de uma clínica veterinária na cidade de Manaus, AM. Em (A) bacilos Gram-negativos; (B) estafilococos Gram-positivos; (C) diplococos Gram-positivos; (D) estreptococos Gram-positivos.

para esperar o tempo adequado da técnica, provavelmente este foi o motivo de ter ocorrido uma menor redução na quantidade de colônias após a assepsia. Segundo Pittet (2003), a contagem total de bactérias nas mãos de profissionais de saúde pode oscilar de pessoa para pessoa, pois, o nível de contaminação nas mãos reflete o tipo e a intensidade do contato que o profissional da saúde tem com o paciente, como atividades que envolvam o contato direto com a pele e mucosas, tais como manipulação de instrumentos que possam auxiliar na hora do atendimento ao paciente e coletas de secreções para análises laboratoriais. No entanto, para esta investigação, foi avaliada a presença de microrganismos durante o exercício da atividade acadêmica, observando-se uma contagem alta de bactérias nas mãos dos estagiários da clínica veterinária devido ao fato de manter maior contato com o animal no consultório.

Na visão de Bjerke (2004), as mãos de profissionais de saúde são a principal via de transmissão cruzada de infecções hospitalares, tornando-se contaminadas no cuidado de pacientes infectados que possam ser colonizados durante o contato com fômites, equipamentos ou superfícies contaminadas, caso não

**Tabela 1.** Quantidade de colônias de bactérias isoladas das mãos sem assepsia e após assepsia de estagiários de uma clínica veterinária na cidade de Manaus, AM.

Estagiários	Sem Assepsia (Qtd. colônias)	Com Assepsia (Qtd. colônias)	Gram*	Morfologia Bacteriana
1	500	26	+	estafilococos
2	156	80	+	estafilococos
3	289	20	+	estafilococos
4	50	10	+	diplococos
5	96	46	-	bacilos
6	160	74	+	estreptococos
7	19	2	-	bacilos
8	82	1	+	estreptococos
9	50	10	+	estafilococos
10	47	5	-	bacilos
11	178	4	+	diplococos
12	109	7	+	diplococos
13	20	-	+	estafilococos
14	121	29	-	bacilos
15	48	2	+	estreptococos
16	64	-	+	estafilococos
17	122	-	+	diplococos
18	17	3	+	estreptococos
MÉDIA	118,22	21,26		

\*Gram-positivo (+); Gram-negativo (-)

**Tabela 2.** Quantidade de colônias de bactérias isoladas de amostras das mãos sem assepsia e após assepsia de estagiários de uma clínica veterinária na cidade de Manaus, AM.

Estagiário	Sem Assepsia (Qtd. colônias)	Com Assepsia (Qtd. colônias)	Gram*	Morfologia Bacteriana
1	70	20	+	diplococos
2	106	9	+	estafilococos
3	500	85	+	estafilococos
4	180	66	+	estreptococos
5	200	92	+	estafilococos
6	15	3	-	bacilo
7	24	9	+	estafilococos
8	32	-	+	estafilococos
9	53	10	+	estafilococos
10	42	5	+	estafilococos
MÉDIA	122,2	33,22		

\*Gram-positivo (+); Gram-negativo (-)

seja realizada uma higienização adequada. De acordo com Kluytmans *et al.* (1997) e Santos (2000), estas bactérias presentes nas mãos podem ser encontradas como colonizadores da microbiota normal da pele e mucosas de seres humanos, principalmente naqueles que atuam como profissionais de saúde. Um estudo realizado com profissionais de saúde estimou que as mãos de 20% a 30% desses profissionais estejam colonizadas por essas bactérias apontando estas como importantes fontes de infecção para indivíduos susceptíveis (Geubbels *et al.*, 2000).

Nesta pesquisa observou-se que estes microrganismos podem ser encontrados nas mãos devido à falta de uma correta higienização, podendo ser transmitidos diretamente para sítios sistêmicos do paciente onde colonizaria e desenvolveria a infecção. De acordo com Sánchez *et al.* (2007), a higienização das

mãos é a medida mais importante para prevenir as infecções associadas aos cuidados de saúde. As recomendações para sua adequada realização têm sido um dos pontos básicos dos programas de prevenção e controle de infecções. No entanto, a lavagem de mãos é o procedimento mais importante e menos dispendioso para evitar a transmissão de infecções hospitalares. A média de oportunidades para a lavagem das mãos varia entre as diversas unidades de um local de assistência à saúde, mas em geral a aquisição de patógenos é reduzida quando a higienização das mãos é realizada frequentemente. Com a realização deste estudo constatou-se uma necessidade em promover a adesão à higiene das mãos, alertar para a necessidade de programas de formação atualizados, de modo a motivar e sensibilizar os alunos em relação à problemática da não higiene das mãos em serviços de saúde de assistência a animais.

## Conclusão

Foram isoladas com maior frequência colônias com características morfológicas do gênero *Staphylococcus* spp. Gram-positivo e visualizada uma quantidade maior de colônias nas amostras oriundas de mãos e unhas de estagiários do laboratório antes e após a realização de assepsia.

## Referências

- Bjerke NB 2004. The evolution: hand washing to hand hygiene guidance. *Critical Care Nursing Quarterly*, 27(3):295-307.
- ANVISA- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2010. *Segurança do paciente em serviços de saúde: limpeza e desinfecção de superfícies/Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. – Brasília: Anvisa, 116p.
- Geubbels EL, Mintjes-de Groot AJ, Van Den Berg JM, De Boer AS 2000. An operating surveillance system of surgical-site infections in the Netherlands: results of the PREZIES national surveillance network. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 21(5):8-311.
- Gram C 1884. Ueber die isolirte Farbung der Schizomyceten in Schnitt-und Trockenpreparaten. *Fortschritte der Medicin*, 2:185-189.
- Koneman EW 2012. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1565p.
- Kluytmans A, Van BA, Verbrugh H 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms and associated risks. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(3):20-505.
- Mattos E, Almeida F, Pinto R 1996. A importância da lavagem das mãos na prevenção nosocomial. *Nursing*, 98:8-13.
- Oliveira AC, Paula AO 2011. Monitoração da adesão à higienização das mãos: uma revisão de literatura. *Acta Paulista de Enfermagem*, 24(3):13-407.
- Pittet D 2003. Prevention and control of nosocomial infections. Philadelphia: Lippicott Williams & Wilkins, 32:35-524.
- Price PB 1938. The bacteriology of normal skin: a new quantitative test applied to a study of the bacterial flora and the disinfectant action of mechanical cleansing. *Journal of Infectious Diseases*, 63:301-318.
- Rosa GV, Araújo CB 2012. Identificação de microrganismos nas mãos e unhas de crianças de uma escola pública de Patos de Minas–MG. *Revista Mineira de Ciência da Saúde*, 1(4):88-98.
- Santos BMO 2000. Monitoramento da colonização pelo *Staphylococcus aureus* em alunos de um curso de auxiliar de enfermagem durante a formação profissional. *Revista Latino Americana Enfermagem*, 8(1):67-73.
- Santos DA 2002. Higienização das mãos no controle das infecções em serviços de saúde. *Revista de Administração em Saúde*, 4(15):10-4.
- Santos FM, Gonçalves VMS 2009. Lavagem das mãos no controle da infecção hospitalar: um estudo sobre a execução da técnica. *Revista Enfermagem Integrada*, 2(1):63-15.
- Sánchez PJ, Fuster PM, García GC, García RM, García SP, San Juan QA 2007. Evaluación de un programa de actualización de las recomendaciones sobre la higiene de manos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 30(3):52-343.
- Schaechter M, Engleberg NC, Eisenstein BI, Medoff G 2002. *Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 642 p.
- World Health Organization 2009. *The WHO Guidelines on hand hygiene in health care (First Global Patient Safety Challenge Clean Care is Safer Care)*. Disponível em: < [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241597906\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241597906_eng.pdf) > . Acesso em: 19 ago. 2014.

## Doença pulmonar fúngica associada a outras pneumopatias nos pacientes atendidos em hospital terciário de Manaus

João Celestino Cavalcante Filho<sup>1</sup>, Arteiro Queiroz Menezes<sup>2</sup>, Suanni Lemos de Andrade<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Acadêmico de Medicina da Universidade do Estado do Amazonas

<sup>2</sup> Professor Adjunto da Universidade do Estado do Amazonas

E-mail: joaofilho.med@gmail.com, arteiromenezes@uol.com.br, suannilemos@gmail.com

### Resumo

A coexistência entre patógenos fúngicos e doenças pulmonares é uma condição clínica de grande espectro. Dentro desse cenário a *Candida albicans* insere-se como potencialmente patogênico. Esse estudo observacional, descritivo e transversal visou analisar a presença de infecção pulmonar fúngica associada a pneumopatologias. Utilizou-se amostras clínicas pulmonares de pacientes com suspeita de doença respiratória na Fundação Hospital Adriano Jorge no período de janeiro a agosto de 2017. As amostras foram semeadas em meio ágar Sabouraud e mantidas à temperatura de 37°C. Após o crescimento, foi realizada a purificação, isolamento e identificação dos fungos patogênicos. Ao todo foram coletadas quatorze amostras clínicas, oito obtiveram crescimento fúngico satisfatório e foram selecionadas para um estudo dos dados clínicos e epidemiológicos. Utilizou-se meio específico Chromagar *Candida*, análise da micromorfologia e o teste do tubo germinativo para identificação das colônias leveduriformes obtidas das amostras selecionadas, obtendo-se como resultado a identificação de *C. albicans* em 50% das amostras. *C. albicans* e *Candida sp.* (não *albicans*) foram as espécies prevalentes nesta pesquisa. Por haver risco de disseminação, esse estudo se torna importante para obter melhores desfechos permitindo um tratamento mais adequado ao paciente e melhor qualidade de vida.

**Palavras-chave:** Infecção, Fúngica e Doença pulmonar.

### Introdução

As leveduras estão fisiologicamente presentes na flora da mucosa oral e do intestino dos adultos, porém podem causar infecções graves principalmente em pacientes imunossuprimidos (Lindau *et al.*, 2015). A coexistência entre patógenos fúngicos e doenças pulmonares como a tuberculose é uma condição clínica que, na maioria das vezes, ocorre em imunossuprimidos, porém, pacientes imunocompetentes também podem desenvolver essa condição (Fontalvo, 2016).

Para Kali *et al.* (2013), a *Candida albicans* surge como um fungo potencialmente patogênico em pacientes com doenças broncopulmonares. Atualmente, devido ao crescente uso de antibióticos de amplo espectro e do uso de drogas imunossupressoras a candidíase respiratória secundária a tuberculose tem ganhado maior relevância.

Conforme Peixoto *et al.* (2014), a candidíase, patologia causada por leveduras do gênero *Candida*, pode resultar em uma ampla variedade de síndromes clínicas. Segundo Montero *et al.* (2013) e Shweihat e Perry (2015), por não haver apresentação clínica ou radiológica específica o diagnóstico da candidíase pulmonar torna-se difícil, porém, a presença de *Candida ssp.* em amostras clínicas não deve ser ignorada, visto que, pode induzir a diferentes diagnósticos e tendo como consequência abordagens terapêuticas de forma errônea, culminando em uma alta taxa de morbimortalidade.

Existe grande relevância na identificação da etiologia fúngica, visto que, em alguns casos recebem conduta terapêutica inicial ineficaz (Faria *et al.* 2004). Por tanto faz-se necessário a ampliação desta pesquisa para melhor compreensão da associação entre infecção fúngica pulmonar associada a outras patologias do trato respiratório inferior.

## Material e Métodos

Esta pesquisa Trata-se de um estudo observacional descritivo transversal. Para tanto, foram utilizadas amostras clínicas pulmonares oriundas dos pacientes que passaram por coleta de material biológico com suspeita de doença respiratória na Fundação Hospital Adriano Jorge (FHAJ), no período de janeiro de 2017 à agosto de 2017. Houve, também, a realização de análise de prontuários contendo os dados epidemiológicos dos pacientes tais como sexo, idade, profissão, moradia, seguido de dados complementares os quais questionam patologias associadas a infecção fúngica pulmonar, aspectos relacionados as manifestações clínicas, tratamento e medicamentos utilizados, além de outros dados do prontuário.

Após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) foram obtidas amostras clínicas de escarro e líquido pleural, além de fragmentos teciduais do trato respiratório inferior oriundas de biópsia por meio de profissionais capacitados do referido hospital.

Cada amostra colhida foi semeada em duas placas de Petri preparadas com meio ágar Sabouraud e mantidas à temperatura de 25°C e 37°C por um período de até 30 dias, uma vez que o tempo de crescimento de alguns espécimes está entre 21 e 30 dias. Após o surgimento das colônias, estas foram purificadas e cultivadas em meio Chromagar *Candida* para identificação das leveduras do gênero *Candida*, onde ficaram incubadas a 37° C por dois (02) dias com posterior observação da coloração das colônias obtidas.

Para o estudo da micromorfologia das leveduras empregou-se a técnica de microcultivo em meio agár fubá deixando incubado por dois (02) dias a 37° C seguido da observação das estruturas fúngicas em microscópio.

Com o teste do tubo germinativo identificou-se as leveduras da espécie *C. albicans* através da semeadura do inóculo dessa levedura em 0,5 ml de albumina de ovo. Após duas (02) horas de incubação a 37° C removeu-se uma gota da solução seguido do preparo de uma lâmina para observação microscópica. A partir de então fez-se a análise avaliando a presença e a identificação das espécies isoladas juntamente com os dados obtidos nos prontuários de cada paciente.

## Resultados e Discussão

Como resultados foram coletadas quatorze (14) amostras clínicas, sendo onze (11) de escarros, duas (2) de fragmento de biópsia e uma (1) de líquido pleural dos pacientes internados na enfermaria da FHAJ. Destas amostras, oito (8) obtiveram crescimento fúngico, e estas foram selecionadas para um estudo dos dados clínicos e epidemiológicos.

De acordo com a tabela 1 houve um predomínio de pacientes do sexo feminino de 75%, a distribuição etária foi dos 30 aos 70 anos, com média de 53,75 anos e seis (6) dos pacientes eram residentes do município de Manaus, correspondendo a 75%, seguido dos municípios de Codajás e Autazes com 12,5%, cada.

Das patologias apresentadas como causa da internação tem-se a pneumonia como mais prevalente, representando cerca de 62,5% dos casos, seguido de abscesso pulmonar, bronquiectasia e massa tumoral pulmonar com 12,5% cada. Em relação ao tempo de internação cinco (5) pacientes passaram mais de quinze (15) dias de internação hospitalar. Além disso, seis pacientes (75%) eram fumantes, desses, cinco eram usuários por mais de 10 anos. Segundo Playford *et al.* (2008), enfermidades graves acompanhadas de um longo período de internação hospitalar podem levar ao comprometimento do equilíbrio parasita-hospedeiro, visto que ocorrem alterações na barreira tecidual, na microbiota local e no sistema imunológico do hospedeiro tendo como possível consequência a candidemia.

O amplo uso de antibióticos necessários para o tratamento das patologias infecciosas dos pacientes durante a internação hospitalar também foi observado. sendo na maioria dos casos (62,5%) o uso de ceftriaxona associada a claritromicina, seguido de ceftriaxona e clindamicina, clindamicina isolada e cefepime associado a azitromicina com 12,5% cada conforme a Figura 1. A associação da corticoterapia em 50% dos casos, sendo a prednisona o corticosteroide mais utilizado no tratamento., seguido do uso de anti hiperglicemiantes representando 37,5%.

**Tabela 1.** Dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes selecionados para a pesquisa.

PACIENTE (AMOSTRAS CLÍNICAS)	IDADE	SEXO	LOCAL DE RESIDÊNCIA	DOENÇA DE BASE	CLASSE DOS MEDICAMENTOS UTILIZADOS DURANTE INTERNAÇÃO
1 (IP3)	70 anos	F	Manaus	DPOC Bronquiectasia infectada.	Antibióticos Corticosteroides Broncodilador
2 (IP4)	65 anos	F	Manaus	Pneumonia.	Antibióticos Corticosteroides
3 (IP5)	53 anos	M	Codajás	Pneumonia.	Antibióticos Anticoagulante
4 (IP6)	56 anos	M	Manaus	Pneumonia.	Antibióticos Anticoagulante
5 (IP7)	43 anos	F	Autazes	Diabetes mellitus Abscesso pulmonar	Antibióticos Anti hiperglicemiante
6 (IP9)	59 anos	F	Manaus	Diabetes mellitus Pneumonia e derrame pleural	Antibiótico Corticosteroide Anti hiperglicemiante
7 (IP14)	30 anos	F	Manaus	Massa em hemitórax esquerdo.	Antibiótico Corticosteroide
8 (IP15)	54 anos	F	Manaus	Diabetes mellitus Pneumonia.	Antibiótico Anti hiperglicemiante

\*IP = Infecção pulmonar. DPOC = Doença pulmonar obstrutiva crônica.

### ANTIBIÓTICOS



- Ceftriaxona + Claritomicina 62,5 %
- Ceftriaxona + Clindamicina 12,5 %
- Clindamicina 12,5 %
- Cefepime + Azitromicina 12,5 %

**Figura 1.** Antibióticos utilizados no tratamento dos pacientes internados  
\*(%) = Percentagem em relação ao número de pacientes selecionados.

Vale ressaltar que, de acordo com os estudos realizados por Boulos (1993) e Silva (2010), o uso de antibióticos de amplo espectro de ação associado a corticoterapia prolongada, além da granulocitopenia são fatores predisponentes à infecção fúngica pulmonar por *Candida* spp. Sendo assim a candidíase apresenta-se como uma das infecções fúngicas sistêmicas de maior gravidade em pacientes imunocomprometidos por drogas terapêuticas.

Observa-se na tabela 2 a identificação das colônias leveduriformes obtidas das amostras clínicas selecionadas para estudo. Para tanto, utilizou-se o meio específico Chromagar *Candida*, além da análise da micromorfologia através da técnica de microcultivo e o teste do tubo germinativo, obtendo-se a identificação de *C. albicans* em 50% das amostras, sendo que em  $\frac{3}{4}$  dos casos teve-se a pneumonia como doença base e em  $\frac{1}{4}$  massa tumoral pulmonar.

**Tabela 2.** Crescimento de leveduras das mostas clínicas pulmonares de pacientes com suspeita de doença respiratória na Fundação Hospital Adriano Jorge

AMOSTRAS CLÍNICAS	DOENÇA DE BASE	EXAME DE CULTURA	TESTE DO TUBO GERMINATIVO
1 (IP3)	Bronquiectasia infectada.	<i>Candida</i> sp.	Negativo
2 (IP4)	Pneumonia não especificada.	<i>Candida albicans</i>	Presença de tubo germinativo
3 (IP5)	Pneumonia não especificada.	<i>Candida</i> sp.	Negativo
4 (IP6)	Pneumonia não especificada.	<i>Candida</i> sp.	Negativo
5 (IP7)	Abscesso pulmonar.	<i>Candida</i> sp.	Negativo
6 (IP9)	Pneumonia não especificada e derrame pleural.	<i>C. albicans</i>	Presença de pseudo-hifas, blastoconídios, clamidósporos e tubo germinativo
7 (IP14)	Massa tumoral pulmonar.	<i>C. albicans</i>	Presença de tubo germinativo
8 (IP15)	Pneumonia não especificada.	<i>C. albicans</i>	Presença de pseudo-hifas

\*IP = Infecção pulmonar.

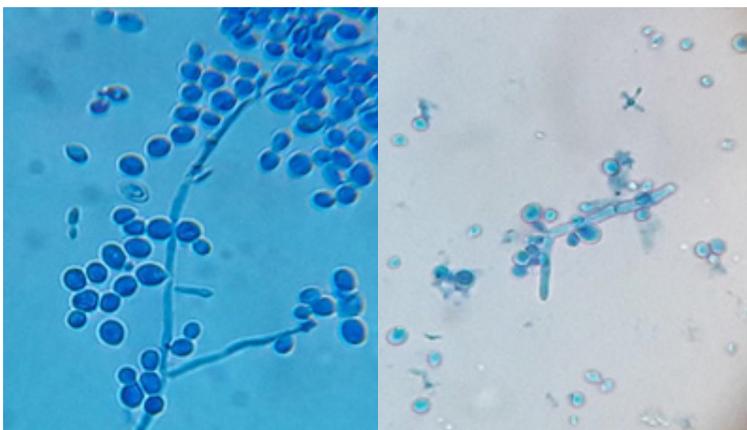
Conforme Crocco *et al.* (2004) e Araujo *et al.* (2005) a cor desenvolvida pelas colônias fúngicas através de indicadores de pH e fermentação de compostos específicos, diferentes meios cromógenos de cultivo têm sido empregados para diferenciar *C. albicans* e outras leveduras de importância médica. O Chromagar *Candida* é um método sensível além de específico para identificação das espécies mais comumente isoladas de leveduras do gênero *Candida*.

Foram isoladas oito leveduras de 11 amostras de escarro colhidas dos pacientes internados na FHAJ. Essas leveduras foram identificadas por meios de métodos convencionais e pelo método de Chromagar *Candida*, (Figura 2), obteve-se a espécie de *C. albicans* em 50% dos casos.

**Figura 2.** O crescimento de três colônias fúngicas de *Candida* sp. (em rosa claro) e uma *Candida albicans* (em verde claro) identificadas em meio do Chromagar *Candida*

Para Barbedo e Sgarbi (2010) a técnica de microcultivo permite o estudo micromorfológico das estruturas leveduriformes em meio agár fubá. Baseada no princípio de que a incubação neste meio estimula a produção de conídios e filamentação, possivelmente identifica a espécie através da pesquisa da presença de exibição dos blastoconídios e pseudo-hifas, sendo que a presença de pseudo-hifas e hifas hialinas septadas e ramificadas são particularidades do gênero *Candida* e havendo formação de clamidósporos indica *C. albicans*.

Realizada em todas as amostras selecionadas, a prova de microcultivo possibilitou a visualização da presença de pseudo-hifas em 50% das amostras clínicas, assim indicando a possível existência de colônias fúngicas por *C. albicans* (Figuras 3).

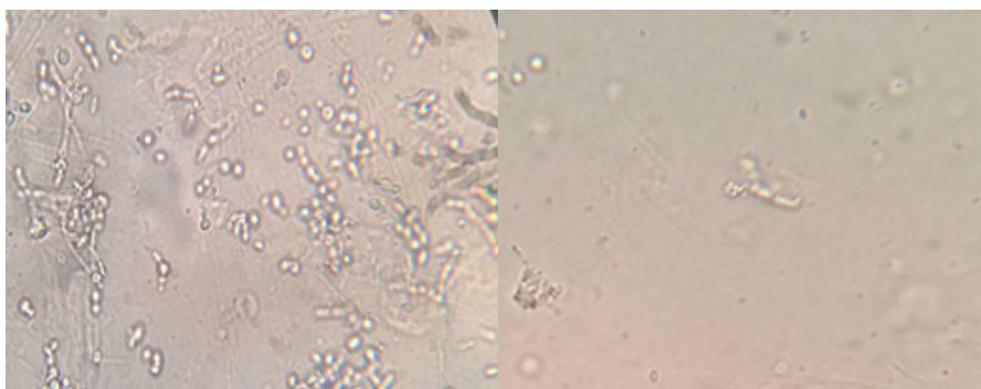


**Figuras 3.** Pseudo-hifas (setas) em análise micromorfológica por meio da prova de microcultivo, importante forma de demonstração da presença de fungo da espécie *Candida* spp.

Conforme ANVISA (2004) o teste do tubo germinativo é uma das provas fisiológicas mais utilizadas para identificação de *C. albicans* e *C. não albicans*. No cultivo, caso a levedura forme hifas hialinas ramificadas, porém, sem fragmentação trata-se provavelmente do gênero *Candida* e, havendo formação de clamidósporos característicos tem-se então a *C. albicans*. Em relação às espécies não *albicans*, estas, serão identificadas por métodos mais específicos.

O teste do tubo germinativo (Figura 4) foi aplicado em todas as amostras selecionadas para estudo e como resultado observou-se estruturas fúngicas como pseudo-hifas e tubos germinativos em 50% dos casos, o que sugere *C. albicans*.

Segundo Álvares *et al.* (2007) a importância do teste do tubo germinativo dá-se devido a capacidade de transição morfológica apontada como um relevante fator de virulência da *C. albicans*. Essas transições indicam a resposta do fungo em relação as modificações nas condições ambientais e permitem a adaptação a diversos nichos biológicos tendo como consequência a disseminação fúngica nas células do hospedeiro.



**Figura 4.** Pseudo-hifas, tubo germinativo, blastoconídeos e clamidósporos e 5presença de tubo germinativo.

## Consideração Final

Possíveis associações de fungos oportunistas com o estado clínico dos pacientes. *Candida albicans* e *C. não albicans* foram igualmente prevalentes nesta pesquisa, mostrando cada vez mais o oportunismo das espécies *C. não albicans*. Contudo, associações fúngicas e suas infecções secundárias apontam comorbidades de risco, em pacientes com patologia pulmonar, podendo levar a complicações como a

sepsis em caso de não tratamento ou tratamento inadequado, tornando-se importante o estudo desses fungos para se obter melhores desfechos permitindo um tratamento mais adequado ao paciente e melhor qualidade de vida.

## Agradecimentos

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas (FAPEAM), pela oportunidade e incentivo.

## Referências

- Álvares C, Svidzinski T, Consolaro, M 2007. *Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras*. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 43(5). Rio de Janeiro Set./Out. DOI: 10.1590/S1676-24442007000500004
- ANVISA 2004. *Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde*. 1° Ed. Brasília.
- Araujo CR, Miranda KC, Passos XS, Souza LKH, Lemos JA, Khrais CHA, Costa CR, Silva MRR, Fernandes OFL 2005. *Identificação das leveduras do gênero Candida por métodos manuais convencionais e pelo método cromogênico Chromagar™ Candida*. *Rev. Patol. Trop.* 34(1):37-42. Goiânia.
- Barbedo L, Sgarbi B 2010. *Candidíase*. *J. Bras. Doenças Sex Transm.* 22(1):22-38.
- Boulos M 1993. *Tratamento pelo fluconazol de pacientes imuno-comprometidos com graves infecções fúngicas*. *Rev. Inst. Med. Trop.* São Paulo, 35(1):81-87.
- Crocco EI, Mimica LMJ, Muramatu LH, Garcia C, Souza VM, Ruiz LRB, Zaitz C 2004. *Identificação de espécies de Candida e susceptibilidade antifúngica in vitro: um estudo com 100 pacientes com candidíase superficiais*. *An. Bras. Dermatol.* 79(6):689-687. Rio de Janeiro.
- Faria EC, Pessoa Jr VP, De-Maria-Moreira NL, Amorim DS, Gomes AP, Capone D, Siqueira-Batista R 2004. *Micoses pulmonares*. *Rev. Bras Med.* 61(8)
- Fontalvo DM 2016. *Tuberculosis and pulmonary candidiasis co-infection present in a previously healthy patient*. *Colomb Med (Cali)*. Apr-Jun; 47(2):105-108.
- Kali A, Charles MP, Noyal MJ, Sivaraman U, Kumar S, Easow JM 2013. *Prevalence of Candida co-infection in patients with pulmonary tuberculosis*. *The Australasian Medical Journal*, 6(8):387-391.
- Lindau S, Nadermann M, Ackermann H. *et al.* 2015. *Antifungal therapy in patients with pulmonary Candida spp. colonization may have no beneficial effects*. *J. Intensive Care* 3, 31. doi:10.1186/s40560-015-0097-0
- Montero JG, Olaechea P 2013. *Epidemiology, diagnosis and treatment of fungal respiratory infections in the critically ill patient*. *Rev. Esp Quimioter*; 26(2):137-188.
- Peixoto, JV, Rocha MG, Nascimento RTL, Moreira VV, Kashiwabara TGB 2014. *Candidíase – Uma revisão de literatura*. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*. 8(2):75-82.
- Playford EG, Marriott D, Nguyen Q, Chen S, Ellis D, Slavin M, Sorrell TC 2008. *Candidemia in nonneutropenic critically ill patients: risk factors for non-albicans Candida spp*. *Crit Care Med*. 36(7): 2034-9.
- Shweihat Y, Perry J, Shah D 2015. *Isolated Candida infection of lung*. *Respiratory Medicine Case Reports*. 16:18-19.
- Silva R 2010. *Infecções fúngicas em imunocomprometidos*. *J Bras Pneumol*. 36 (1):142-147. São Paulo Jan/Feb.

## Ocorrência de *Candida* spp. em cavidade oral de cães atendidos em clínica veterinária em Manaus, AM

Nayara de Fátima Lazameth Diniz<sup>1</sup>, Raquel Silva Lisbôa<sup>2</sup>, Fábio Silva de Souza<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Profissional autônoma, Manaus, Amazonas

<sup>2</sup> Agência de Defesa Agropecuária do Estado de Roraima

<sup>3</sup> Docente do Centro Universitário Estácio da Amazônia, Boa Vista, Roraima

Emails: nayara\_lazameth@hotmail.com, raquel.silvalisboa@gmail.com, mvfabiosouza@gmail.com

### Resumo

O fungo leveduriforme do gênero *Candida* faz parte da microbiota das mucosas e pele de mamíferos. A relação das leveduras com as periodontopatias na cavidade oral de cães ocorre devido à formação do biofilme dental. A caracterização da microbiota oral fúngica tem sido pouco referida na medicina veterinária. Objetivou-se isolar fungos leveduriformes de amostras de três sítios anatômicos da cavidade oral de cadelas atendidas em uma clínica veterinária da cidade de Manaus, AM. Foram coletadas amostras da cavidade oral de 65 cadelas, utilizando swabs estéreis girados sobre a superfície da mucosa gengival, biofilme dental do canino superior e 4º pré-molar inferior ou superior. A identificação foi feita por microscopia e auxanograma. Isolou-se fungos leveduriformes, observando-se a presença de *Candida* spp. em 24,6% (16/65). As espécies de *Candida* identificadas foram *Candida catenulata* 9,2% (6/65), *C. parapsilosis* 6,2% (4/65), *C. albicans* 4,6% (3/65), *C. famata* 3,1% (2/65), *C. guilliermondii* 1,5% (1/65) e outras espécies 75,4% (49/65). Foi observado o crescimento de leveduras em 50,2% (98/195) do total de amostras analisadas. Foram identificadas 58,8% (10/17) na mucosa gengival, 29,4% (5/17) no biofilme do canino superior e 11,8% (2/17) no 4º pré-molar (inferior e superior). *Candida catenulata* foi a espécie de maior ocorrência.

**Palavras-chave:** auxanograma, levedura, mucosa oral.

### Introdução

Quando se menciona doenças periodontais, bactérias são apontadas como principais protagonistas das afecções da cavidade oral de seres humanos e animais. Mas, por meio de pesquisas, além das bactérias existem também os fungos, especificamente as leveduras, que podem apenas fazer parte da microbiota de seres humanos e animais, como também tornar-se patogênicas à saúde destes (Vieira *et al.*, 2005).

Os fungos leveduriformes do gênero *Candida*, *Malassezia* e *Rhodotorula* fazem parte da microbiota das mucosas e pele de mamíferos, mantidas em equilíbrio pela competição com as bactérias e pelos mecanismos de defesa normais do hospedeiro, podendo tornar-se patogênicos em indivíduos, com microbiota alterada ou com mecanismos de defesa comprometidos (Lacaz *et al.*, 2002; Järvensivu *et al.*, 2004).

A relação das leveduras na cavidade oral dos animais com as periodontopatias ocorre devido à formação do biofilme dental, uma comunidade de microrganismos embebidos em matriz polimérica extracelular aderidos à uma superfície sólida (Lindhe *et al.*, 2005).

A estomatite fúngica geralmente resulta de infecção por espécies do gênero *Candida*, porém são raras em pequenos animais. As candidíases podem estar associadas com inflamação oral difusa, especialmente na língua e nas junções mucocutâneas (Greene e Chandler, 2006). Em cães, *C. albicans* já foi isolada da cavidade oral de quatro animais que apresentavam sinais de gengivite ou estomatite (Jadhav e Pal, 2006). As principais espécies dentro do gênero são: *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. glabrata*, *C. famata* e *C. rugosa* (Sidrim e Moreira, 1999).

Em animais, as leveduras do gênero *Candida* são isoladas das mucosas oral, vaginal e anal, bem como da pele, meato acústico externo e espaço interdigital, podendo tornar-se patogênicas com o aumento do número de células (Brito *et al.*, 2008). Em cães, *Candida* spp. já foi isolada do tegumento e das mucosas (Moretti *et al.*, 2004; Cleff *et al.*, 2005).

A cavidade oral dos animais é um sítio de muitas afecções que podem passar despercebidas (Venturini *et al.*, 2007). Quaisquer modificações na apreensão e mastigação dos alimentos, bem como nas condições gerais e no comportamento dos animais, podem ser associadas aos distúrbios orais (Santos, 2007). Os principais sinais de doença oral nos animais domésticos incluem halitose, disfagia, alterações comportamentais, ptialismo, saliva com sangue, prurido na face, descargas nasais, espirros, aumento de volume facial e fístulas oronasais (Venturini *et al.*, 2007).

O diagnóstico da doença periodontal pode ser realizado por meio dos exames periodontal e radiográfico completo com o animal anestesiado (Gorrel *et al.*, 2007). Na maioria das vezes, são necessários exames complementares como hemograma, radiografias intraorais para se chegar a um diagnóstico preciso, até mesmo quando se trata de uma enfermidade sistêmica causando alterações na boca (Mitchell, 2005).

Para o tratamento é realizada a remoção do cálculo dentário, visando eliminar os depósitos dentários da superfície dos dentes (Novais *et al.*, 2004). As extrações dentárias são indicadas em dentes com uma grande mobilidade, perda de mais da metade da inserção do dente, exposição da furca, perda total da gengiva inserida, lesões no periodonto e má oclusão (Gorrel *et al.*, 2007).

A profilaxia dental é o procedimento terapêutico que objetiva prevenir a ocorrência das afecções dentais, como a gengivite e a periodontite. A alimentação ou produtos em forma de gel para a higienização da cavidade oral auxiliam na prevenção do acúmulo de cálculos dentários (Ferro *et al.*, 2008).

A detecção e identificação de *Candida* spp. isoladas da cavidade oral de cães é importante para saber o seu potencial patogênico e a predisposição em relação às raças, ao sexo e a idade desses animais, e também no desenvolvimento de infecções por meio de contaminação de feridas por mordidas em seres humanos e outros animais (Talan *et al.*, 1999) e em contaminações de feridas cirúrgicas de cães devido a interferência dos mesmos (Braga *et al.*, 2005). Segundo Braga *et al.* (2005), saber identificar as enfermidades da cavidade oral e os microrganismos implicados é de grande importância, a fim de fornecer suporte clínico auxiliar no diagnóstico e terapia. Em medicina veterinária poucos estudos trabalharam a avaliação de presença fúngica em cavidade oral de animais, portanto, o objetivo do presente estudo foi de isolar e identificar a presença de fungos leveduriformes na cavidade oral de cadelas, atendidas em uma clínica veterinária da cidade de Manaus, AM.

## Material e Métodos

O presente trabalho apresenta delineamento observacional descritivo do tipo transversal. A coleta das amostras fúngicas foi realizada em uma clínica veterinária localizada na zona centro-sul da cidade de Manaus, Amazonas. O isolamento e identificação foram realizados no Laboratório de Micologia Médica no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA).

Uma ficha foi elaborada contendo os dados de identificação e contato dos tutores dos animais utilizados nesse estudo. O preenchimento das fichas foi importante para informar aos proprietários os resultados dos exames.

As amostras foram coletadas da cavidade oral de cadelas, híidas e não híidas atendidas para tratamento cirúrgico de eleição ou outro procedimento cirúrgico. Esta escolha ocorreu devido ao grande número de procedimentos cirúrgicos efetuados em cadelas na rotina da clínica e que por ocasião do momento de anestesia dos animais a coleta de material era favorecida sem interferências que poderiam comprometer a qualidade das amostras. A coleta foi realizada com swabs estéreis girados sobre a superfície de três sítios anatômicos distintos, como mucosa gengival, biofilme dental do canino superior (direito e esquerdo) e 4º pré-molar inferior (4ºPMI) e superior (4ºPMS). Todas as coletas foram realizadas com as mãos calçadas com luvas de procedimento. O material foi isolado em tubos de ensaio rosqueáveis contendo 2mL de solução salina 0,85% cada. A cavidade oral dos animais foi avaliada quanto à presença de lesões como sangramento gengival ou halitose.

As amostras foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultivo Agar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e incubadas a 36°C por até 10 dias com observação diária para posterior realização da purificação das colônias fúngicas.

Para avaliação dos aspectos micromorfológicos foi realizado microcultivo em meio ágar-fubá acrescido de Tween 80 (Lacaz *et al.*, 2002) em placas de Petri para posterior visualização no microscópio com objetiva de 10x em busca de estruturas características de cada espécie de *Candida* e incubadas a temperatura de 36°C. Os aspectos observados foram: o tipo de brotamento, presença ou não de micélio e pseudo-micélio (Dalmau, 1929).

A suspensão fúngica foi preparada a partir de colônias jovens, com crescimento de 48h em Agar Sabouraud dextrose e cloranfenicol a 36°C. Essa suspensão foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland e homogeneizada, estando pronta para o teste de identificação de assimilação de carbono ou assimilação de carboidrato, onde leveduras têm a capacidade de utilizar determinado carboidrato como única fonte de carbono (Sidrim e Moreira, 1999; Lacaz *et al.*, 2002).

Foi realizado o método de “Pourplate” (Clark, 1965) para posterior assimilação dos açúcares (glicose, lactose, maltose, rafinose e arabinose) e incubado a 36°C por 48 horas. Esse método foi empregado para a confirmação da identificação de espécies. Foram observadas quanto à turbidez na placa ou formação de um halo ao redor do açúcar desenvolvido pela assimilação específica de *Candida*.

A pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética de uso animal sob o número CEUA ESBAM n° 23, sendo todos os procedimentos executados de acordo com os critérios éticos aplicados ao uso animal no ensino e nas pesquisas regulamentados pela Lei Federal 11.794, de 8 de outubro de 2008 e pela Resolução do CFMV n° 879 de 15 de fevereiro de 2008.

## Resultados e Discussão

Foram coletadas amostras da cavidade oral de um total de 65 cadelas atendidas em uma clínica veterinária da cidade de Manaus, AM. Destas 24,6% (16/65) apresentaram leveduras do gênero *Candida* spp.

Obteve-se um número total de 195 amostras coletadas dos três sítios anatômicos da cavidade oral. Destas, foram isoladas 50,2% (98/195) espécies de fungos leveduriformes, sendo 16,3% (16/98) do gênero *Candida*, entre elas cinco espécies foram isoladas dos três sítios anatômicos analisados, mucosa gengival, canino superior e inferior e 4° pré-molar (PM) (inferior e superior).

As espécies de *Candida* identificadas foram *Candida catenulata* 9,2% (6/65), *C. parapsilosis* 6,2% (4/65), *C. albicans* 4,6% (3/65), *C. famata* 3,1% (2/65), *C. guilliermondii* 1,5% (1/65) e outras espécies 75,4% (49/65).

*Candida catenulata* foi a espécie mais isolada nesse trabalho. Não havia relatos da espécie isolada da cavidade oral de cães até ser identificada por Santin (2009).

A espécie *C. albicans* foi isolada de cães como agente etiológico de estomatite e, frequentemente provoca doença em humanos (Jadhav e Pal, 2006). A espécie *C. parapsilosis* já foi isolada da mucosa oral de cães por Brito *et al.* (2009) e pode estar envolvida na candidíase oral em humanos, bem como *C. guilliermondii* (Akpan e Morgan, 2002). Essas espécies estão presentes na microbiota natural de animais e possuem potencial patogênico para desenvolver infecções sistêmicas, principalmente em paciente imunodeprimidos (Radosavljevic *et al.*, 1999).

Das amostras coletadas dos três sítios da cavidade oral dos animais, a mucosa gengival apresentou a maior ocorrência 58,8% (10/17), canino superior (CS) 29,4% (5/17) e o 4°PM inferior e superior 11,8% (2/17). O isolamento da mucosa gengival em cães demonstra que podem estar envolvidos em patologias orais. Santin (2009) isolou de 59 animais 30 (50,85%) leveduras, encontrando 11 (18,64%) da mucosa gengival, 5 (8,47%) do canino e 5 (8,47%) do 4°PM.

No momento da coleta das amostras, foi observada a presença de halitose e sangramento gengival na cavidade oral dos animais, isso demonstra que possivelmente a presença de leveduras na cavidade oral pode influenciar na condição da saúde oral do animal. Essas alterações são encontradas em exame extraoral de pequenos animais ocorre quando esta cavidade é acometida por alguma afecção, conforme descrito por Roza (2004).

Os fungos são microrganismos amplamente encontrados na natureza, por isso a composição desta microbiota pode ser bastante influenciada pelo meio ambiente.

## Conclusões

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que a ocorrência de leveduras do gênero *Candida* spp. foi de 24,6% nas cadelas analisadas sendo isolados fungos leveduriformes em 50,2% das amostras coletadas com identificação de cinco espécies do gênero *Candida* spp., *Candida catenulata*, *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. famata* e *C. guilliermondii*. Além de se constatar maior ocorrência de isolamentos em amostras da mucosa gengival seguida do canino superior e do 4º pré-molar inferior.

## Referências

- Akpan A, Morgan R 2002. Oral candidiasis. *Postgraduate Medical Journal*, 78(2):455-459.
- Braga CAB, Resende CMF, Pestana ACNR, Carmo LS, Costa JE, Silva LAF, Assis LN, Lima LA, Farias LM, Carvalho MAR 2005. Isolamento e identificação da microbiota periodontal de cães da raça Pastor Alemão. *Ciência Rural*, 35(2):385-390.
- Brito EHS, Fontenelle ROS, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Monteiro AJ, Sidrim JJC, Rocha MFG 2008. The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. *The Veterinary Journal*, 182(2):320-326.
- Clark FE 1965. Agar-plate method for total microbial count. *Methods of soil analysis*. Madison: *American Society of Agronomy*, 2:1460-1466.
- Cleef MB, Lima APL, Faria RO, Meinerz ARM, Antunes TA, Araujo FB, Nascente PS, Nobre MO, Meireles MC 2005. Isolation of *Candida* spp. from vaginal microbiota of healthy canine females during estrous cycle. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36:201-204.
- Dalmau LM 1929. Remarques sur La technique mycologique. *Annales Parasitologie et Humaine Comparée*, 7:536-545.
- Ferro DG, Corrêa HL, Venturini MAFA 2008. Periodontia veterinária (parte II) O periodonto e a moléstia periodontal. *Nosso Clínico*, (62):6-11.
- Gorrel C, Gracis M, Hennet P, Verhaert L 2004. Focus: Doença Periodontal no Cão. Ed. Especial. Paris: *Aniwa Publishing*.
- Greene CE, Chandler FW 2006. *Candidiasis and Rhodotorulosis*. Infectious Diseases of the dogs and cats. 3. ed. St. Louis: Saunders Elsevier.
- Jadhav VJ, Pal M 2006. Canine mycotic stomatitis due to *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 23:233-234.
- Järvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M 2004. *Candida* yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. *Oral Diseases*, 10(2):106-12.
- Lacaz CS, Porto E, Martins JEC., Heins-Vaccari EM, Melo NT 2002. *Tratado de Micologia Médica Lacaz*. 9. ed. São Paulo: Sarvier.
- Lindhe J, Karring T, Lang NP 2005. *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Mitchell PQ 2005. *Odontologia de Pequenos Animais*. 1. ed. São Paulo: Roca.
- Moretti A, Posteraro B, Boncio L, Mechelli L, Gasperis E, Agnetti F, Raspa M 2004. Diffuse cutaneous candidiasis in a dog. Diagnostic by PCR-REA. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 21:139-142.
- Novais SMA, Batalha RP, Grinfeld S, Fortes TM, Pereira, MAS 2004. Relação doença cárie-açúcar: prevalência em crianças. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 4(3):1999-2003.
- Radosavljevic M, Koenig H, Letscher-Bru V, Waller J, Maloisel F, Lioure B, Herbrecht R 1999. *Candida catenulate* Fungemia in a Cancer Patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(2):475-477.
- Roza MR 2004. *Odontologia em pequenos animais*. 1. ed. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária.
- Santin R 2009. *Isolamento, identificação e susceptibilidade in vitro de leveduras isoladas da cavidade oral de fêmeas caninas*. Pelotas, Brasil. (Dissertação. Universidade Federal de Pelotas. UFPEL). 91f.

- Santos IC 2007. *Doença periodontal em cães*. Trabalho apresentado para o cumprimento de atividades referentes ao módulo 05 do curso especialização *latu sensu* em Clínica Médica e cirúrgica em Pequenos Animais – UCB. Disponível em: < [www.Qualittas.com.br](http://www.Qualittas.com.br) > . Acesso em 25 out. 2013.
- Sidrim JJC, Moreira JLB 1999. *Fundamentos clínico-laboratoriais da micologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 287p.
- Talan DA, Citron DM, Abrahamian FM, Moran GJ, Goldstein EJ 1999. Bacteriologic analysis of infected dog and cat bites. *The New England Journal of Medicine*, 340(2):85-92.
- Venturini M, Ferro DG, Correa HL, Gioso MA 2007. Doenças da cavidade oral atendidas no Centro Odontológico Veterinário durante 44 meses – estudo retrospectivo. *Nosso Clínico*, (59):6-12.
- Vieira AML, Almeida AB, Magnabosco C, Ferreira JCP, Luna SLP, Carvalho JLB, Gomes LH, Paranhos NT, Reichmann ML, Garcia RC, Nunes VFP, Cabral VB 2005. Programa de controle de cães e gatos do Estado de São Paulo. *Boletim Epidemiológico Paulista*, (23). Disponível em: < [http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa23\\_rg6.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa23_rg6.htm) > . Acesso em: 25 maio 2013.

## Brucelose em bovinos no município de Itacoatiara, Amazonas

João Cleber Cavalcante Ferreira<sup>1</sup>, Taiã Mairon Peixoto Ribeiro<sup>2</sup>, Sandro Ferronato Francener<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Instituto Federal do Amazonas- Campus Itacoatiara, Itacoatiara-AM

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Ciência Animal-Universidade Federal de Goiás

<sup>3</sup> Instituto Federal do Amazonas- Campus Itacoatiara, Itacoatiara-AM

Emails: joacleberagro@hotmail.com, sandroferronato@hotmail.com, ribeiro.vet@uft.edu.br

### Resumo

A brucelose é uma doença infectocontagiosa provocada por bactérias do gênero *Brucella* spp., infectando homem e animais, acarretando grandes problemas sanitários e importantes prejuízos econômicos. O grupo de risco sujeito à infecção por *B. abortus* é composto por profissionais que trabalham com saúde e produção animal ou que atuem direta ou indiretamente com os mesmos. Esse grupo de risco é composto principalmente por veterinários, zootecnistas, tratadores, magarefes, laboratoristas e os agentes de inspeção pela proximidade com os animais infectados. Tendo em vista as relevantes perdas e do pouco conhecimento que a população possui sobre essa enfermidade, esse estudo objetivou realizar um levantamento da soroprevalência de brucelose em bovinos abatidos sob fiscalização estadual no município de Itacoatiara/AM, por meio do teste de Soro Aglutinação Rápida em placa com Antígeno Acidificado Tamponado (AAT). Foram coletadas 109 amostras de sangue bovino, sendo que 7 (6,42%) resultaram soropositivas para brucelose ao teste de AAT. Comparando a positividade ao sexo dos animais estudados, observou-se 2 (5,6%) machos e 5 (6,8%) fêmeas soropositivas, porém, aplicando-se o teste de *qui-quadrado* de Pearson ( $P < 0,05$ ), essa diferença não foi significativa ( $p > 0,05$ ). Assim evidenciam-se riscos à saúde dos trabalhadores e dos consumidores para a contaminação com essa doença.

**Palavras-chave:** *Bos taurus*, *Brucella abortus*, saúde pública.

### Introdução

A brucelose é uma doença infecto contagiosa provocada por bactérias do gênero *Brucella* spp., que produz infecção característica nos animais e pode infectar o homem, por ser considerada uma zoonose cosmopolita, acarreta, mundialmente, problemas sanitários importantes e prejuízos econômicos alarmantes. Nesse sentido, caracteriza-se como uma das zoonoses mais estudadas no mundo, sendo endêmica no Mediterrâneo, Oriente Médio, Península Arábica e América Latina, onde também é conhecida como febre ondulante, febre mediterrânea ou febre de Malta, na qual fazem referência a uma de suas características clínicas ou localização geográfica (Brasil, 2006; Godfroid *et al.*, 2005; Mello *et al.*, 2007).

A brucelose humana está profundamente ligada à atividades ocupacionais, uma vez que a maior parte de suas infecções decorre de intervenções veterinárias, manejo rural do animal, ingestão de alimentos contaminados, como leite cru, queijo fresco e carne mal cozida, manipulação de vacinas patogênicas e infecções adquiridas em laboratórios (Fiori *et al.*, 2000; Gonçalves, 2005; Wallach *et al.*, 2008). Outro grupo de risco são os funcionários de frigoríficos, devido ao contato direto com vísceras, carne, sangue, urina e demais secreções de animais possivelmente infectados, agravado pelo ambiente úmido e a possibilidade de acidentes com facas ou materiais perfurocortantes, atuando como porta de entrada para esses microrganismos (Dias, 2012).

De acordo com Brasil (2006), estes microrganismos são parasitos intracelulares facultativos, com morfologia de cocobacilos Gram-negativos, imóveis e, conforme a espécie, apresentam-se em cultivos primários com morfologia colonial lisa ou rugosa (rugosa estrita ou mucoide). Na América Latina e especialmente no Brasil, a espécie mais envolvida na patologia brucélica humana é *B. abortus*, cujos hospedeiros preferenciais são os bovinos (Mello *et al.*, 2007; Pappas *et al.*, 2005).

Essas bactérias são pouco resistentes ao calor, morrendo em 10 minutos a 80°C e poucos minutos pela fervura ou pasteurização. A radiação ionizante também é eficiente, no entanto permanecem viáveis por

longos períodos a baixas temperaturas ou liofilizados (Brasil, 2006). Conforme Lima (2008), as bactérias do gênero *Brucella* spp. são muito resistentes às condições do ambiente (até 120 dias) desde que protegidas por matéria orgânica (restos placentários, produtos de aborto, fezes e leite), porém a acidez das estrumeiras as destrói rapidamente.

Pessegueiro *et al.* (2003) relataram que *Brucella* spp. é destruída em 15 segundos à temperatura de 72 °C e em três minutos a 62-63 °C (pasteurização), entretanto, em zonas endêmicas, é preconizado o uso de temperaturas mais elevadas (85 °C) e salienta-se que as temperaturas abaixo de 5 °C inibem o seu crescimento e multiplicação, persistindo mesmo a temperaturas de congelamento.

A brucelose é considerada um sério problema de saúde pública com cerca de 500.000 casos de infecção ao ano no mundo e com letalidade de 1 a 6% dos casos não tratados, com o agravante do sub diagnóstico, pois a estimativa é que para cada caso diagnosticado existem outros 25 não identificados (Ferreira *et al.*, 2002; Mello *et al.*, 2007). O grupo de risco, que está sujeito a contaminação por *B. abortus*, é composto por profissionais que trabalham com saúde e produção animal e os que possuem esse contato direto ou indireto com o animal, como os veterinários, zootecnistas, tratadores, magarefes e os agentes de inspeção pelo fato de possuírem essa proximidade com os animais infectados (Acha e Szyfres, 2001).

Casos humanos são de difícil diagnóstico por apresentar sintomatologia inespecífica, determinando maior necessidade de recursos diagnósticos e conseqüentemente, maiores gastos. Os sintomas mais prevalentes são calafrios, adinamia, anorexia, cefaleia, dor abdominal, alteração no transito intestinal, dor testicular, humor depressivo, alteração do sono, artralguas, artrite, mialgia, perda ponderal, febre, sudorese, tosse, esplenomegalia, hepatomegalia, icterícia, sinais neurológicos focais, uveíte, adenopatias, exantema cutâneo e sopro cardíaco (Corbel, 2006; Lawinsky *et al.*, 2010; Pessegueiro *et al.*, 2003).

As perdas econômicas desencadeadas pela infecção por *B. abortus* estão relacionadas à baixa eficiência reprodutiva das fêmeas bovinas, associada aos abortos, nascimento de natimortos e bezerros fracos que normalmente morrem ou tem crescimento debilitado, conseqüentemente, remetem à queda na produção leiteira e o número de bezerros destinados para comercialização (Lage *et al.*, 2008).

A brucelose em bovinos causa redução de 25% da produção de carne e leite, redução de 15% na produção de bezerros, aumento no intervalo entre partos de 11,5 meses para 20 meses e de cada cinco fêmeas bovinas infectadas, uma aborta ou torna-se permanentemente estéril (Brasil, 2006; Paulin, 2003). As principais manifestações nos animais, como abortos, nascimento prematuros, esterilidade e baixa produção de leite contribuem para uma considerável baixa na produção de alimentos. No homem, a sua manifestação clínica é responsável por incapacidade parcial ou total para o trabalho (Brasil, 2006).

Santos *et al.* (2013), considerando os gastos decorrentes da brucelose na pecuária bovina, estimaram que as perdas diretamente relacionadas a esta enfermidade no Brasil são de R\$ 226,47 ou R\$ 420,12 para cada vaca acima dos 24 meses, respectivamente, para corte e leite. Outras perdas que não deixam de ser importantes, mas que são difíceis de serem quantificadas, são as de depreciação do preço dos animais provenientes das propriedades com ocorrência dessa enfermidade (Lage *et al.*, 2008; Poester *et al.*, 2009).

Tendo em vista a escassez de estudos epidemiológicos para identificar a presença da infecção por *Brucella abortus* no rebanho bovino do estado do Amazonas, colocando em risco a produção pecuária e a saúde pública, respectivamente, pelas relevantes perdas produtivas e a carência de conhecimento da população em geral sobre essa enfermidade, objetivou-se realizar um levantamento da ocorrência de anticorpos anti-*Brucella abortus* em bovinos abatidos na cidade de Itacoatiara, Amazonas, devidamente inspecionados por órgão de inspeção estadual.

O objetivo desse trabalho consistiu em verificar a frequência de soroprevalência de positividade para anticorpos anti-*Brucella abortus* em bovinos (*Bos taurus*) abatidos sob fiscalização estadual no município de Itacoatiara, Amazonas, Brasil e, identificar variáveis como possíveis fatores associados à infecção brucélica em bovinos, bem como sugerir medidas de prevenção aos produtores rurais que criam bovinos no município.

## Material e Métodos

Itacoatiara é um município brasileiro do estado do Amazonas, localizado na mesorregião de centro amazonense, apresentou população de 86.839 habitantes no último censo (2010) com estimativa populacional de 98.503 habitantes para o ano de 2016. Em relação à produção pecuária bovina, o número é estimado em 92.181 cabeças, dessas, 8.230 são de vacas ordenhadas com produção média de 6.163 mil litros de leite in natura, para o ano de 2015 (IBGE, 2015).

No ano de 2013, o município de Itacoatiara forneceu pouco mais de 10,3 mil cabeças de bovinos para o abate, o que correspondeu aproximadamente 5% do total abatido no estado do Amazonas (Carreiro *et al.*, 2015).

Entre os meses de abril a junho do ano de 2016, foram coletadas 109 amostras de sangue bovino dispersas em 73 (66,97 %) fêmeas e 36 (33,03 %) machos. Para cada animal selecionado foi preenchida uma ficha de identificação, contendo dados referentes ao sexo. Os animais foram integrados à pesquisa após a sensibilização por dardo cativo e posterior sangria, submetidos às normas de bem-estar animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

A coleta de sangue para posterior análise sorológica para *Brucella abortus*, foi realizada logo após a sangria, realizada pelo magarefe do frigorífico. O volume de sangue obtido ( $\pm 7$  mL) foi coletado em tubos de polipropileno de 10 mL, do tipo *Vacutainer* com ativador de coágulo para facilitar o processo de retração do coágulo visando a obtenção do soro para realização dos testes. Foram realizadas 109 coletas de bovinos no período estudado. As amostras (soros) foram pipetadas, identificadas e aliqüotadas em tubos do tipo *Ependorff* (Microtubos) e congeladas a  $-20$  C° até sua análise laboratorial.

As análises laboratoriais foram processadas no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Tocantins, pela prova de Soro Aglutinação Rápida em Placa com Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), seguindo a metodologia descrita no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal - PNCEBT (Brasil, 2006).

A análise dos fatores de risco associados foi realizada na associação da ausência ou presença da infecção por *Brucella abortus* com a variável pesquisada (sexo) utilizando-se o método estatístico de chi-quadrado ( $\chi^2$ ) bicaudal com correção de Yates, com o valor de p (valor-p =  $< 0,05$ ) com uso do Programa Epi-info disponibilizado pelo Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos da América (CDC, 2018).

## Resultados e Discussão

Do total de 109 amostras de sangue bovina coletada, sete animais resultaram soropositividade ao teste de AAT, indicando uma soroprevalência de 6,42% dos animais estudados. Analisando-se separadamente, de acordo com o sexo, pode-se constatar um maior percentual de fêmeas soropositivas, sendo 5 (6,8%) fêmeas e 2 (5,6%) machos (Tabela 1).

Estatisticamente, considerando as categorias macho e fêmea, aplicando-se o teste de *qui-quadrado* de Pearson ( $P < 0,05$ ), não se verificou diferença significativa de soroprevalência entre os sexos ( $p > 0,05$ ).

Apesar disso, Minervino *et al.* (2011) por meio de um estudo retrospectivo da ocorrência de bovinos soro reagentes à brucelose no estado do Pará, constataram que vacas foram mais soropositivas ao teste de AAT do que touros. Esses autores inferiram essa maior prevalência em virtude do seu maior tempo de vida na propriedade, conseqüentemente, maior risco de exposição ao patógeno e por propiciar um meio adequado à multiplicação desses microrganismos no seu trato reprodutivo.

**Tabela 1.** Dados sorológicos para brucelose bovina, frente ao Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) das 109 amostras avaliadas.

Amostras	Positivo	(%)	Negativo	(%)	TOTAL
Machos	2	5,6	34	94,4	36
Fêmeas	5	6,8	68	93,2	73
Total	7	6,42	102	93,58	109

\*Não houve diferença estatística para o sexo dos animais estudados ( $p > 0,05$ ).

Estendendo-se essa prevalência a nível de rebanho, observou-se que as mesmas foram superiores à média brasileira, que se manteve entre 4 e 5% e, da Região Norte, com 4,1%, registradas entre 1988 e 1998 e publicadas no Manual do PNCEBT (Brasil, 2006). Paulin e Neto (2002), com base nos dados dos Boletins de Defesa Sanitária Animal, observaram que no ano de 1995, foram notificados 195 (7,9%) animais soro reatores no Acre e 91 (5,7%) no Amazonas. Nesse contexto, apesar da aprovação do programa de controle e erradicação da brucelose em bovinos em 2001, a presente pesquisa evidenciou índices semelhantes aos registrados na década de 90.

A prevalência registrada foi bastante inferior aos 16,6% e 17,2% encontrados, respectivamente, nos estados do Pará e em Tocantins por Viana *et al.* (2010). Esses autores ainda registraram que dos 142 bovinos positivos ao teste de AAT, nenhum apresentou sinais sugestivos de brucelose nos exames *ante* e *post-mortem*, mostrando reduzida eficácia no diagnóstico clínico para o controle do risco que a doença pode representar aos trabalhadores e consumidores.

Celestino *et al.* (2016) registraram a prevalência de 11,88% no município de Sinop (MT), sendo pouco superior, mas ficando próxima à prevalência registrada de 10,2% em pesquisa oficial no estado de Mato Grosso (Negreiros *et al.*, 2009).

Minervino *et al.* (2011) observaram uma prevalência de 10,25% no Estado do Pará, valores estes inferiores aos 16,6% encontrados por Viana *et al.* (2010) para o mesmo estado. Porém, ambos superiores aos 6,42% encontrados no presente estudo, o qual assemelha-se à prevalência de 6,2% registrada para o rebanho bovino rondoniense (Villar *et al.*, 2009).

Como agravante à ocorrência de animais soropositivos no município de Itacoatiara, vale ressaltar que no estado do Amazonas a fiscalização e regularização dos abatedouros ainda é deficitária. Segundo dados de Carrero *et al.* (2015), em todo o estado existem apenas 14 matadouros licenciados, sendo um sob Serviço de Inspeção Federal (SIF) – concedido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e permite a comercialização a nível federal, seis com o Serviço de Inspeção Estadual (SIE) – de responsabilidade da Agência de Defesa Agropecuária e Florestal do Estado do Amazonas (ADAF) e permite a comercialização a nível estadual, e outros sete pelo Serviço de Inspeção Municipal (SIM) – de responsabilidade das prefeituras municipais e permite apenas a comercialização local.

Apesar de iniciativas da ADAF para ajudar as prefeituras na implementação de um serviço de inspeção municipal, a maioria dos abatedouros opera de forma irregular sem o devido cuidado sanitário, operando de forma clandestina com abate realizado nas propriedades rurais (Carreiro *et al.*, 2015). Esses mesmos autores consideram que até nas regiões com a presença de abatedouros inspecionados, observam-se taxas superiores a 50% de irregularidades.

Considerando essa taxa de irregularidade, pode se estimar que, a cada 100 animais abatidos sob algum tipo de fiscalização, ao menos outros 50 podem estar indo pra mesa do consumidor sem nenhum tipo de inspeção, gerando risco de contaminação ao consumidor e, especialmente, ao trabalhador, que entra em contato direto com esse animal durante o abate. Assim, verifica-se a necessidade de maior controle sanitário e conscientização da população em geral sobre a importância de consumir produtos de origem animal de estabelecimentos devidamente regulamentados e fiscalizados.

## Conclusões

A brucelose está presente no rebanho bovino abatido no município de Itacoatiara, sendo necessária uma fiscalização mais rigorosa e uma maior conscientização da população sobre o risco dessa zoonose.

Deve-se destacar a importância da vacinação das fêmeas na idade correta, pois esse ainda é o método mais eficaz para reduzir a prevalência dessa enfermidade nos bovinos e, conseqüentemente, minimizar as perdas ao produtor e o risco para a saúde pública.

A vigilância epidemiológica da brucelose bovina em frigoríficos, por meio de métodos diagnósticos eficientes, deve ser avaliada como alternativa de controle da qualidade da carne bovina, visando a proteção do trabalhador e consumidor final.

## Referências

- Acha PN, Szyfres B 2001. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales: Bacterioses e micosis*. 3ª ed. Organização Panamericana de Saúde, Washington, 416p.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal. 2006. *Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal*. 1ª Edição. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 188 p.
- Carrero GC, Albuja G, Frizo P, Hoffmann EK, Alves C, Bezerra CS 2015. *A Cadeia Produtiva da Carne Bovina no Amazonas*. IDESAM, Manaus. 44 p.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) 2018. National Center for Health Statistics. Epi-Info 7. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention, 2018 [on line]. United States of America. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/epiinfo/index.html> > Acesso em: 18 may. 2018
- Celestino ALO, Petry AC, Castro BG 2016. Anticorpos anti-*Brucella abortus* em bovinos abatidos em Sinop, Mato Grosso. *Revista Acadêmica Ciência Animal*, 14 (1): 169-176.
- Corbel MJ, Elberg SS, Cosivi O 2006. *Brucellosis in humans and animals*. Geneva: Organização Mundial de Saúde, Genebra, 89 p.
- Dias IC 2012. Prevenção de zoonoses ocupacionais em abatedouros de bovinos. *Vivências*, 8 (15): 89-98.
- Ferreira CR 2002. Espondilodiscite brucelósica: relato de caso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35 (1): 255-258.
- Fiori PL, Mastrandea S, Rappelli P, Cappuccinelli P 2000. *Brucella abortus* infection acquired in microbiology laboratories. *Journal Clinical Microbiology*, 38 (5): 2005-2006.
- Godfroid J, Liautard JP, Kohler S, Fretin D, Walravens K, Garin-Basturi B, Letesson JJ 2005. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Veterinary Research*, 36 (3): 313-326.
- Gonçalves DD 2005. *Soroepidemiologia e variáveis ocupacionais e ambientais associadas à leptospirose, brucelose e toxoplasmose em trabalhadores de frigorífico*. Londrina, Brasil. (MSc Dissertação. Universidade Estadual de Londrina. UEL). 95p.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão 2015. *Produção Pecuária Municipal*. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 71 p.
- Lage AP, Poester FP, Paixão TA, Silva TMA, Xavier MN, Miranda KL, Alves CM, Mol JPS, Santos RL 2008. Brucelose bovina: uma atualização. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 32 (3): 202-212.
- Lawinsky MLJ, Ohara PM, Elkhoury MR, Faria NC, Cavalcante KRJ 2010. Estado da arte da brucelose em humanos. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 1 (4): 75-84.
- Lima RDF 2008. *Estudo transversal das doenças abortivas de origem bacteriana no sistema de produção de bovinos leiteiros do concelho de Nordeste, São Miguel, Açores*. Lisboa, Portugal. (MSc Dissertação. Universidade Técnica de Lisboa. UTL). 133p.
- Mello CCF, Souza DU, Glória FAC, Moura LO, Mello GCF 2007. Espondilodiscite por brucelose: relato de caso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40 (4): 469-472.
- Minervino AHH, Calhau AS, Alves Filho A, Barbosa RS, Neves KAL, Barros IO, Barreto RA, Ortolani EL 2011 Estudo retrospectivo da ocorrência de bovinos soro reagentes à brucelose no estado do Pará. *Acta Veterinaria Brasileira*, 5 (1): 47-53.
- Negreiros RL, Dias RA, Ferreira F, Ferreira Neto JS, Gonçalves VSP, Silva MCP 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no estado de Mato Grosso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61 (supp.1): 56-65.
- Pappas G, Solera J, Akritidis N, Tsianos E 2005. New approaches to the antibiotic Treatment of brucellosis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26 (2): 101-105.
- Paulin LM, Ferreira Neto JS 2002. A experiência brasileira no combate à brucelose bovina. *Arquivos do Instituto Biológico*, 69 (2): 105-112.
- Paulin LM 2003. Brucelose. *Arquivos do Instituto Biológico*, 70 (2): 239-249.
- Pessegueiro P, Barata C, Correia J 2003. Brucelose – Uma revisão sistematizada. *Revista de Medicina Interna*, v.10 (2): 91-100.

- Poester F, Figueiredo VCF, Lôbo JR, Gonçalves VSP, Lage AP, Roxo E, Mota PMPC, Müller EE, Ferreira Neto JS 2009. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do programa nacional de controle e erradicação de brucelose e tuberculose: introdução. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61 (supp.1): 1-5.
- Santos RL, Martins TM, Borges AM, Paixão TA 2013. Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.33 (6): 759-764.
- Villar KS, Amaku M, Dias RA, Ferreira Neto JS, Benitez F, Gonçalves VSP, Figueiredo VCF, Lôbo JR, Ferreira F 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Rondônia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61(supp.1): 85-92.
- Viana L, Baptista F, Teles J, Ribeiro APC, Pigatto CP 2010. Soropositividade e lesões sugestivas de brucelose em bovinos abatidos no estado de Tocantins, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, 77(3): 517-520.
- Wallach JC, Ferrero MC, Delpino MV, Fossati CA, Baldi PC 2008. Occupational infection due to *Brucella abortus* S19 among workers involved in vaccine production in Argentina. *Clinical Microbiology and Infection*, 14 (8): 805-807.

## Parasitas sanguíneos em cães do município de Araguaína, Tocantins, Brasil

Marcos Adriano Barbosa Machado<sup>1</sup>, Taiã Mairon Peixoto Ribeiro<sup>1</sup>, Lucas Marlon Freiria<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Tocantins, Araguaína-TO

<sup>2</sup> Instituto Federal de Rondônia – Campus Cacoal, Cacoal-RO

Emails: marcosvet18@gmail.com, ribeiro.vet@uft.edu.br, lucas.m.freiria@gmail.com

### Resumo

As hemoparasitoses estão entre os principais desafios na clínica médica veterinária, devido aos graves sinais clínicos que provocam em cães infectados. Protozoários e bactérias estão entre os principais hemoparasitos encontrados com frequência em pacientes sintomáticos. O presente estudo objetivou avaliar a frequência e potenciais fatores de risco associados à infecção por hemoparasitos em cães no município de Araguaína, estado do Tocantins. Foram analisados 159 prontuários de pacientes caninos em que as amostras de sangue foram submetidas à coloração por panótico rápido e realizada a leitura do esfregaço sanguíneo sob microscopia de luz óptica com aumento de 1000x. Foi observada positividade de 35,83% para *Ehrlichia canis*, 25,83% para *Anaplasma platys*, 11,67% para *Mycoplasma haemocanis*, 22,5% para *Babesia* spp. e 4,17% para *Hepatozoon* spp. Nenhuma das variáveis se mostrou como fator de risco associados à hemoparasitose. Portanto, foi constatada a circulação de hemoparasitos em espécimes caninos no município de Araguaína, sendo mais prevalentes as espécies/gêneros *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Babesia* spp. Deste modo, é recomendável aos clínicos veterinários que realizem exames complementares dos pacientes com suspeita clínica de hemoparasitose.

**Palavras-chave:** *Babesia* spp, Cães, *Ehrlichia canis*.

### Introdução

Os hemoparasitos são patógenos que infectam cães e outras espécies, geralmente transmitidos por artrópodes vetores, sendo detectados por métodos parasitológicos como esfregaço sanguíneo, gota espessa, técnica de Woo, técnica de Knott ou ainda por métodos sorológicos e moleculares. Os parasitos sanguíneos podem provocar graves sinais clínicos nos espécimes caninos, com o risco de levar a óbito os animais infectados (Antunes *et al.*, 2015). *Babesia canis*, *Babesia gibsoni*, *Hepatozoon* sp., *Mycoplasma haemocanis*, *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* estão entre os patógenos encontrados com maior frequência em cães (Silva *et al.*, 2014; Antunes *et al.*, 2015).

O gênero *Babesia* spp. compreende protozoários intra-eritrocitários, sendo presente em cães as espécies *Babesia gibsoni* e *Babesia canis* (subespécies *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis Rossi* e *Babesia canis*) (Silva *et al.*, 2012a; Harvey *et al.*, 2017). *Ehrlichia canis* são bactérias Gram-negativas intracelulares que tem tropismo por monócitos (Harvey *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2017). *Hepatozoon* spp. são protozoários intracelulares que são observados principalmente pela visualização de gamontes intraneutrofílico ou intramonocitário (Honório *et al.*, 2017). *Anaplasma platys* são bactérias Gram-negativas com tropismo por plaquetas (Ribeiro *et al.*, 2017). As bactérias do gênero *Mycoplasma* spp. possuem características particulares como a ausência de parede celular e a dependência estrita da célula hospedeira em virtude de seu genoma ser diminuto (Soares *et al.*, 2016).

Tendo em vista os impactos deletérios provocados por tais patógenos, objetivou-se quantificar a frequência de casos de parasitos sanguíneos em caninos do município de Araguaína, TO.

### Material e Métodos

O estudo foi conduzido no período compreendido entre janeiro e dezembro de 2017. Foram analisados por amostragem de conveniência os dados dos prontuários (ficha de resultados de exames) de 159

animais atendidos com suspeita de hemoparasitose por médicos veterinários de clínicas veterinárias particulares no município de Araguaína, Tocantins, Amazônia Legal Brasileira.

Os esfregaços sanguíneos foram realizados de acordo com a metodologia preconizada por Thrall *et al.* (2015), e em seguida foram corados com kit panótico rápido (Newprov®) e observados em microscópio binocular com um aumento de 1000x com o uso de óleo de imersão, com o objetivo de realizar a detecção de hemoparasitos.

Dados referentes ao sexo (macho ou fêmea), faixa etária (< 1 ano de idade ou ≥ 1 ano de idade) e positividade para hematozoários foram coletados dos prontuários dos pacientes caninos (*Canis lupus familiaris*).

A análise dos fatores de risco associados foi realizada na associação da ausência ou presença da infecção por hemoparasitos em caninos com as variáveis pesquisadas (sexo, faixa etária) utilizando-se o método estatístico de chi-quadrado ( $\chi^2$ ) bicaudal com correção de Yates, com o valor de p (p-value < 0,05) com uso do programa Epi-info disponibilizado pelo Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos da América (CDC, 2018).

## Resultados e Discussão

Foram diagnosticados 120 espécimes caninos (88,89%) com algum tipo de parasito sanguíneo (Tabela 1). O percentual encontrado no presente estudo é superior ao encontrado por Mundim *et al.* (2008) em Anápolis-GO (33,96%), Anjos *et al.* (2012) em Campo Grande-MS (19,25%), Silva *et al.* (2014) em Abadia dos Dourados-MG (27,6%) e Leal *et al.* (2015) no Rio de Janeiro-RJ (64,70%). O percentual alto encontrado neste estudo (88,89%) pode ter ocorrido devido ao fato de que os animais já possuíam alguma suspeita clínica de hemoparasitose devido aos sinais clínicos observados nos pacientes caninos, tais como epistaxe, anemia, uveíte, esplenomegalia, distúrbios oftálmicos, linfadenomegalia, apatia e febre, além da presença de ectoparasitos, tais como carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus*, do gênero *Amblyomma* spp. e pulgas do gênero *Ctenocephalides* spp.

A espécie mais encontrada foi a bactéria Gram-negativa *Ehrlichia canis*, presente em 43 dos 120 animais positivos para hemoparasitos (Tabela 2). Outras espécies/gêneros diagnosticadas foram *Anaplasma platys*, *Babesia* spp. e *Mycoplasma haemocanis*. O gênero encontrado em menor quantidade foi *Hepatozoon* spp., sendo observado o parasitismo de apenas cinco animais. De acordo com Dória *et al.* (2016), as técnicas de esfregaço sanguíneo podem resultar em falsos negativos, ainda que realizada por diferentes métodos devido a sua baixa sensibilidade, o que nos permite sugerir que o resultado de positivos poderia ser ainda maior. Não foram observadas coinfeções entre diferentes espécies de hemoparasitos.

**Tabela 1.** Resultado do diagnóstico de hemoparasitose por leitura de esfregaço sanguíneo de caninos no município de Araguaína (Tocantins) no ano de 2017.

Resultado do Esfregaço	Quantidade (N)	Porcentagem (%)
Positivo	120	88,89
Negativo	39	28,89
Total	159	100

**Tabela 2.** Espécies/Gêneros de hemoparasitos encontrados em amostras positivas de caninos no município de Araguaína (Tocantins) no ano de 2017.

Espécies/Gêneros	Número de Positivos	Porcentagem (%)
<i>Ehrlichia canis</i>	43	35,83
<i>Anaplasma platys</i>	31	25,83
<i>Babesia</i> spp.	27	22,50
<i>Mycoplasma haemocanis</i>	14	11,67
<i>Hepatozoon</i> spp.	5	4,17
Total	120	100

A presença de *Ehrlichia canis* foi superior ao encontrado nos estudos de Mundim *et al.* (2008) em Anápolis-GO (5,56%), Ueno *et al.* (2009) em Botucatu-SP (7,1%), Sousa *et al.* (2010) em Cuiabá-MT (24,62%), Silva *et al.* (2014) em Abadia dos Dourados-MG (2%), Leal *et al.* (2015) no Rio de Janeiro-RJ (1%), Rotondano *et al.* (2015) em Patos-PB (4%) e Makino *et al.* (2016) em Várzea Grande-MT (52,5%). Todavia, foi menor do que o relatado por Antunes *et al.* (2015) em caninos de Campo Grande-MS (60%).

*Anaplasma platys* foi o segundo hemoparasito em quantidade observada em esfregaços sanguíneos presente em 25,83% das amostras positivas. O percentual de *Anaplasma platys* encontrado na presente pesquisa é menor do que aquele encontrado por Mundim *et al.* (2008) em Anápolis-GO (50%), Almeida *et al.* (2010) em Cuiabá-MT (67,2%), Antunes *et al.* (2015) em Campo Grande-MS (10%) e Leal *et al.* (2015) no Rio de Janeiro-RJ (78%). Todavia, o percentual é superior ao encontrado por Anjos *et al.* (2012) em Campo Grande-MS (5,94%) e Silva *et al.* (2012b) em Jataizinho-PR (19,4%).

Foram encontradas formas intraeritrocíticas de *Babesia* spp. observadas em 22,5% das amostras positivas. Este percentual é maior do que o encontrado por Mundim *et al.* (2008) em Anápolis-GO (11,11%), Silva *et al.* (2014) em Abadia de Dourados-MG (1,6%), Leal *et al.* (2015) no Rio de Janeiro-RJ (10,6%), Rotondano *et al.* (2015) em Patos-PB (2%) e Carvalho *et al.* (2018) em Teresina-Piauí (3,3%). No entanto, é menor do que o encontrado por Antunes *et al.* (2015) em Campo Grande-MS (30%).

*Mycoplasma haemocanis* esteve presente em 11,67% das amostras positivas, sendo menor do que o observado por Mundim *et al.* (2008) em Anápolis-GO (27,78%) e Leal *et al.* (2015) no Rio de Janeiro-RJ (45,5%). Todavia, o achado do presente estudo foi maior do que o encontrado por Valle *et al.* (2014) em Passo Fundo-RS (5,1%) e por Soares *et al.* (2016) em Campo Grande-MS (4,25%), sendo que em ambos foi utilizada a PCR como método de diagnóstico.

Em 4,17% das amostras positivas foi observada a presença de gamontes de *Hepatozoon* spp., sendo menor do que o encontrado por Mundim *et al.* (2008) em Anápolis-GO (5,56%) e que Silva *et al.* (2014) em Abadia de Dourados-MG (24%).

Nenhuma das variáveis analisadas se mostrou estatisticamente associada à positividade para hemoparasitos, possivelmente devido ao pequeno número amostral utilizado no levantamento de prontuários (Tabela 3).

**Tabela 3.** Variáveis relacionadas a positividade para hemoparasitos encontrados em caninos no município de Araguaína (Tocantins) no ano de 2017.

Variável	Sub-variável	Variáveis				Valor-P
		N	+ (%)	Odds Ratio	IC (95%)	
Sexo	Macho	104	82 (78,85%)	1,662	0,7828-3,505	0,2443
	Fêmea	55	38 (69,09%)			
Idade	< 1 ano	24	15 (62,50%)	0,4787	0,1901-1,248	0,1787
	> 1 ano	135	105 (77,78%)			

## Conclusões

O estudo demonstrou a circulação de hemoparasitos em espécimes caninos no município de Araguaína.

A comprovação da circulação sugere que os Médicos Veterinários da especialidade de Pequenos Animais devem levar em consideração a presença de hemoparasitos diante de uma suspeita clínica.

Recomenda-se a aplicação do diagnóstico complementar que pode ser pela leitura de esfregaço sanguíneo, ou ainda por meio do diagnóstico sorológico ou molecular, o que permitirá ao clínico administrar o princípio ativo mais adequado para o tratamento do animal acometido por hemoparasitose, e assim obter resultados mais satisfatórios para o restabelecimento da saúde dos pacientes caninos.

## Referências

Almeida ABPF, Paula DAJ, Dutra V, Nakazato L, Mendonça AJ, Sousa VRF 2010. Infection with *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* in bitches and puppies in the Cuiabá, Mato Grosso. *Archives of Veterinary Science*, 15 (3): 127-134.

- Anjos DS, Metzendorf IP, Marques BC, Babo-Terra VJ 2012. Alterações hematológicas de cães naturalmente infectados por membros da família Anaplasmataceae diagnosticados pelo esfregaço de sangue periférico. *Pubvet*, 6 (20): 1381-1386.
- Antunes TR, Valençola RA, Sorgatto S, Oliveira BB, Godoy CS, Souza AI 2015. Hematological and epidemiological aspects of dogs naturally infected with *Hepatozoon* sp. in the municipality of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Acta Veterinaria Brasilica*, 9 (3): 234-238.
- Carvalho SMR, Amorim WR, SA MV, Oliveira IS, Sá IS, Galeno LS, Oliveira RP, Benvenuti MEM, Farias MPO, Machado Júnior AAN 2018. Pesquisa de *Babesia* spp. e *Ehrlichia* spp. em cães assintomáticos, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Piauí. *Pubvet*, 12 (1): 1-8.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) 2018. National Center for Health Statistics. Epi-Info 7. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention, 2018 [on line]. United States of America. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/epiinfo/index.html> > Acesso em: 18 may. 2018
- Dória RGS, Passarelli D, Chequer TN, Reginato GM, Hayasaka YB, Fantinato Neto P, Grigoletto R, Freitas SH 2016. Investigação clínica e comparação do esfregaço sanguíneo e PCR para diagnóstico de hemoparasitas em equinos de esporte e tração (carroceiros). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 36 (8): 724-730.
- Harvey TV, Veloso JF, Santos MR, Assunção MS., Sauer L, Guedes PEB, Oliveira TNA, Albuquerque GR, Silva FL, Munhoz AD, Carlos RSA 2017. *Babesia* spp. and *Ehrlichia chaffeensis* infection in Dogs from Southeastern Bahia, Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae*, 45 (1): 1-9.
- Honório TGAF, Araújo EKD, Lima LTR, Silva MG, Fonseca APB, Costa SDP, Souza Neto JB 2017. Infecção por *Hepatozoon* sp. em canino doméstico: Relato de caso. *Pubvet*, 11 (3): 272-275.
- Leal PDS, Moraes MIMR Barbosa LLO, Lopes CWG. 2015. Infecção por hematozoários nos cães domésticos atendidos em serviço de saúde animal, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 37 (supp.1): 55-62.
- Makino H, Sousa VRF, Fujimori M, Rodrigues JY, Dias FLR, Dutra V, Nakazato L, Almeida ABPF 2016. *Ehrlichia canis* detection in dogs from Várzea Grande: a comparative analysis of blood and bone marrow samples. *Ciência Rural*, 46 (2): 310-314.
- Mundim ECDS, Francisco MMDS, Souza JN. Alencar MAG, Ramalho PCD 2008. Incidência de hemoparasitoses em cães (*Canis familiaris*) de rua capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade de Anápolis-GO. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*, 12 (2):107-115.
- Ribeiro CM, Matos AC, Azzolini T, Bones ER, Wasnieski EA, Richini-Pereira VB, Lucheis SB, Vidotto O 2017. Molecular epidemiology of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in stray dogs in Paraná, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37 (2): 129-136.
- Rotondano TED, Almeida HKA Krawczak FS, Santana VL, Vidal IF, Labruna MB, Melo MAD 2015. Survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. in dogs from a semiarid region of Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 24 (1): 52-58.
- Silva AB, Costa AP, Sá JC, Costa FB, Santos ACG, Guerra RMSNC 2012a. Detecção molecular de *Babesia canis vogeli* em cães e em *Rhipicephalus sanguineus* na Mesorregião do Oeste Maranhense, Nordeste Brasileiro. *Ciência Animal Brasileira*, 13 (3): 388-395.
- Silva GCFD, Benitez ADN, Giroto A, Taroda A, Vidotto MC, Garcia JL, Vidotto O 2012b. Occurrence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in household dogs from northern Parana. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21 (4):379-385.
- Silva MCA, Mundim AV, Mendonça GA, Mundim MJS, Guimarães EC 2014. Hemoparasitos em cães domésticos naturalmente infectados, provenientes das zonas urbana e rural do município de Abadia dos Dourados, Minas Gerais, Brasil. *Bioscience Journal*, 30(5): 892-900.
- Soares RL, Echeverria JT, Pazzuti G, Cleveland HPK, Babo-Terra VJ. Friozi E, Ramos CAN 2016. Occurrence of *Mycoplasma haemocanis* in dogs infested by ticks in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 25 (3): 359-363.
- Sousa VRF, Almeida ABP, Barros LA, Sales KG, Justino CHS, Dalcin L, Bomfim TCB 2010. Clinical and molecular evaluation of dogs with ehrlichiosis. *Ciência Rural*, 40 (6): 1309-1313.
- Thrall MA, Weiser G, Allison RW, Campbell TW 2015. Hematologia e bioquímica clínica veterinária. Editora Roca, São Paulo, 688 p.
- Ueno TE, Aguiar DM, Pacheco RC, Richtzenhain LJ, Ribeiro MG, Paes AC, Labruna MB 2009. *Ehrlichia canis* em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18 (3): 57-61.
- Valle SF, Messick JB, Dos Santos AP, Kreutz LC, Duda NCB, Machado G, González FHD 2014. Identification, occurrence and clinical findings of canine hemoplasmas in southern Brazil. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 37 (4): 259- 265.

## Controle do *Rhipicephalus microplus* com *Metarhizium* sp. da região Amazônica

Luiza Catharina Martins<sup>1</sup>, Atilon Vasconcelos de Araújo<sup>2</sup>, Clarice Maia Carvalho<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Rede em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil

<sup>3</sup> Centro de Ciências Biológicas e da Natureza da Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil  
Emails: luizacatharina.martins@gmail.com atilon.vasconcelos@gmail.com

### Resumo

O carrapato da espécie *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) é um ectoparasita hematófago obrigatório e específico de bovinos. Infestações por esse parasito refletem em perdas econômicas pela queda na produtividade que normalmente se relaciona à transmissão de hemoparasitoses por esse vetor. Acaricidas químicos sintéticos são a principal medida de controle nas infestações. No entanto, esses acaricidas não possuem a mesma efetividade de quando foram primeiramente desenvolvidos devido ao seu uso indiscriminado e extensivo. Assim, o controle biológico se tornou uma alternativa promissora. Objetivou-se avaliar a mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* após imersão em solução acaricida contendo conídios de *Metarhizium* sp. Foram isolados fungos de solos de propriedades rurais utilizando o meio CTC (BDA - Batata, Dextrose e Ágar, suplementado com Cloranfenicol, Tiabendazol e Ciclohexamida) e um isolado foi selecionado para o tratamento. Para a obtenção das larvas foram coletadas fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* de bovinos naturalmente infectados, a oviposição e eclosão dos ovos ocorreu *in vitro*. O bioensaio foi realizado com quatro grupos de diluições da solução nas concentrações de 105, 106, 107 e 108 conídios/ml, sendo cada grupo constituído por cinco tubos de ensaio contendo 50g de larvas do carrapato. Durante 21 dias a taxa de mortalidade foi observada com o auxílio de um Microscópio Estereoscópico com aumento de 10x. As médias em porcentagem das taxas de mortalidade em 21 dias de tratamento para cada diluição foram: 105 = 36 %; 106 = 52 %; 107 = 46 % e 108 = 100 %. Concluiu-se que as larvas de *Rhipicephalus microplus* são susceptíveis ao fungo *Metarhizium* sp. isolado do solo amazônico e que sua virulência é diretamente proporcional a concentração de conídios na solução.

**Palavras chaves:** Biocontrole, artropodopatogênico, virulência.

### Introdução

O carrapato da espécie *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) é um ectoparasita hematófago obrigatório e específico de bovinos. Sua importância se dá na pecuária e na medicina veterinária por ser o principal vetor de microrganismos patogênicos podendo refletir no desenvolvimento de hemoparasitoses gerando grandes perdas econômicas pela queda da produtividade. Além disso, os animais encontram-se em frequente irritação pelo incomodo da adesão dos parasitos na pele. Dependendo da carga parasitaria também ocorrem perdas sanguíneas e uma queda na atividade imunológica do animal e o mesmo acaba ficando susceptível ao desenvolvimento de outras doenças infecciosas (Ren *et al.*, 2012; Abbas *et al.*, 2014).

Comumente a medida de controle para infestações desse ectoparasito é através do uso de acaricidas químicos sintéticos. Porém, esses acaricidas não possuem mais a mesma efetividade de quando foram primeiramente desenvolvidos devido ao seu uso incorreto e indiscriminado ao longo do tempo, tornando assim, muitos grupos de carrapatos resistentes a diversas substâncias utilizadas na sua composição. No Brasil, já foram registradas resistências a inúmeras substâncias acaricidas a base de formamidas, amitraz e avermectinas. Além disto, o uso inconsciente desses acaricidas demonstram problemas para a saúde pública, pois já foram encontradas evidencias de resíduos desses produtos em leite e carne (Abbas *et al.*, 2014; Carneiro *et al.*, 2015; Banumathi *et al.*, 2017).

Diante disso o controle biológico se tornou uma alternativa para substituir esses acaricidas químicos. Através da expansão da pesquisa sobre o controle biológico de pragas já foi possível constatar que o mesmo atribui um baixíssimo risco para a saúde humana e animal, menor custo de desenvolvimento e uma alta virulência e efetividade além de ser mais seguro para o ambiente (Ren *et al.*, 2012).

Fungos entomopatogênicos como *Metarhizium* sp. possuem grande credibilidade por serem encontrados em grande quantidade e diversidade nos mais diferentes solos em diversas localidades ao redor do mundo. Não ocorre permanência de resíduos no produto de origem animal e até então não há o desenvolvimento de resistência aos pesticidas formulados (Butt *et al.*, 2016).

Apesar deste potencial promissor, estudos que avaliem a diversidade de fungos entomopatogênicos da Região Amazônica para o controle de pragas ainda são limitados, sendo fundamental a realização de pesquisas nesta área para a obtenção de novos isolados com potencial para serem utilizados como agentes na formulação de microacaricidas cada vez mais eficientes (Fernandes *et al.*, 2011). O objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade de fungos com potencial entomopatogênico de solos Amazônicos e selecionar um fungo do gênero *Metarhizium* sp. para o bioensaio de controle de larvas do carrapato *Rhipicephalus microplus*.

## Material e Métodos

Foram coletadas dez amostras de solo (30g) de dez propriedades rurais distintas para o isolamento dos fungos com potencial patogênico para pragas. As propriedades foram escolhidas aleatoriamente, mas todas possuem criação de gado leiteiro e se localizam na cidade de Rio Branco, Acre, Brasil. Todo o experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia na Universidade Federal do Acre – UFAC.

O método de isolamento escolhido foi o da técnica de diluição seriada. Para a diluição, 2g da amostra foi adicionado em 18mL de solução NaCl 0,9%, previamente esterilizada, e submetido a rotações na velocidade de 120 rpm na temperatura de 28 °C durante 60 minutos em um mixer eletrônico. Após essa homogeneização, uma alíquota de 1 mL desta suspensão foi extraída e depositada em 9 mL de solução NaCl 0,9% para então ser produzida uma suspensão na concentração de  $10^{-1}$  (Bills *et al.*, 2004).

Uma alíquota de 200  $\mu$ L da solução  $10^{-1}$  foi colocada em uma placa de Petri com meio CTC (BDA - Batata, Dextrose e Ágar, suplementado com Cloranfenicol, Tiabendazol e Ciclohexamida), que é um meio seletivo para fungos entomopatogênicos. A placa foi incubada a uma temperatura de  $28 \pm 1$  °C e observada diariamente por até 15 dias. Esse processo foi realizado para cada amostra de solo (Fernandes *et al.*, 2010).

Os fungos que apresentaram crescimento micelial significativo na placa contendo CTC foram repicados em tubos de ensaio contendo meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar) visando seu melhor crescimento. Após o crescimento, foram guardados em óleo mineral, como descrito por Buell e Weston (1947) e em água destilada seguindo toda a técnica de conservação desenvolvida por Castellani (1963) e armazenados na coleção do laboratório. Para a identificação foi utilizada a técnica de microcultivo em lâmina, sendo comparadas as estruturas microscópicas observadas com a literatura específica (Barnett e Hunter, 1998).

Para o bioensaio, fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram coletadas manualmente de bovinos naturalmente infectados e levadas ao laboratório onde foram superficialmente desinfetadas em hipoclorito a 1% durante 3 minutos e depois incubadas a uma temperatura de  $27 \pm 1$  °C com  $\geq 80\%$  de umidade relativa. Após o início da oviposição, alíquotas de 50 mg de ovos foram depositadas em tubos de ensaio previamente esterilizados e novamente incubados a temperatura de  $27 \pm 1$  °C com  $\geq 80\%$  de umidade relativa para eclodirem (Fernandes *et al.*, 2011).

O isolado de *Metarhizium* sp. (4.539) selecionado para o bioensaio foi repicado em placa de Petri contendo BDA e incubado durante 15 dias a temperatura de 28 °C. Os conídios do isolado fúngico foram coletados e suspensos em solução de Água Destilada Estéril e Tween 80 (0,01%) e quantificados com auxílio de câmara de Neubauer em Microscópio Óptico para produção da suspensão de 108 conídios/mL sendo realizada diluição seriada para obtenção das concentrações 105, 106 e 107 conídios/mL (Alves, 1998).

O bioensaio foi realizado com quatro grupos tratados com as diluições nas concentrações 105, 106, 107 e 108 conídios/mL, sendo cada grupo constituído por 5 tubos de ensaio contendo larvas de *R. microplus*. 1 mL das suspensões foram injetadas dentro dos tubos usando uma seringa hipodérmica inserida entre a parede do tubo de ensaio e o tampão de algodão. As larvas ficaram imersas ao inóculo durante 3 minutos e após esse período os tubos foram invertidos até a suspensão de conídios ser absorvida pelo tampão de algodão, e então foram novamente armazenados, em câmara úmida, a temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 80\%$  (Alves, 1998).

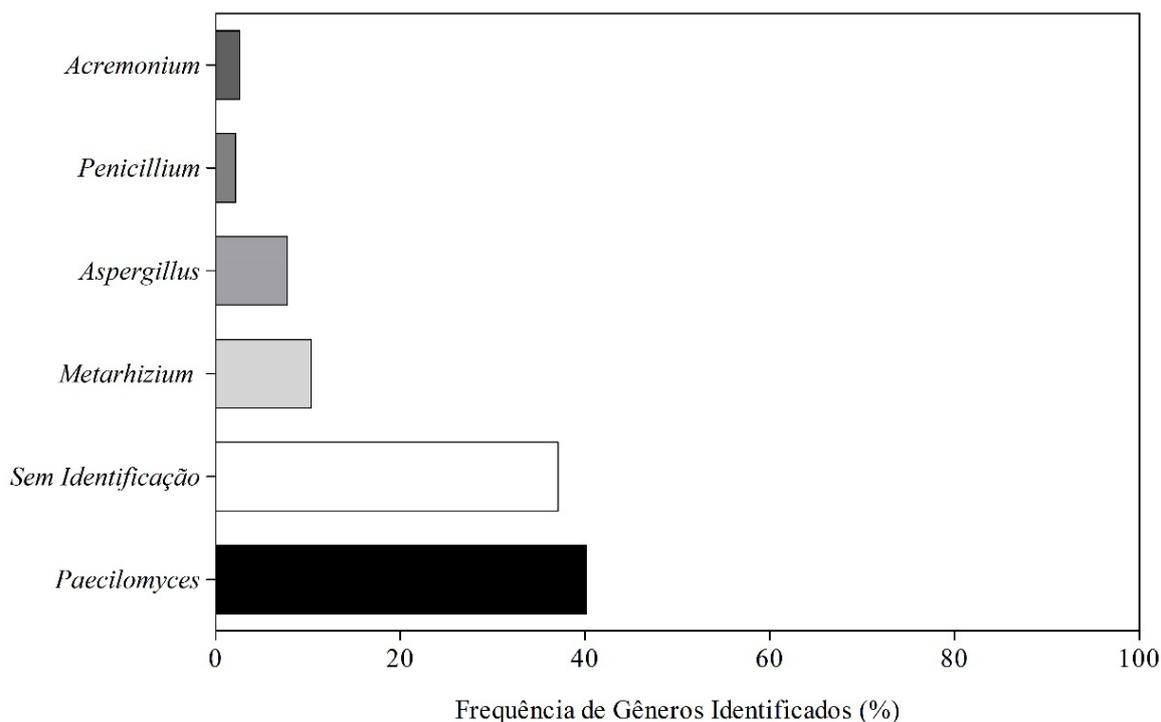
As larvas foram inspecionadas em Microscópio Estereoscópio com aumento de 10x a cada cinco dias durante 21 dias comparando a quantidade de larvas mortas e larvas vivas dos tubos, então assim foi atribuído uma porcentagem de mortalidade para cada tubo de cada diluição. Para a avaliação dos dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal Wallis, seguido do Student-Newman-Keuls (SNK) para comparação entre as ordenações médias com auxílio do programa BioEstat 5.3® (Fernandes *et al.*, 2011).

## Resultados e Discussão

Foram isolados 232 fungos das 10 propriedades das quais foram coletadas as amostras de solo. Foram identificados 141 fungos dos seguintes gêneros: *Acremonium* (2,59%), *Aspergillus* (7,76%), *Metarhizium* (10,34%), *Paecilomyces* (40,09%) e *Penicillium* (2,16%) (Figura 1). Além disso, 40% dos fungos isolados permaneceram sem identificação e então foi selecionado aleatoriamente o isolado de *Metarhizium* sp. de número de identificação 4.539 para a realização do experimento.

Foi registrado que no bioensaio a utilização da diluição 108 conídios/mL permitiu o controle de 97,6% no 16º dia e 100% no 21º dia pós tratamento das larvas de *R. microplus* (Tabela 1). O grupo controle em relação à diluição 105 não mostrou diferença estaticamente após os 21 dias de tratamento.

Foi registrado índice de mortalidade de 100% das larvas no 21º dia de tratamento, indicando diferença entre os tratamentos e o grupo controle a partir do 11º dia de tratamento (Figura 2).

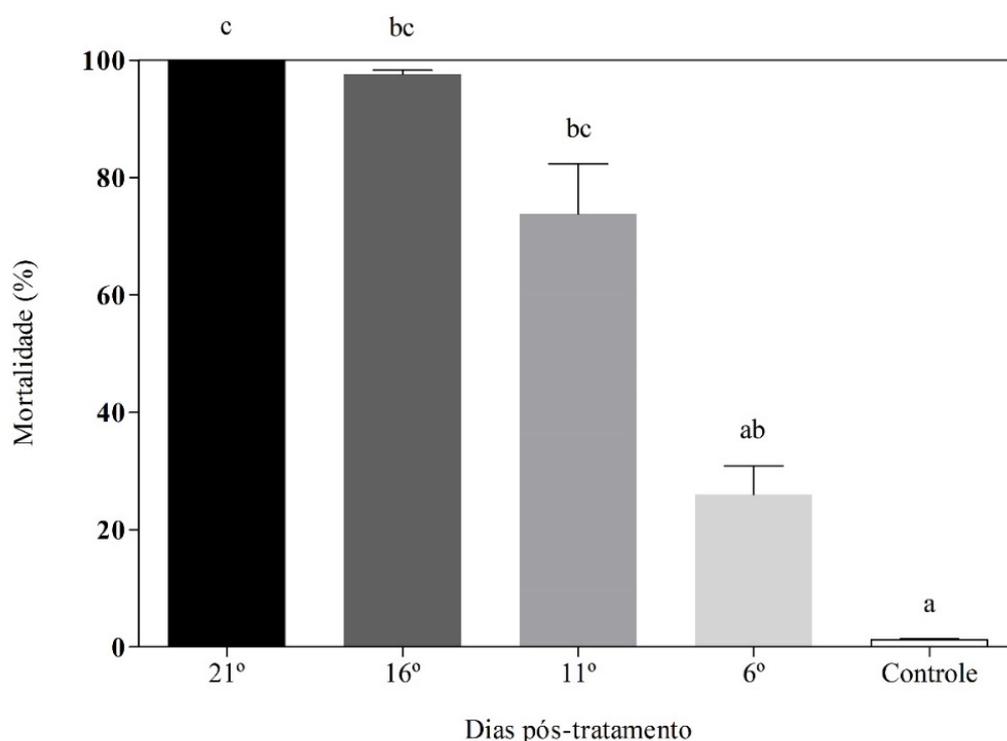


**Figura 1.** Frequência de Gêneros fúngicos nas amostras de solos de Fazendas na Região Amazônica.

**Tabela 1.** Percentual de mortalidade (média e desvio padrão) dos grupos tratados em diferentes dias de tratamento frente as diferentes concentrações de conídios na solução.

Dias de tratamento	Controle	Concentrações			
		10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>
6º	0 ±0a	1,4 ±0,55a	2,4 ±1,52a	6 ±2,24ab	26 ±10,84b
11º	0 ±0a	18 ±4,47b	19 ±2,24b	22 ±7,58b	73,8 ±19,16c
16º	0 ±0a	36 ±16,73ab	48 ±13,04bc	46 ±15,17b	97,6 ±1,52c
21º	1,2 ±0,45a	36 ±16,73ab	52 ±13,04bc	46 ±15,17b	100 ±0c

Obs.: Letras iguais seguidas na mesma linha não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

**Figura 2.** Mortalidade média (%) das larvas *R. microplus* nos diferentes dias pós-tratamento com a suspensão fúngica na concentração de conídios 10<sup>8</sup>.

Fungos entomopatogênicos quando não encontram um hospedeiro, seus propágulos permanecem no solo por ser um ambiente estável para eles. A ocorrência abundante ou não ocorrência, e a persistência de diferentes fungos no solo pode ser explicada por fatores ambientais relacionados ao solo como a temperatura, umidade do solo, pH e quantidade de matéria orgânica presente (Zanardo, 2015).

Foi isolada uma quantidade significativa de fungos potencialmente patogênicos para artrópodes, tanto os que foram identificados como os que não puderam ser identificados pela técnica de microcultivo em lâmina. Segundo Pylro *et al.* (2014) a Região Amazônica abriga uma grande diversidade de microrganismos com potencial biotecnológico. Os solos desta região apresentam características distintas, como composição química e biológica como descrito por Mendes *et al.* (2015), o que explicaria a variação entre o número de isolados do gênero *Paecilomyces* em relação aos outros gêneros identificados.

O bioensaio foi realizado sem nenhuma dificuldade significativa após a identificação e guarda dos isolados. Na primeira avaliação dos resultados, pode-se notar que o grupo controle começou a diferir estatisticamente na diluição de 10<sup>5</sup> partir do 11º dia de tratamento. Enquanto o grupo controle obteve uma taxa de mortalidade de 1,2% ao final do tratamento, as taxas de mortalidade dos grupos que receberam o tratamento com *Metarhizium sp.* tiveram uma taxa de mortalidade que variou de 36% a 100%.

O aumento crescente da taxa de mortalidade comprova que naturalmente a virulência está relacionada à concentração conidial da solução. É importante destacar que a diluição de 106 se mostrou com uma taxa de mortalidade maior que a de 107 ao final do tratamento, isso ocorreu provavelmente por um único tubo do grupo da concentração 106 que apresentou maior mortalidade do que todos os outros tubos do grupo. Logo, a hipótese citada não pode ser descartada.

No 21º dia de tratamento a diluição na concentração 108 apresentou uma média de taxa de mortalidade de 100%. De acordo com o trabalho de Arieiro (2017) mostrou-se que em até 15 dias já era observado taxas de 100% de mortalidade por uma espécie de *Metarhizium* na mesma concentração de conídios. Por isso é importante ressaltar que diferentes cepas de determinada espécie apresentam patogenicidade e virulência distintas (Fernandes *et al.*, 2011), sendo fundamental estudos que realizem a seleção desses microrganismos da natureza.

## Conclusões

Foi isolada uma grande quantidade de fungos em meio seletivo para entomopatógenos, indicando o potencial de solos da Região Amazônica para o estudo e seleção de novos microrganismos com potencial para o controle biológico.

Foi registrada maior frequência dos gêneros *Paecilomyces* sp., seguido por *Metarhizium* sp., ambos frequentemente indicados para o controle de pragas. Além disso, 40,09% dos isolados não foram identificados sugerindo a oportunidade de identificação de novas espécies.

Nos ensaios biológicos, as larvas de *Rhipicephalus microplus* foram susceptíveis ao isolado de *Metarhizium* sp. comprovando o seu potencial entomopatogênico. A virulência deste isolado foi diretamente proporcional a concentração de conídios na solução, a qual a concentração de 10<sup>8</sup> se mostrou mais eficiente para o controle dos carrapatos, tendo influência dos dias de tratamento, com resultados significativos a partir do 7º dia de tratamento.

## Referências

- Abbas R, Zaman MA, Colwell DD, Gilleard J, Iqbal Z 2014. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. *Veterinary Parasitology*, 203(1–2):6–20.
- Alves S 1998. *Controle Microbiano de Insetos*. 2 ed. Piracicaba: FEALQ.
- Arieiro G 2017. *Seleção de isolados de Metarhizium spp. para o ensaios in vitro da virulência e conidiogênese*.
- Banumathi B, Vaseeharan B, Rajasekar P, Prabhu NM. *et al.* 2017. Exploitation of chemical, herbal and nanoformulated acaricides to control the cattle tick, *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus*- A review. *Veterinary Parasitology*, 244: DOI: 10.1016/j.vetpar.2017.07.021
- Barnett H, Hunter B 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4 ed. New York: Macmillan.
- Bills G, Christensen M, Powell M, Thorn G 2004. *Biodiversity of Fungi*. 1ed. Burlington: Academic Press.
- Buell C, Weston W 1947. Application of the mineral oil conservation method to maintaining collections of fungous cultures. *American Journal of Botany*, v. 34, n. 10, p. 555-561.
- Butt TM, Coats CJ, Dubovskiy I, Ratcliffe NA 2016. *Entomopathogenic Fungi : New Insights into Host e Pathogen Interactions*. In: Lovett B, Leger RJS (Eds) [s.l.] Elsevier Ltd, p. 307-365..
- Carneiro C 2015. *Diagnosis of the Control and Efficacy of Acaricides to Bovine Tick in the Semiarid of North of Minas Gerais*.
- Castellani A 1963. The water cultivation of pathogenic fungi. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 66, p. 283-4.
- Fernandes, ÉKK, Keyser CA, Rangel DEN, Foster RN, Roberts DW 2010. CTC medium: A novel dodine-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. *Biological Control*, 54(3):197–205.
- Fernandes, ÉK, Angelo IC, Rangel DE, Bahiense TC, Moraes AM, Roberts DW, Bittencourt VR 2011. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 182(2–4):307–318.

- Mendes LW, Brossi MJL, Kuramae E, Tsai SM 2015. Land-use system shapes soil bacterial communities in Southeastern Amazon region. *Applied Soil Ecology*, 95:151-160.
- Pylro V *et al.* 2014. Brazilian Microbiome Project: revealing the unexplored microbial diversity--challenges and prospects. *Microbial Ecology*, 67(2):237-41.
- Ren Q, Liu Z, Guan G, Sun M, Ma M, Niu Q, Li Y, Liu A, Liu J, Yang J, Yin H, Luo J 2012. Laboratory evaluation of virulence of Chinese *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to engorged female *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks. *Biological Control*, 63(2):98-101.
- Zanardo ABR 2015. *Abundância de fungos entomopatogênicos da ordem Hypocreales e diversidade genética de Metarhizium spp. isolados de amostras de solo de áreas representativas de cinco biomas brasileiros. Tese, USP, ESA Luiz de Queiroz, 154p. 153.*

## Avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida do extrato do fungo *Aspergillus fumigatus*

Rêgila Mello do Nascimento<sup>1</sup>, Tarcila de Araújo Alves<sup>2</sup>, João Vicente Braga de Souza<sup>3</sup>, Flávia Regina Almeida-Campos<sup>4</sup>, Liliane Coelho da Rocha<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Graduada, Universidade do Estado do Amazonas-ENS/UEA

<sup>2</sup> PG Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas

<sup>3</sup> Pesquisador, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

<sup>4</sup> Pesquisadora, Universidade Federal do Amazonas, <sup>5</sup> Pesquisadora, Universidade do Estado do Amazonas  
Emails: regilamn@gmail.com, lcrocha@uea.edu.br

### Resumo

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença tropical, considerada negligenciada, causada por cerca de 20 espécies de parasito do gênero *Leishmania*, pertencente à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida. O Brasil é o país da América com elevado número de casos de leishmaniose, em 2016, foram registrados 12.690 casos, com destaque para região Norte com 5.075 casos. São poucos os fármacos utilizados para tratamento desta doença, porém, estes causam um elevado nível de toxicidade e efeitos colaterais no paciente. Na busca por novas formas terapêuticas com atividade leishmanicida, foi realizado testes *in vitro* utilizando extrato do fungo *Aspergillus fumigatus*, contra a forma promastigotas de *L. guyanensis* e *L. amazonensis*. O extrato fúngico foi obtido através de bioprocesso utilizando Caldo de Batata Dextrose. Os parasitos foram cultivados em RPMI completo suplementado a 10% de soro bovino fetal (SFB). A atividade leishmanicida foi avaliada no período de 24, 48 e 72 horas na concentração de 750 µg/mL à 125 µg/mL do extrato, estudadas em comparação com o Glucantime®. Os resultados demonstraram que o extrato de *A. fumigatus* apresenta atividade contra *L. guyanensis* (IC<sub>50</sub> 65,46x10<sup>-1</sup>µg/mL) após 72 horas de incubação.

**Palavras-chave:** Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), Fármacos, *L. guyanensis*

### Introdução

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença tropical, considerada negligenciada, causada por cerca de 20 espécies de parasito do gênero *Leishmania*, pertencente à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida. Com ciclo de vida heteroxênico, o protozoário alterna seu ciclo de vida entre hospedeiros vertebrados e invertebrados, chegando a afetar mundialmente, mais de 15 milhões de pessoas com alta morbidade e mortalidade em populações da América, Ásia, África, Europa e Oceania (Jensen *et al.*, 2017; Soriano, 2017).

A transmissão da doença ocorre por insetos dípteros do gênero *Lutzomyia* (nas Américas). A fêmea deste vetor suga o sangue do hospedeiro infectado e adquire a forma amastigota, que irá sofrer transformação ao longo do intestino do vetor transformando-se em promastigotas metacíclicas, forma infectante para o hospedeiro vertebrado. Ao fazer um novo repasto sanguíneo, o inseto transmite ao hospedeiro não infectado as formas promastigotas, que irão se diferenciar em amastigotas no lisossomo e desencadear o aparecimento de sintomas da doença (Abdossamadi *et al.*, 2016).

O gênero *Leishmania* na LTA pode apresentar diferentes formas clínicas, dependendo da espécie envolvida e da relação parasito-hospedeiro, podendo ser classificadas em Leishmaniose cutânea (LC) e Leishmaniose mucosa (LM). As principais espécies de LC no Brasil são *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*. Na LM, a *L. braziliensis* é a principal espécie associada a esta forma clínica, mas estudos recentes mostram que a espécie *L. guyanensis* pode ser também o agente etiológico para L. M. (Lima, 2017).

O Brasil é um país com elevado número de casos de leishmaniose. Em 2016 foram registrados 12.690 casos, com destaque para a região Norte com 5.075, seguida da região Nordeste com 3.166 e da região

Centro-Oeste com 1.974 dos casos (SINAN/SVS/MS, 2017). Em 2016, os municípios de Rio Preto da Eva, Presidente Figueiredo, junto à Manaus, foram responsáveis por 468 casos de 922, registrados no Estado (Amazonas, 2017), ocupando o segundo lugar entre as infecções por protozoários que acometem humanos, perdendo apenas para a Malária. O padrão de transmissão da doença neste estado mudou; inicialmente, acometia pessoas em contato com a floresta, hoje, verifica-se ocorrência em zonas rurais, praticamente desmatadas e em regiões periurbanas (Jensen *et al.*, 2017).

Mesmo com o elevado número de casos registrados no Brasil, poucos são os fármacos utilizados para o tratamento da leishmaniose. O antimonato de N-metilglucamina (Glucantime®) é considerado pelo Ministério da Saúde o medicamento de primeira escolha, anfotericina B e pentamidina como segunda escolha (Brasil, 2017). Existem vários problemas relacionados a esse arsenal terapêutico, como efeitos colaterais, toxicidade, administração parental, o que leva, muitas vezes, ao abandono do tratamento e aumento de linhagens resistentes ao antibiótico, dificultando o controle da doença (Wyrepkowski, 2015; Abdossamadi *et al.*, 2016).

Por ser considerada uma doença negligenciada, poucos são os investimentos de indústrias farmacêuticas frente às pesquisas de novos protótipos com atividades leishmanicida. Apesar da escassez de investimento, uma das fontes biológicas mais estudadas em busca de formas terapêuticas para o tratamento da leishmaniose são as plantas e os fungos por produzirem metabólitos secundários de interesse biotecnológico e farmacêutico, como os estudos de Costa *et al.*, (2009), Monzote *et al.* (2010) e Campos *et al.* (2015)

Os fungos são microrganismos eucariontes de grande importância para o ecossistema, além de serem responsáveis por uma gama de metabólitos primário e secundário que são utilizados em diferentes áreas. O fungo *Aspergillus fumigatus* pertence à Família Trichocomaceae, filo Ascomycota, possui uma ampla distribuição na natureza, podendo ser isolados de diversos substratos orgânicos. Além disso, possuiu um importante papel na reciclagem de carbono e nitrogênio. É considerado um fungo patogênico causador da aspergilose, doença prevalente principalmente em indivíduos imunocomprometidos. No entanto, estudos voltados para compostos bioativos têm demonstrado que este fungo, quando isolado de plantas, possui um potencial biológico antifúngico (Liu *et al.*, 2004) e antibacteriano (Carvalho, 2010; Silva *et al.*, 2018).

Na perspectiva de se obter novas formas terapêuticas para o tratamento da leishmaniose, e sabendo da necessidade de se explorar as diversas formas de isolamento do fungo *A. fumigatus*, esta pesquisa teve como objetivo avaliar *in vitro* a atividade leishmanicida de substâncias produzidas pelo fungo *Aspergillus fumigatus* isolado de amostra do solo da Região Amazônica contra *Leishmania guyanensis* e *Leishmania amazonensis*.

## Material e Métodos

Na presente pesquisa, foram realizados testes *in vitro* utilizando filtrado da cultura do fungo *A. fumigatus*. A atividade das substâncias presentes nesse filtrado foi estudada em comparação com Glucantime®, fármaco de primeira escolha para o tratamento da Leishmaniose.

O fungo *A. fumigatus* (LM6020) utilizado no estudo foi cedido pela coleção de microrganismos de interesse médico do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. O bioprocessamento para a produção do antimicrobiano foi realizado em Erlenmeyers (150 mL) contendo 50 mL de Caldo de Batata Dextrose (120 g/L de batata, 10 g/L de dextrose). Nesse meio foi inoculada uma concentração de  $1 \times 10^4$  esporos/mL da espécie de fungo a ser investigado e incubado por 14 dias, sob agitação orbital (100 rpm) a 25°C. Após esse período, a biomassa foi separada por filtração (filtro qualitativo tipo celulose Whatman n.4). O filtrado foi esterilizado por microfiltração a 0,22 µm (Millipore®) e submetido à liofilização. A amostra liofilizada foi pesada e armazenada na geladeira a 4°C para ser submetida à determinação da atividade leishmanicida.

Foram utilizadas as cepas de *Leishmania guyanensis* MHOM/BR/75/M4147 e *Leishmania amazonensis* IFLA/BR/67/PH8, cedidas pela Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado – FMT/HVD. Seguindo o protocolo de Jaffe *et al.*, (1984), as espécies utilizadas para o bioensaio foram cultivadas em garrafas de cultura contendo meio RPMI 1640 (Himedia) completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativo (SFBI), armazenadas em estufa a 25°C.

Para a avaliação do crescimento das formas promastigotas de *Leishmania* sp., foi utilizado o protocolo de Silva (2008), com modificações. Os Parasitos foram cultivados em frascos de cultivo celular contendo meio RPMI completo na concentração de  $1 \times 10^6$  parasitos/mL, incubados a  $25^\circ\text{C}$  por 10 dias com volume total de 10 mL. A cada 24 horas foi retirada uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  da amostra, diluída (1:1000) em solução salina e corada com o corante azul de tripan para contagem em câmara de Neubauer com o auxílio de microscópio óptico em aumento de 400x. Para os estudos, foram utilizadas as formas promastigotas axênicas para determinar a fase logarítmica e estacionária do crescimento. A média aritmética e o desvio padrão foram utilizados para gerar a curva no programa Excel® (Microsoft).

A atividade leishmanicida dos extratos de *Aspergillus fumigatus* foi avaliada pela inibição do crescimento e mortalidade das formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. Antes de cada experimento, foi observada a motilidade flagelar e a morfologia dos parasitos com o auxílio de microscópio invertido.

Para a realização do bioensaio, as formas promastigotas foram centrifugadas a 4.400 rpm por 15 minutos, lavadas em solução salina esterilizada, diluídas e quantificadas em câmara de Neubauer, sendo ajustadas para a obtenção da concentração parasitária de  $1,5 \times 10^6$  células/mL utilizando uma calculadora de diluição celular (Fumarola *et al.*, 2004)

A amostra do fungo *Aspergillus fumigatus* foi diluída em 3mL de meio RPMI e filtrado em membrana de Millipore® 0,22  $\mu\text{m}$  em ambiente esterilizado. Os extratos foram avaliados nas concentrações de 750  $\mu\text{g/mL}$ , 500  $\mu\text{g/mL}$ , 250  $\mu\text{g/mL}$  e 125  $\mu\text{g/mL}$ . O controle negativo foi constituído de RPMI completo e o controle positivo foi utilizado glucantime® na concentração de 30  $\mu\text{g/mL}$ .

A atividade dos extratos foi avaliada pela inibição do crescimento e mortalidade de promastigotas de *L. guyanensis* e *L. amazonensis* após adição de diferentes concentrações do extrato na presença de  $1 \times 10^6$  célula/mL e após incubação em estufa a  $25^\circ\text{C}$ . O bioensaio e a contagem dos parasitos foi realizada em triplicata no período de 24, 48 e 72 horas.

Para a contagem dos parasitos, foi retirada de cada tubo uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  da amostra, diluída e quantificada em câmara de Neubauer com auxílio do corante azul de Tripan (Cascade Biological TM -USA) em microscópio óptico, aumento de 400 vezes. Foi retirada a porcentagem, média e desvio padrão do número de parasitos vivos e mortos. Os valores encontrados foram utilizados para cálculo da concentração inibitória de 50% dos parasitos ( $CI_{50}$ ) a partir do cálculo da reta obtido pelo gráfico da média de indivíduos vivos no programa Excel® (Microsoft).

Para determinação da atividade anti-leishmania foi utilizado o programa Bioestat 5.0™ para estatística descritiva (média e desvio padrão entre replicas) seguidas de análise de variância pelo teste de ANOVA: 2 critérios para dados paramétricos, sendo adotado o valor de  $p < 0,05$  quando houve diferença significativa entre as médias. Médias diferentes foram analisadas por meio do teste de Tukey. Para análise de normalidade foi utilizado o teste de Lilifors com grau de diferença significativa em  $p < 0,05$ . O valor de  $CI_{50}$  foi obtido através do cálculo de regressão linear utilizando a média de parasitos mortos no programa Excel® 2013.

## Resultados e Discussão

A análise da curva de crescimento dos parasitos *in vitro* mostrou uma diferença significativa entre os dias para que estes cheguem a diferentes fases. *L. amazonensis* apresenta fase logarítmica mais longa que *L. guyanensis*, como visto na Figura 1 – A e B. Observamos que o melhor dia para realização dos bioensaios é até o quarto dia da cultura, principalmente na cultura de *L. guyanensis*, pois mostra um declínio significativo após esse período.

A análise do extrato filtrado de *A. fumigatus* mostrou que a porcentagem de promastigotas vivos em *L. guyanensis* na concentração de 750  $\mu\text{g/mL}$  às 72 horas foi de 38,63%, aproximada ao percentual obtido com Glucantime®, 21,7%. Todas as outras concentrações do extrato fúngico apresentaram valores mais próximos ao do controle negativo composto pelo meio RPMI (Figura 2). O resultado foi corroborado com os testes estatísticos onde a concentração mais alta e o Glucantime apresentaram diferença

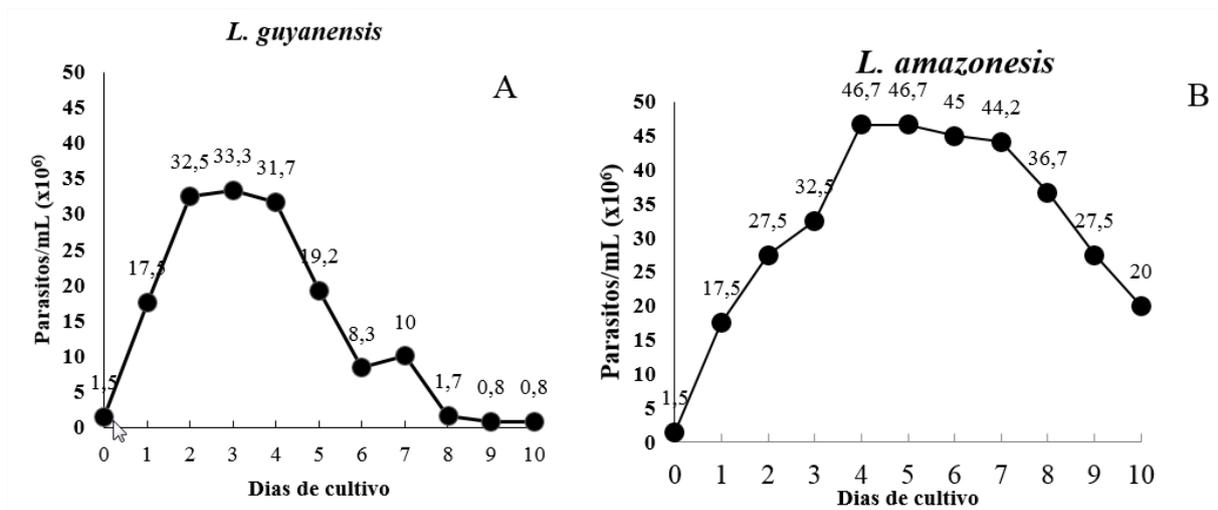


Figura 1. Curva de crescimento para *L. guyanensis* (A) e *L. amazonensis* (B) Corrigir o nome amazonensis dentro da figura. Aumentar tamanho das letras do eixo X

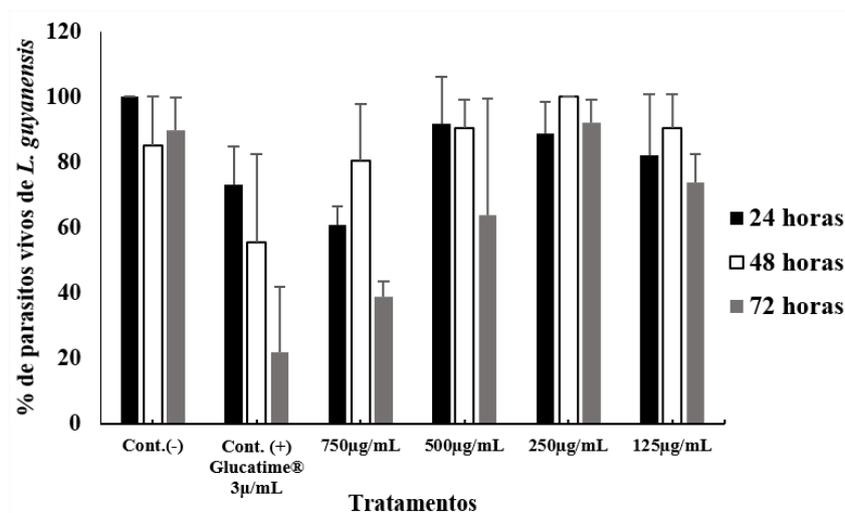


Figura 2. Numero de *L. amazonenses* vivos em teste com extrato de *A. fumigatus* no período de 24, 48 e 72h

significativa para com o controle negativo,  $p < 0.05$ , teste de Tukey. Contudo, para *L. amazonensis* não foi verificada diferença entre a porcentagem de parasitos vivos nas diferentes concentrações do extrato, em comparação com o controle positivo e o negativo (Figura 3). O mesmo se comprovou através do teste estatístico realizado com a média do número de indivíduos vivos que não mostrou diferença estatística em nenhuma concentração,  $p = 0.9117$ , teste de ANOVA. Deste modo, verifica-se que o extrato de *A. fumigatus* apresenta atividade leishmanicida distinta de acordo com as espécies de *Leishmania*.

Por outro lado, os valores de  $IC_{50}$  encontrados para o extrato do fungo *A. fumigatus* foi de  $65,46 \times 10^{-1} \mu\text{g/mL}$  para *L. guyanensis* e de  $108,5 \times 10^{-1} \mu\text{g/mL}$  para *L. amazonensis*, sendo significativo em comparação aos resultados demonstrados anteriormente.

A determinação da curva de crescimento das duas espécies do gênero *Leishmania* deste estudo foi fundamental para determinar o estágio e o dia para a utilização dos parasitos no bioensaio. Observando a morfologia e o crescimento das formas promastigotas das espécies em estudo, foi determinado o quarto dia, fase logarítmica, para a realização dos testes. Estudos realizados por Cunha (2017) utilizando a cepa PH8 de *L. amazonensis*, mesma cepa desta pesquisa, demonstrou que houve aumento expressivo

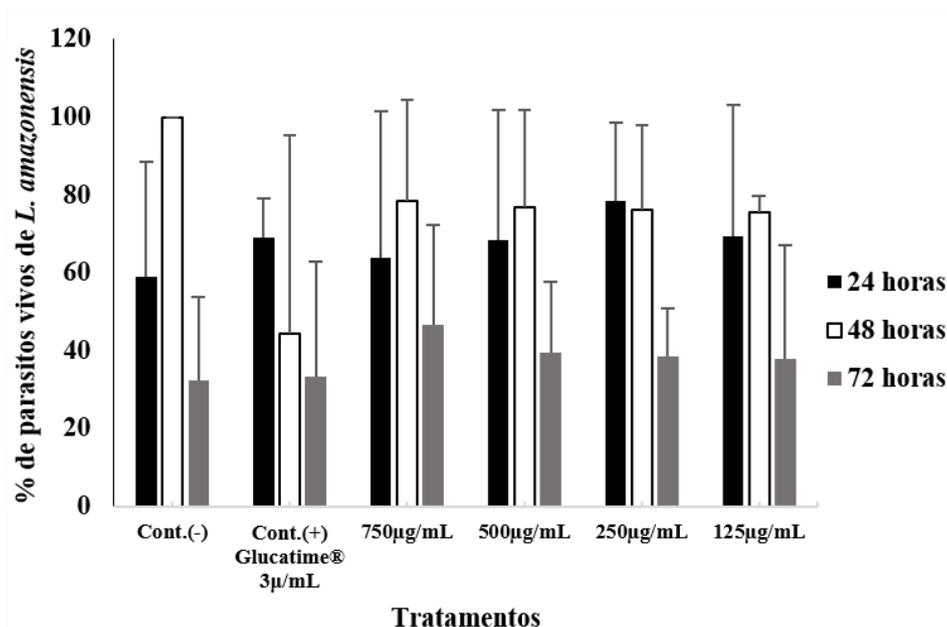


Figura 3. Numero de *L. amazonensis* vivos em teste com extrato de *A. fumigatus* no período de 24, 48 e 72 horas.

de parasitos na fase logarítmica que vai até o quarto dia. Em contrapartida, não houve correspondência entre os dados de Chagas (2015) para as duas espécies, tendo em vista que a *L. amazonensis* e *L. guyanensis* apresentaram, em seu estudo, a fase logarítmica no terceiro dia de cultivo.

Até o momento, só foi encontrada na literatura, algumas espécies do gênero *Aspergillus* com atividade leishmanicida, como o estudo feito por Elkhayat *et al.* (2015) utilizando o fungo *Aspergillus terreus* isolado das raízes de *Carthamus lanatus* (Asteraceae), onde compostos butenolídeos, isolado deste fungo inibiram o crescimento de *Leishmania donovani* com valores de  $IC_{50}$  de 11,24, 15,32 e 27,27  $\mu\text{g/mL}$ .

Um estudo realizado por Mischiatti (2016) com o metabólico DFQ1 (Derivado 1 da 2-fenilquinolina), obtido da biotransformação da 2-fenilquinolina (FQ) pelo fungo *A. fumigatus* demonstrou que esse composto possui atividade leishmanicida contra *L. amazonensis* em 24 ( $CI_{50} = 5,41 \pm 0,20$ ), 48 ( $CI_{50} = 0,44 \pm 0,18$ ) e 72 horas ( $CI_{50} = 0,24 \pm 0,14 \mu\text{g/mL}$ ). Existem, também, estudos do *A. fumigatus* como um inibidor de *Mycobacterium tuberculosis*, com concentração inibitória mínima de 256  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Silva *et al.*, 2018).

Outro estudo, realizado por Rodrigues *et al.* (2014), utilizando o ácido kójico (KA), um metabólico secundário do gênero *Aspergillus*, demonstrou que esse ácido inibiu 62% ( $IC_{50}$  34 $\mu\text{g/mL}$ ) de promastigotas de *L. amazonensis in vitro*. Nota-se que os estudos com o fungo do gênero *Aspergillus* são voltados mais para a espécie de *L. amazonensis*, não sendo encontrado na literatura estudos com a espécie *L. guyanensis*. De acordo com Borges *et al.*, (2018), a espécie *L. (V.) guyanensis*, apresenta aspectos únicos e pouco estudados, necessitando de uma melhor caracterização dos parasitos para conhecer melhor sua resposta imunológica.

Foi constatado a partir deste estudo, que o extrato do fungo *A. fumigatus* apresenta atividade anti-parasitária, comprovada estatisticamente, apenas contra *L. guyanensis*. No entanto, precisa-se de mais estudos, principalmente por não ter sido estudado o composto químico deste extrato que foi capaz de inibir o crescimento dos parasitos desta espécie.

## Conclusão

Os resultados do teste *in vitro* deste trabalho demonstram que o extrato do fungo *Aspergillus fumigatus* pode ser utilizado no tratamento da leishmaniose como nova fonte de estudos para fins terapêuticos, tendo demonstrado uma inibição satisfatória contra a espécie de *L. guyanensis*, apresentando uma concentração inibitória ( $IC_{50}$ ) no valor de 65,46x10<sup>-1</sup> $\mu\text{g/mL}$ .

## Agradecimentos

Ao Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pelo suporte físico concedido, a Universidade do Estado do Amazonas (UEA) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM).

## Referências

- Abdossamadi Z, Seyed N, Rafati S 2016. Mammalian host defense peptides and their implication on combating Leishmania infection. *Elsevier*, 309: 23-31.
- FUNDAÇÃO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE 2017. *Manual de Vigilância das Leishmanioses no Amazonas*.
- Borges AF, Gomes RS, Ribeiro-Dias F 2018. *Leishmania (Viannia) guyanensis* in tegumentary leishmaniasis. *Pathogens and disease*, 76(4).
- ANVISA 2017. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 190 p.
- Campos FF, Sales Junior PA, Romanha AJ, Araújo MS, Siqueira EP, Resende JM, Alves TM, Martins-Filho OA, Santos VL, Rosa CA, Zani CL, Cota BB 2015. Bioactive endophytic fungi isolated from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazil wood) and identification of beauvericin as a trypanocidal metabolite from *Fusarium* sp. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(1):65-74.
- Carvalho CM 2010. *Estudo dos metabólitos de fungos endofíticos de Copaifera multijuga Hayne para uso na terapêutica da tuberculose*. Manaus, Brasil (Dr. Tese. Universidade Federal do Amazonas. UFAM), 123p.
- Chagas AFS 2015. *Avaliação da atividade anti-leishmania induzida por complexos metálicos de cobre*. Manaus, Brasil. (M. Sc. Dissertação. Universidade Estadual do Amazonas. UFAM). 100p.
- Costa EV, Pinheiro MLB, Silva JRA 2009. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). *Química Nova*, 32(1):78-81.
- Cunha BC 2017. *Avaliação da atividade Leishmanicida do extrato hidroalcoólico da própolis verde*. Minas Gerais, Brasil (M. Sc. Dissertação. Universidade Federal de Ouro Preto. UFOP). 76p.
- Elkhatay ES, Ibrahim SMR, Mohamed GA, Ross SA 2015. Terrenolide S, a new antileishmanial butenolide from the endophytic fungus *Aspergillus terreus*. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letter*, 31(4):1-7.
- Fumarola L, Spinelli R, Brandonisio O 2004. In vitro assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *Research in Microbiology*, 155(4):224- 230.
- Jaffe C.L, Grimaldi G, Pinero D 1984. *The cultivation and cloning of Leishmania*. A Laboratory Manual. 2ed. Fundação Oswaldo Cruz. 91p. .
- Jensen BB, Comandolli-Wyrepkowski CD, Barros AMC, Soares FV, Grafov I, Grafov A, Franco AMR 2017. Avaliação da atividade antileishmaniana in vitro de *Tanacetum vulgare* (Asteraceae). *Acta Brasiliensis*, 1(2): 33-37.
- Lima JR 2017. *Estudo prospectivo de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana em Manaus (AM): fatores imunológicos envolvidos no curso terapêutico com antimoniais pentavalentes*. Rio de Janeiro, Brasil. (M. Sc. Dissertação. Instituto Oswaldo Cruz). 146p.
- Liu JY, Song YC, Zhang Z, Wang L, Guo ZJ, Zou WX, Tan RX 2004. *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. *Journal of Biotechnology*, 114(3): 279-287.
- Mischiatti KL 2016. *Biotransformação e avaliação das atividades leishmanicida e anti-inflamatórias de alcaloides quinolíticos e derivados*. Curitiba, Brasil. (Dr. Tese. Universidade Federal do Paraná. UFPR). 158p.
- Monzote L, Garcia M, Montalvo AM, Scull R, Miranda M 2010. Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(2):6.
- Rodrigues APD, Farias LHS, Carvalho ASC, Santos AS, Nascimento JLM, Silva EO 2014. A Novel Function for Kojic Acid, a Secondary Metabolite from *Aspergillus* Fungi, as Antileishmanial Agent. *PLOS ONE*, 9(3):1-8.
- Silva DG 2008. *Padronização do cultivo de amastigotas axênicas e intracelulares de Leishmania spp. e análise da atividade leishmanicida de chalconas*. Florianópolis, Brasil. (M. Sc. Dissertação. Universidade de Santa Catarina. UFSC.) 120p.

- Silva EMS, Silva IR, Ogusku MM, Maki CS, Procópio REL 2018. Metabolites from endophytic *Aspergillus fumigatus* and their in vitro effect against the causal agent of tuberculosis. *Acta Amazonica*, 48(1):63-69.
- Soriano B 2017. *Avaliação do potencial antimicrobiano e leishmanicida de materiais orgânicos derivados da base de Schiff N, N-Bis' (Salicilideno) – 1,2-Fenilenediamina*. São Carlos, Brasil. (M. Sc. Dissertação. Universidade Federal de São Carlos. UFSCar.) 56p.
- Wyrepkowski CDC 2015. *Atividade anti-leishmania in vitro e in vivo de Libidibia férrea e estudos de formulações tópicas para o tratamento da forma cutânea da Leishmaniose*. Manaus, Brasil. (Dr. Tese. Universidade do Estado do Amazonas. UFAM). 19p.

## Prevalência de microrganismos gram-negativos em um hospital público na região central de Rondônia

Valéria Pereira Novais<sup>1</sup>, Tiago Barcelos Valiatti<sup>1</sup>, Natália Faria Romão<sup>2</sup>,  
Renan Fava Marson<sup>3</sup>, Fabiana de Oliveira Solla Sobral<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Farmácia – Centro Universitário Luterano de Ji – Paraná CEULJI/ULBRA

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Biológicas – Centro Universitário Luterano de Ji – Paraná CEULJI/ULBRA

<sup>3</sup> Departamento de Biomedicina – Centro Universitário Luterano de Ji – Paraná CEULJI/ULBRA

Emails: valnovais23@gmail.com, tiago\_valiatti@hotmail.com, nataliaromao2@gmail.com,  
renanfmarsom@gmail.com, f.sobralbiomedica@gmail.com

### Resumo

O ambiente hospitalar, abrangendo superfícies e pessoas, está diretamente relacionado a Infecções Hospitalares (IH), uma vez que o mesmo pode proporcionar focos de crescimento microbiano. Dentro deste contexto, este trabalho tem por objetivo avaliar a presença de Bacilos Gram Negativos (BGN) em superfícies de um hospital da região central de Rondônia. Coletou-se 68 amostras de profissionais da área da saúde, sendo estas 39 de mãos, cinco de celulares, 11 de superfícies de bancadas, quatro de prontuários e nove de dispensadores de sabão. As amostras foram coletadas por swabs embebidos em solução salina e foram inoculadas ágar MacConkey, encubadas por 24 horas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ . Realizaram-se a provas bioquímicas em colônias características para confirmação de gênero e espécie. Dos microrganismos encontrados, o mais frequente foi a *Shigella* sp. (35,29%), seguida da *E. coli* (33,82%), ambas em maior quantidade nos Dispensadores de sabão e nas mão de funcionários, sendo ainda que a *Shigella* sp. foi a que mais apareceu em aparelhos celulares. Ainda foram encontradas *Pseudomonas* sp. (29,41%) e *Klebsiella* sp., sendo que esta última foi a menos frequente (16,17%), uma vez que só foi observada em três grupos, ainda sim, não sendo presente em grande quantidade em nenhum destes. A presença destes microrganismo em superfícies hospitalares alerta sobre o risco da contaminação cruzada, contudo, essa problemática juntamente com as IH podem ser amenizadas com a aplicação de práticas como a correta higienização das mãos e ambiente.

**Palavras-chave:** Infecção hospitalar, enterobactérias, contaminação cruzada.

### Introdução

Problemas relacionados com Infecções Hospitalares (IH) vem se tornando cada vez mais recorrentes no Brasil, sendo este o principal causador de morbidade, mortalidade e maior permanência no ambiente hospitalar (Santos *et al.*, 2010).

Estimativas apontam que no Brasil cerca de 5 a 15% dos pacientes internados contrairão alguma IH, sendo que 25 a 40% desses pacientes receberão antibióticos para profilaxia ou tratamento da infecção, considerando que uma IH se agrava de 5 a 10 dias no período de internação hospitalar (Machado *et al.*, 2001).

Ainda que as principais causas de infecções hospitalares estejam relacionadas com doentes imunocomprometidos e com métodos invasivos utilizados na terapêutica, é necessário que se considere a parcela de culpa ligada ao ambiente hospitalar como um todo e a sua assepsia. O ambiente hospitalar, abrangendo superfícies, pessoas, ar, água e aparelhos podem proporcionar focos de crescimento microbiano (Andrade *et al.*, 2000). Alguns patógenos tem uma longa sobrevivência em superfícies inanimadas e mãos, sendo estas, fortes fontes de contaminação cruzada (Santos *et al.*, 2010).

Mesmo que maiores medidas para o controle deste problema estejam sendo adotadas, a problemática de IH no Brasil continua aumentando, com índices que permanecem altos, com cerca de 15,5%, enquanto a média mundial é de 5%. Além disso, as maiores taxas de prevalência de dessas infecções no Brasil são oriundas de instituições públicas (Rocha *et al.*, 2010).

Dentre os microrganismos responsáveis pela alta taxa de IH, pode-se destacar os da família Enterobacteriaceae, e as espécies: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (Braga *et al.*, 2004). A família *Enterobacteriaceae* envolve microrganismos presentes na microbiota intestinal habitual da maioria dos animais e do homem. São bacilos gram-negativos (BGN), de tamanho médio, móveis dotados de flagelos ou imóveis, podem ser aeróbios ou anaeróbios, são não formadores de esporos e facilmente adaptáveis a diversos meios. São microrganismos não fastidiosos, fermentadores de glicose, redutores de nitrato, catalase-positiva, oxidase negativa e sem atividade de citocromo-oxidase (O'Hara, 2005).

Esses microrganismos estão comumente presentes tanto em infecções comunitárias quanto em infecções no âmbito hospitalar. Dentre as moléstias que essa família pode causar estão meningites, abscessos, pneumonias, infecções no trato urinário e gastrointestinal, sepses entre outras. Podem ser destacadas, dentro desta família, por sua alta patogenicidade a *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* sp., *Serratia marcescens*, por, dentre outros fatores, serem microrganismos muito presentes em unidades hospitalares (Silva e Oliveira, 2008; Alves, 2011). Dentro do contexto de infecção hospitalar, este trabalho tem por objetivo identificar e avaliar a presença de bactérias Gram-Negativas nas mãos, superfícies e objetos pessoais de profissionais de saúde em um hospital da região central de Rondônia.

## Material e Métodos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná, sob o parecer nº 50609115.4.0000.5297. Um termo de consentimento foi assinado pelos participantes da pesquisa.

Foram coletadas 68 amostras de profissionais da área da saúde, sendo estas 39 de mãos, cinco de celulares, 11 de superfícies de bancadas, quatro de prontuários e nove de dispensadores de sabão líquido utilizado para lavagem das mãos.

A coleta de amostras das mãos e superfícies foi realizada através de swab estéril embebido de solução salina. A coleta foi feita da palma das mãos e entre os dedos, a fim de avaliar a presença de bactérias gram-negativas nas mãos dos profissionais. A mesma metodologia foi utilizada para coleta das demais superfícies.

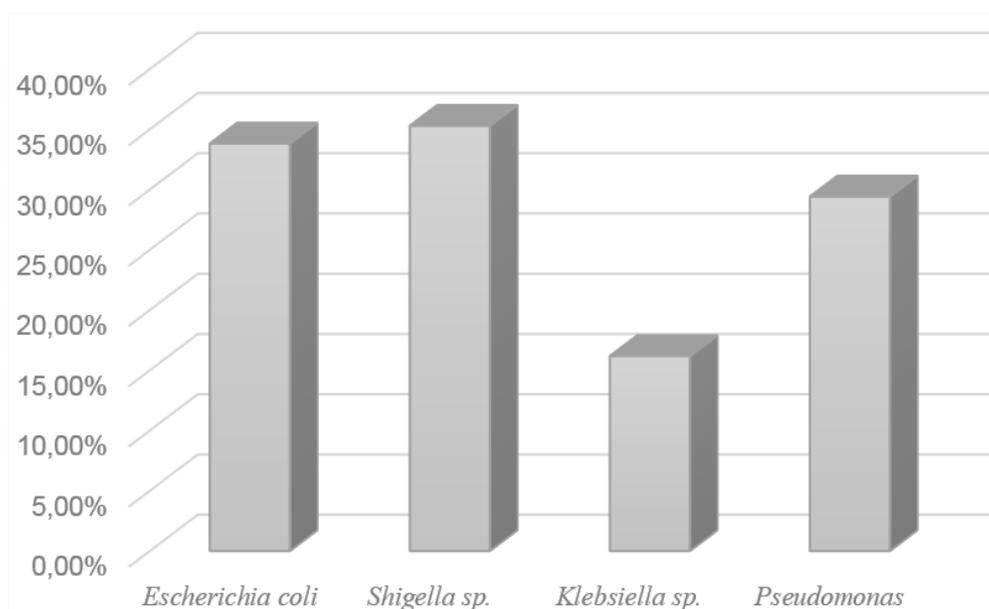
As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia do CEULJI/ULBRA, semeadas por estriamento por superfície em Agar MacConkey, encubadas por 24 horas a uma temperatura de  $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ . Em seguida, foram realizadas provas bioquímicas em colônias características para confirmação dos gêneros e espécies.

## Resultados e Discussão

De 68 amostras analisadas, sendo elas cinco de celulares de funcionários, 11 de bancadas, quatro de prontuários, nove de dispensadores e 39 de mãos de funcionários, em todos os grupos houve presença de Bacilos Gram Negativo, sendo observado que todas as amostras obtiveram algum tipo de contaminação. Os percentuais de cada microrganismo encontrado são demonstrados na Figura 1.

Os dados apontam grande contaminação por *Shigella* spp. e *E. coli*. Apesar da *E. coli* ser um microrganismo fermentador e a *Shigella* um não-fermentador, ambas estão relacionadas por colonizarem o mesmo ambiente e ambas estarem associadas a infecções intestinais (Parsot, 2005; Hu-Din e Wahid, 2014), bem como a *Salmonella* spp.. Segundo Pereira (2012), muitos BGN são comumente encontrados em superfícies inanimadas, mesmo sendo expostos a condições adversas, necessitando apenas de um lugar úmido para que sobreviva por vários meses. Desta forma, superfícies hospitalares tem sido alvo de estudos por serem uma fonte de contaminação.

Foi possível observar, conforme dados da Tabela 1, que a bactéria mais frequente foi a *Shigella* spp., seguida da *E. coli*, sendo que as ambas presentes em maior quantidade nos Dispensadores de sabão e nas mãos de funcionários, sendo ainda que a *Shigella* sp. foi a que mais apareceu em aparelhos celulares.



**Figura 1.** Percentual de contaminação em relação às amostras totais.

**Tabela 1.** Percentual de contaminação por Bacilos Gram Negativos em cada grupo analisado.

	Amostras totais	Celulares	Bancadas	Prontuários	Dispensadores de sabão	Mãos de funcionários
<i>Escherichia coli</i>	33,82%	20%	18,18%	25%	55,55%	35,89%
<i>Shigella sp.</i>	35,29%	40%	27%	0%	55,55%	35,89%
<i>Klebsiella sp.</i>	16,17%	20%	0%	0%	33,33%	17,89%
<i>Pseudomonas</i>	29,41%	20%	45,45%	25%	22,22%	28,20%

*Klebsiella sp.* foi a menos frequente, uma vez que só foi observada em três grupos, ainda sim, não sendo presente em grande quantidade em nenhum destes.

Em um Estudo Realizado por Feitosa *et al.* (2008) no estado de Goiás em superfícies hospitalares, bem como mão de profissionais, aparato médico e camas, coletando amostras tanto no período chuvoso quanto no período da seca, observou-se grande contaminação por enterobactérias, tendo como resultados durante o período de estiagem maior contaminação por *E. coli* e *Enterobacter sp.*, enquanto no período chuvoso foram encontradas *E. coli*, *Salmonella sp.* e *Klebsiella sp.* Dados de Feitosa *et al.* (2008) corroboram com o do presente estudo, confirmando que BGN formam focos de contaminação em superfícies inanimadas.

Os dados analisados evidenciaram a presença de *Shigella spp.*, *E. coli*, *Klebsiella spp.*, e *Pseudomonas spp.*, nos celulares testados. Estes parelhos pertencem aos profissionais de saúde que participaram do estudo, sendo eles médicos e enfermeiros. A possibilidade que os aparelhos celulares tenham se tornado agentes disseminadores de microrganismos tem atraído a atenção de estudiosos e profissionais da saúde (Akinyemi *et al.*, 2009). Araújo *et al.* (2017) em estudo semelhante, realizou-se análise de aparelhos celulares de três grupos sociais distintos, tendo como resultado a presença de enterobactérias em 21% dos celulares analisados, e destes microrganismos, 14,35% em ambiente hospitalar, obtendo a presença de *E. coli*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas sp.*, *Proteus sp.*, *Shigella sp.*, *Salmonella sp.* e *Klebsiella sp.*.

Ainda, os dados apresentados na Tabela 1, apontam uma alta prevalência de contaminação nas mãos dos profissionais da saúde. O corpo desses profissionais pode adquirir flora bacteriana patogênica permanentemente, sendo esta contraída no ambiente hospitalar. Custódio *et al.* (2009) cita que a colonização

das mãos de profissionais da saúde muitas vezes se dá de maneira tão intensa que nem mesmo a assepsia é capaz de combater, e geralmente esta contaminação é por *Staphylococcus aureus* e BGN, sendo estes adquiridos durante as mais diversas atividades clínicas, desde a manipulação de pacientes até a arrumação dos leitos hospitalares.

Após procedimentos com pacientes, muitos profissionais não se atentam à higienização das mãos e retomam às atividades sem analisar a possibilidade da disseminação de microrganismos no ambiente. Esse fato reforça a premissa de que contaminação de locais aparentemente limpos aumentam a possibilidade da disseminação de patógenos para outros profissionais ou pacientes, locais esses apontados como superfícies limpas, fazendo com que muitas vezes sejam ignoradas medidas eficazes de limpeza (Scott, 2007; Pereira, 2012).

Karabey *et al.* (2002) aponta que muitos microrganismos são transferidos para as mãos de profissionais por superfícies inanimadas, como dispensadores de sabão, mesas, telefones, camas, e materiais de uso cotidiano na clínica médica. As mãos são uma importante via de contaminação cruzada no contexto hospitalar, sendo estas responsáveis por um altíssimo número de infecções hospitalares. Esses microrganismos podem ser transferidos para o sistema do paciente, que por sua vez, é colonizado por patógenos e desenvolve infecções. (Bjerke, 2004; Karabey *et al.*, 2002). Deste modo, é possível fazer a associação entre a alta incidência das enterobactérias encontradas nas mãos dos profissionais e os dispensadores de sabão segundo dados obtidos neste estudo, uma vez que os profissionais da saúde usam estes dispensadores para realizar a higienização das mãos, e ali depositam microrganismos que acabam colonizando o local (Bjerke, 2004; Karabey *et al.*, 2002).

A higienização correta das mãos é a medida mais importante para evitar infecções associadas aos cuidados de saúde por profissionais hospitalares, uma vez que as recomendações para suas adequadas assepsias têm sido um dos pontos essenciais dos programas de prevenção e controle de IH (Laerson, 2001; Sanchez-Payá *et al.*, 2007).

## Conclusão

A presença de enterobactérias em superfícies hospitalares alerta sobre o risco da contaminação cruzada, principalmente pela alta incidência deste microrganismo nas amostras de mãos analisadas no presente estudo.

## Referências

- Akinyemi KO, Atapu AD, Adetona OO, Coker AO 2009. The potential role of mobile phones in the spread of bacterial infections. *J Infect Dev Ctries*, 3(8):628-632.
- Alves RPR 2011. *Estudo das principais enterobactérias responsáveis pelas infecções no âmbito hospitalar comunitário: uma revisão*. Campina Grande, Brasil (Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual da Paraíba) 32 p.
- Andrade D, Angerami ELS, Padovani CR 2000 Condição microbiológica dos leitos hospitalares antes e depois de sua limpeza. *Revista de Saúde Pública*; 34:163169.
- Araújo AM, Novais VP, Calegari GM, Góis RV, Sobral FOS, Marson RF 2017. Ocorrência de microrganismos em aparelhos celulares no município de Ji-Paraná- Rondônia, Brasil. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*, 19(1):10-15.
- Bjerke NB 2004. The evolution: hand washing to hand hygiene guidance. *Crit Care Nurs Q*, 27(3):295-307.
- Braga KAM, Souza LBS, Santana WJ, Coutinho HDM 2004. Microorganismos mais frequentes em unidades de terapia intensiva. *Revista Médica Ana Costa*, 9:71-74.
- Custódio J, Alves JF, Silva JM, Dolinger EJOV, Santos JGS, Brito DVD 2009. Avaliação microbiológica das mãos de profissionais da saúde de um hospital particular de Itumbiara, Goiás. *Rev. Ciênc. Méd.*, 18(1):7-11.
- Feitosa SB, Araújo RB, Costa PGM, Vieira J, Oliveira MBR, Carneiro LC 2008. Estudo de enterobactérias no hospital público de Morrinhos-GO. VI Seminário de Iniciação Científica e III Jornada de Pesquisa e Pós-Graduação. Disponível em: < <http://docplayer.com.br/7369670-Estudo-de-enterobacterias-no-hospital-publico-de-morrinhos-go.html> > .

- Karabey S, Ay P, Derbentli S, Nakipoglu Y, Esen F 2002. Handwashing frequencies in an intensive care unit. *J Hosp Infect*, 50(1):36-41
- Larson EL. 2001. Hygiene of the skin: when is clean too clean? *Emerg Infect Dis*, 7(2):225-9
- Machado A, Ferraz AAB, Ferraz E, Arruda E, Nobre J, Konkewicz LR, Pimentel ML, Leão MTC, Trabasso P, Grimbaum R. Projeto Diretrizes 2001. Prevenção da Infecção Hospitalar. *Sociedade Brasileira de Infectologia*. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina.
- O'Hara CM 2005. Manual na automated instrumentation for identification of *Enterobacteriaceae* na others aerobcs gram-negative bacilli. *Clinical Microbiology Reviews*, 18:147-162.
- Parsot C 2005. Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli pathogenicity factors. *FEMS Microbiol Lett*, 252:11-18.
- Pereira CAS, Alvarenga J, Barros AL, Silva AO 2012. Pesquisa de Bacilos Gram Negativos Não Fermentadores presente em torneiras de um hospital privado do município de Volta Redonda, RJ. *Revista Episteme Transversalis*, 3(1).
- Rocha LF, Lemes NA, Brasileiro ME 2010. A Atuação da Comissão de Controle de Infecção em Serviços de Saúde na Unidade de Terapia Intensiva: O que fazer ?. *Revista Eletrônica de Enfermagem do Centro de Estudos de Enfermagem e Nutrição - Serial online*, 1(1):1-16.
- Sánchez-Payá J, Fuster-Pérez M, García-González C, García-Rodríguez RM, García-Shimizu P, San Juan Quiles A, et al. 2007. Evaluación de un programa de actualización de las recomendaciones sobre la higiene de manos. *An Sist Sanit Navar*, 30(3):343-52.
- Santos LF, Vieira Junior VM, Santos AF, Alvarez CCS, Pereira CAS, Lopes FA, Carvalho NCP, Oliveira OA 2010. Fontes Potenciais de Agentes Causadores de Infecção Hospitalar: Esparadrapos, Fitas Adesivas e Luvas de Procedimento. *Revista Panamericana de Infectologia*, 12(3):8-12.
- Scott P et al. 2007. An Outbreak of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*-calcoaceticus Complex Infection in the US Military Health Care System Associated with Military Operations in Iraq. *Clinical Infectious Diseases*, 1(44):1577-1584.
- Silva RS, Oliveira AC 2008. Epidemiologia e controle de infecção hospitalar em uma unidade pediátrica. *Rev Enferm UFPE*, 2(2):177-184.
- Ud-Din A, Wahid S 2014. Relationship among Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) and their differentiation. *Braz. J. Microbiol.*, 45(4):1131-1138.

## Atividade anti-*Staphylococcus* de variedades de banana (*Musa* sp.)

Thaissa Cunha de Oliveira<sup>1</sup>., Karen Kelly Carvalho de Oliveira.1; Ormezinda Celeste Cristo Fernandes<sup>2</sup>; Luiz Antonio de Oliveira<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Amazonas, PPG Biotecnologia

<sup>2</sup> Instituto Leônidas e Maria Deane/Fiocruz-Amazônia

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Emails: thaissa.olcunha@gmail.com, karen\_kelly88@yahoo.com.br, luiz.oliveira@inpa.gov.br

### Resumo

A resistência antibacteriana é uma das maiores ameaças para os seres humanos e que reduz drasticamente as chances de cura de doenças infecciosas, aumentando a morbidade e mortalidade associadas a doenças bacterianas comuns. Devido a isso, surge a necessidade de pesquisas contínuas para que sejam obtidos novos antibióticos eficazes contra os microrganismos resistentes. Um recurso natural que pode ser utilizado para isto é a banana, a fruta fresca mais consumida no mundo, gerando milhões de toneladas de resíduos de casca no meio ambiente. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana de bananas (*Musa* sp.) contra *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*. Foram obtidos extratos aquosos de cascas e polpas de três variedades de banana (pacovan, maçã e prata), verdes e maduras, obtidas na Feira da banana em Manaus, submetendo-os à avaliação de atividade antibacteriana pelo método do bloco de gelose. Os extratos aquosos das variedades de banana pacovan, maçã e prata possuem compostos antibacterianos eficazes contra cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*. A parte desta fruta que apresentou melhores resultados foi a casca, pois inibiu maior número de patógenos. Todas as oito cepas de *S. epidermidis* mostraram alguma inibição quando se usou as cascas verdes ou maduras das variedades de banana pacovan, maçã e prata. As cascas verdes ou maduras da variedade de banana prata foram as que apresentaram inibição de um maior número de cepas de *S. aureus*, cinco do total de dez testadas.

**Palavras-chave:** antibacterianos, casca de banana, compostos bioativos, resíduo alimentar, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*.

### Introdução

As fontes alimentares mais importantes do mundo são ocupadas pelo arroz, trigo, milho e banana (Perrier *et al.*, 2011), sendo esta a fruta fresca mais consumida no mundo. O Brasil é o quarto produtor e o primeiro consumidor mundial de bananas, produzindo 7,1 milhões de toneladas praticamente para o consumo interno (Lima *et al.*, 2012). Considerando que 30-40% de seu peso corresponde à casca, tem-se uma geração de até 2,84 milhões de toneladas de resíduos de casca de banana por ano (Franco *et al.*, 2015).

Além do seu consumo *in natura*, a banana pode dar origem a diversos produtos. A banana verde pode ser utilizada para a obtenção de produtos panificáveis, na produção de farinha, amido e *chips*. Da banana madura podem ser produzidos bananas em calda, banana desidratada, *catchup*, *chips*, congelados, doces em massa, essências, farinha, flocos, granulados, geleias, néctares, purês, sucos, vinagres e vinhos (Godoy *et al.*, 2012).

Os resíduos de cascas de frutas são amplamente obtidos como subproduto de indústrias de processamento de alimentos, processamento de suco, hotéis e restaurantes. Esses resíduos podem causar problemas ambientais, a menos que sejam descartados adequadamente ou convertidos em um produto útil (Tibolla *et al.*, 2014). Existem alguns trabalhos publicados sobre o reaproveitamento das cascas de bananas, que incluem a produção de etanol (Danmaliki *et al.*, 2016; Gebregergs *et al.*, 2016), metano (Khan *et al.*, 2016), alimentação animal (Abel *et al.*, 2015; Pimentel *et al.*, 2017) e uso como adsorventes para purificação de água (Al-Qahtani, 2016).

Além da utilização destas cascas para obtenção de produtos, é possível usá-las para a obtenção de biomoléculas. Com elas é possível obter compostos naturais com atividade antibacteriana, antifúngica e antioxidante (Karadi *et al.*, 2011; Parashar *et al.*, 2014).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana de extratos obtidos a partir das cascas e polpas de banana (*Musa* sp.) das variedades pacovan, prata e maçã, verdes e maduras, contra linhagens de *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*.

## Material e Métodos

As bananas utilizadas neste trabalho foram obtidas em bancas de vendas na Feira da Banana, localizada em Manaus-AM, sendo do tipo pacovan, prata e maçã. Estas foram previamente submetidas à lavagem em água corrente, sendo realizada a extração de compostos presentes nas cascas e polpas, verdes e maduras. Para isso, as cascas e as polpas foram cortadas em pequenos pedaços e fervidas por 10 minutos em água destilada. Em seguida, foram separadas do caldo com auxílio de peneira e coador de pano. A estes extratos foram adicionados 15 g de ágar a cada 1000 mL, sendo autoclavados por 20 minutos a 121 °C. Optou-se pela utilização dos extratos adicionados de ágar para que fosse possível a realização de *screening* pelo método do bloco de gelose (Ichikawa *et al.*, 1971).

Para o ensaio de atividade antibacteriana em meio sólido foram preparados fragmentos de  $\pm 8$  mm de diâmetro em forma circular (*plug*) de cada extrato. Paralelamente, os patógenos foram inoculados em caldo Muller-Hinton e incubados a 36 °C por até 24h, dos quais foram retiradas alíquotas para preparo da suspensão celular em solução salina 0,85%, cuja turbidez era semelhante à coluna 0,5 da escala de McFarland (correspondente a  $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>).

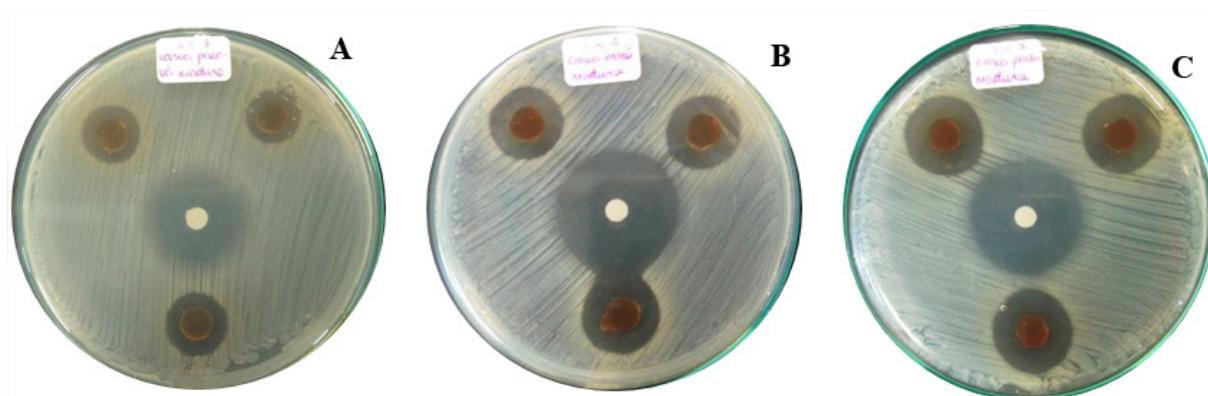
A partir da suspensão celular dos patógenos, 150  $\mu$ L foram retirados e semeados com auxílio de *swab* na superfície de meio de cultura ágar Muller-Hinton. Em seguida, os *plugs* dos extratos de banana foram depositados na superfície destas placas. O controle positivo consistiu na aplicação de discos de papel de filtro contendo cloranfenicol (5 mg.mL<sup>-1</sup>) no centro das placas, as quais foram incubadas a 36 °C por 24h. A avaliação consistiu na determinação da presença/ausência de halos e medição dos mesmos. Este experimento foi realizado em triplicata.

## Resultados e Discussão

Verificou-se que todas as variedades possuem, na polpa e/ou nas cascas, antibacterianos eficazes contra *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* (Tabela 1, Figura 1).

Entre os extratos obtidos com as polpas, apenas as bananas maçã e prata mostraram atividade antibiótica. A polpa verde da banana maçã mostrou inibição apenas contra as cepas CBAM 0318, CBAM 0319 e CBAM 0323 de *S. aureus*. Nenhuma das cepas de *S. epidermidis* foi afetada por ela. E o efeito inibidor desapareceu quando a polpa dessa variedade amadureceu, conforme se observa na tabela 1.

Resultado semelhante foi observado ao se usar a banana prata, quando se constatou novamente, que o efeito inibidor ocorreu apenas com a polpa verde. Mas nesse caso, a inibição ocorreu com um maior número



**Figura 1.** Atividade antibacteriana de extratos aquosos de banana. A: casca banana pacovan madura x *S. aureus* CBAM 0319; B: casca banana maçã madura x *S. aureus* CBAM 0318; C: casca banana prata madura x *S. aureus* CBAM 0318. Controle positivo: disco com cloranfenicol (5 mg/mL) no centro das placas.

**Tabela 1.** Atividade antibacteriana de banana pacovan, maçã e prata contra *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*.

Patógenos	Banana pacovan				Banana maçã				Banana prata				
	polpa		casca		polpa		casca		polpa		casca		
	verde	madura	verde	madura	verde	madura	verde	madura	verde	madura	verde	madura	
----- Halos de inibição (mm) -----													
<i>Staphylococcus aureus</i>	CBAM 0274	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	CBAM 0318	0,0	0,0	6,47	5,76	3,29	0,0	5,89	5,62	3,70	0,0	6,87	6,55
	CBAM 0319	0,0	0,0	3,51	3,76	2,56	0,0	4,92	2,88	3,32	0,0	4,11	3,94
	CBAM 0320	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,31	2,45
	CBAM 0321	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,05	0,0	2,02	2,30
	CBAM 0323	0,0	0,0	0,0	0,0	2,00	0,0	2,61	2,15	2,31	0,0	2,27	2,53
	CBAM 0324	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	CBAM 0325	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	CBAM 0326	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	CBAM 0327	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CBAM 0609	0,0	0,0	2,21	2,02	0,0	0,0	2,69	2,19	2,48	0,0	3,87	3,19
	CBAM 0610	0,0	0,0	3,59	2,67	0,0	0,0	4,16	3,58	0,0	0,0	4,57	4,53
	CBAM 0611	0,0	0,0	2,92	3,04	0,0	0,0	3,50	2,47	2,30	0,0	4,32	3,31
	CBAM 0612	0,0	0,0	4,36	3,91	0,0	0,0	5,82	4,21	2,02	0,0	6,39	4,54
	CBAM 0613	0,0	0,0	4,36	3,73	0,0	0,0	4,80	3,88	1,90	0,0	5,88	4,65
	CBAM 0614	0,0	0,0	3,55	3,50	0,0	0,0	0,0	3,49	1,83	0,0	4,46	3,99
	CBAM 0615	0,0	0,0	3,54	3,29	0,0	0,0	3,18	3,19	2,01	0,0	4,55	4,46
	CBAM 0616	0,0	0,0	4,34	4,54	0,0	0,0	4,32	3,70	0,0	0,0	4,53	4,77

de cepas de *S. aureus*. Além das três cepas citadas anteriormente, observou-se inibição do crescimento da CBAM 0321. A polpa verde dessa variedade também mostrou inibição do crescimento de seis das oito cepas de *S. epidermidis* (Tabela 1), mostrando-se como a melhor das três variedades para essa finalidade.

Por outro lado, as cascas das três variedades mostraram alguma inibição contra essas bactérias. Todas as cepas de *Staphylococcus epidermidis* foram afetadas pelas cascas verdes ou maduras das três variedades de banana, mas observou-se alguma diferença entre elas quando se observa seus efeitos contra as cepas de *S. aureus* (Tabela 1). Cinco das dez cepas dessa espécie de *Staphylococcus* foram afetadas pelas cascas verdes ou maduras da variedade prata, enquanto que três delas foram inibidas pelas cascas da variedade maçã e apenas duas pelas cascas da variedade pacovan, indicando maior potencial inibidor das cascas da prata.

Alguns autores investigaram a atividade antibacteriana de diversas partes da banana (*Musa spp.*) no mundo todo, obtendo resultados positivos contra vários patógenos humanos, incluindo *Staphylococcus aureus*. Porém, não foram encontrados relatos de inibição de crescimento desses extratos contra *S. epidermidis*. Nosso estudo mostrou o alto potencial de uso das cascas das três variedades testadas, que inibiram o crescimento de todas as oito cepas dessa espécie de *Staphylococcus* (Tabela 1).

Chabuck *et al.* (2013) avaliaram a atividade antibacteriana de extratos aquosos da casca da banana contra vários patógenos. Seus extratos foram obtidos por metodologia semelhante, porém não foram submetidos ao processo de autoclavação. Da mesma forma, foram eficazes contra *S. aureus* em teste antibacteriano em meio sólido. Bahadar *et al.* (2014) obtiveram resultados semelhantes com seus extratos aquosos quente e frio. Ambos inibiram *S. aureus*, porém o extrato quente apresentou halos maiores.

Ehiowemwenguan *et al.* (2014) trabalharam com extratos aquosos e etanólicos obtidos do pó seco da banana, testando a atividade antibacteriana em meio sólido com diferentes concentrações. Apenas os extratos etanólicos inibiram *S. aureus*, e somente nas duas maiores concentrações testadas (512,5 e 1025 mg.mL<sup>-1</sup>). As zonas de inibição dos halos diminuíram à medida que a concentração dos extratos diminuiu. Essa é uma das explicações para a falta de inibição de algumas cepas do nosso trabalho, tendo em vista que a concentração dos extratos não foi padronizada para o teste antibacteriano.

Outros autores optaram por obter extratos apenas utilizando solventes, como etanol, metanol ou acetona. Buru *et al.* (2016) avaliaram extratos etanólicos de cascas de banana em quatro concentrações (25 a 100 mg.mL<sup>-1</sup>) contra *S. aureus*, que não apresentou sensibilidade a nenhuma das concentrações testadas. Asoso *et al.* (2016) utilizaram etanol, metanol e acetona na obtenção de extratos de casca e polpa de banana (*Musa paradisiaca*), sendo a casca a melhor fonte de antibacterianos inibidores de *S. aureus*, assim como em nosso trabalho.

Dessa forma, é possível observar que a escolha do solvente utilizado para a extração dos antibacterianos e a concentração do extrato a ser utilizado no teste de difusão influenciam diretamente no sucesso da pesquisa. Por isso a ausência de halos de inibição pode não significar a ausência de antibacterianos, mas a ineficiência em extrai-los ou mesmo que estes encontram-se em baixas concentrações.

## Conclusões

Os extratos aquosos das variedades de banana pacovan, maçã e prata possuem compostos antibacterianos eficazes contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*.

Todas as oito cepas de *S. epidermidis* mostraram alguma inibição quando se usou as cascas verdes ou maduras das variedades de banana pacovan, maçã e prata.

As cascas verdes ou maduras da variedade de banana prata foram as que apresentaram inibição de um maior número de cepas de *S. aureus*, cinco do total de dez testadas.

## Agradecimentos

À FAPEAM e CNPq pelo apoio financeiro, à CAPES pela bolsa concedida e ao INPA pela infraestrutura.

## Referências

- Abel FAS, Adeyemi OA, Oluwole OB, Oladunmoye OO, Ayo-Ajasa OY, Anuoluwateleji JO 2015. Effects of treated banana peel meal on the feed efficiency, digestibility and cost effectiveness of broiler chickens diet. *Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry*, 3(1):1-6.
- Al-Qahtani KM 2016. Water purification using different waste fruit cortexes for the removal of heavy metals. *Journal of Taibah University for Science*, 10(5):700-708.
- Asoso OS, Akharaiyi FC, Animba LS 2016. Antibacterial activities of plantain (*Musa paradisiaca*) peel and fruit. *Der Pharmacia Lettre*, 8(5):5-11.
- Bahadar N, Rafiq MK, Israr M, Khan M, Ghulam A 2014. Antibacterial potentials of banana peel in ethanolic and water extracts. *Online Journal of BioSciences and Informatics*, 3(1):492-497.
- Buru AS, Paschal IH, Ojjezeh IT, Oluwapelumi OB, Richard AY, Fumilayo AJ, Funmi AA 2016. Antibacterial activities of selected fruit peels against organisms associated with urinary tract infection. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(12): 265-272.
- Chabuck ZAG, Al-Charrakh AH, Hindi NKK, Hindi SKK 2013. Antimicrobial effect of aqueous banana peel extract, Iraq. *Research Gate: Pharmaceutical Sciences*, 1(2013):73-75.
- Danmaliki GI, Muhammad AM, Shamsuddeen AA, Usman BJ 2016. Bioethanol production from banana peels. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 10 (6):56-62.
- Ehiowemwenguan G, Emoghene AO, Inetianbor JE 2014. Antibacterial and phytochemical analysis of Banana fruit peel. *IOSR Journal of Pharmacy*, 4(8):18-25.
- Franco CC, Castro MM, Walter ME 2015. Estudo das cascas de banana das variedades prata, caturra e maçã na bioadsorção de metais pesados gerados pelos efluentes dos laboratórios do Centro Universitário de Belo Horizonte. *E-xacta*, 8(1): 99-115.
- Gebregergs A, Gebresemati M, Sahu O 2016. Industrial ethanol from banana peels for developing countries: Response surface methodology. *Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering*, 18(1):22-29.
- Godoy RCB, Poiani LM, Waszczyński N, Viana ES, Matsuura FC, Matsuura MISF. In: Lima MB, Silva SO, Ferreira CF 2012. *Banana: o produtor pergunta, a Embrapa responde*. 2 ed. Brasília: Embrapa, p. 197-204.

- Ichikawa T, Ishikura T, Ozaki A 1971. Improvement of Kasugamycin – producing strain by the agar piece method and the prototroph method. *Folia Microbiologica*, 16(3):218-224.
- Karadi RV, Shah A, Parekh P, Azmi P 2011. Antimicrobial activities of *Musa paradisiaca* and *Cocos nucifera*. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2(1):264-267.
- Khan MT, Brule M, Maurer C, Argyropoulos D, Muller J, Oechsner H 2016. Batch anaerobic digestion of banana waste - energy potential and modelling of methane production kinetics. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*, 18(1):110-128.
- Lima MB, Silva SO, Ferreira CF 2012. *Banana: o produtor pergunta, a Embrapa responde*. 2 ed. Brasília: Embrapa, 218p.
- Parashar S, Sharma H, Garg M 2014. Antimicrobial and antioxidant activities of fruits and vegetable peels: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(1):160-164.
- Perrier X, Langhe E, Donohue M, Lentfer C, Vrydaghs L, Bakry F, Carreel F, Hippolyte I, Horry JP, Jenny C, Lebot V, Risterucci AM, Tomekpe K, Doutrelepont H, Ball T, Manwaring J, Maret P, Denham T 2011. Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa spp.*) domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (28):11311-11318.
- Pimentel PRS, Rocha Junior VR, Melo MTP, Ruas JRM, Brant LMS, Costa, NM, Leite GDO, Leite MDO, Maranhao, CMA 2017. Banana peel in the diet for F1 Holstein x Zebu cows. *Semina: Ciências Agrárias*, 38(2):969-980.
- Tibolla H, Pelissari FM, Menegalli FC 2014. Cellulose nanofibers produced from banana peel by chemical and enzymatic treatment. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2):1311-1318.

## ***Streptomyces* sp. isolados de solo amazônico produtores de enzimas antitumorais**

Haroldo Araújo da Silva<sup>1</sup>, José Jeosafá de Sousa Júnior<sup>2</sup>, Felipe Lima Corrêa Branco<sup>2</sup>, Raimunda Alice de Melo Andrade<sup>2</sup>, Anele Luana Colares Mourão<sup>2</sup>, Raphael Carlos Ferrer de Santana<sup>3</sup>, Janete Magali de Araújo<sup>4</sup>, Siu Mui Tsai<sup>5</sup>, Alexandre Escher Boger<sup>7</sup>, Silvia Katrine Rabelo da Silva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> PG Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Oeste do Pará

<sup>2</sup> Pesquisador, Universidade Federal do Oeste do Pará, Universidade Federal do Oeste do Pará

<sup>3</sup> Doutor em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco

<sup>4</sup> Pesquisador, Universidade Federal de Pernambuco

<sup>5</sup> Pesquisador, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade Federal de São Paulo

Emails: haroldaraujo93@gmail.com, josejeosafajrstm@hotmail.com, felipe.bsn@gmail.com, rda.alice.am@gmail.com, aneleluana7@gmail.com, raphaell.ferrer@gmail.com, janetemagali@yahoo.com.br, tsaicena@gmail.com, alexander.escher@gmail.com, katrinerabelos@gmail.com

### **Resumo**

A rizosfera é a região do solo influenciada pelas raízes das plantas onde ocorre grande diversidade microbiana, entre eles, microrganismos simbiotes como actinobactérias do gênero *Streptomyces*. Em associação com o sistema radicular vegetal influenciam o crescimento da planta, além da defesa contra fitopatógenos devido à produção de antibióticos e enzimas extracelulares que são de extremo interesse para a indústria farmacêutica, como a enzima antitumoral L-glutaminase. Nesse estudo foram isoladas actinobactérias de solo amazônico produtoras da enzima anticâncer L-glutaminase. As actinobactérias foram isoladas a partir do cultivo em meio Agar Arginina Levedura (ALA) a 30°C durante 21 dias seguidas de identificação através de análise molecular do gene 16S rRNA, macromorfologia e micromorfologia. Os testes qualitativos para a produção da enzima L-glutaminase foram realizados *in vitro* em meio sólido. Foram isoladas 5 cepas de actinobactérias nomeadas como MPO2, MPO6, MPO8, MPO9 e MPO11, pertencentes ao gênero *Streptomyces* sp., apresentando variada coloração de micélio aéreo e micélio vegetativo, com desenvolvimento de colônias velutas e pulverulentas, características do gênero. Apenas *Streptomyces* sp. MPO11 não produz L-glutaminase, e o isolado com maior potencial para a produção da enzima foi *Streptomyces* sp. MPO2.

**Palavras-chave:** Actinobactéria, Amazônia, L-glutaminase.

### **Introdução**

Desde a descoberta da penicilina, o primeiro beta-lactâmico produzido pelo fungo *Penicillium notatum*, os antibióticos e enzimas obtidos de microrganismos ganharam destaque na medicina, iniciando um movimento universal em busca de metabólitos bioativos obtidos de fungos e bactérias, visando a descoberta de novas biomoléculas de potencial aplicação terapêutica. (Batista *et al.*, 2009).

Entre os inúmeros microrganismos alvo da indústria farmacêutica, o grupo das actinobactérias ganha destaque por serem consideradas a principal fonte de antibióticos e enzimas terapêuticas como L-glutaminase e L-asparaginase, que após comprovadas suas propriedades antitumorais, vêm sendo empregadas no tratamento clínico da leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia linfocítica crônica, linfossarcoma, retículo sarcoma, melanossarcoma e doença de Hodgkin. (Cwala *et al.*, 2011).

A enzima L-glutaminase é também utilizada em formulações promovendo adesivo em tecidos e adsorção celular proteica em implantes médicos, além de ser largamente empregada na cosmetologia, para tratamentos e procedimentos estéticos do melhoramento da aparência da pele (Plnsn *et al.*, 2014).

Apesar do sucesso da utilização de L-asparaginase e L-glutaminase obtidas de *Escherichia coli* e *Erwinia carotovora* no tratamento de neoplasias hematológicas, seu uso por tempo prolongado leva a distúrbios gastrointestinais e mielossupressores. Assim, estudos de prospecção de novas fontes microbianas de L-asparaginase e L-glutaminase são visto como uma importante estratégia no desenvolvimento de novos fármacos antitumorais efetivos (Arasu *et al.*, 2009; Jorgensen *et al.*, 2010).

As actinobactérias têm sido investigadas quanto à capacidade de produzir enzimas antitumorais, a exemplo de *Streptomyce ssp.*, *S. karnatakensis*, *S. venezuelae*, *S. long-sporusavus*, *S. gulbargensis* *Streptomyces* sp. PDK2 (Narayana *et al.*, 2008; Divya Teja *et al.*, 2014; El-Naggar Nel *et al.*, 2015; Meena, Anburajan, Dheenana, *et al.*, 2015; Saxena *et al.*, 2015). Entretanto, actinobactérias nativas de ambientes pouco explorados como o bioma Amazônico podem ser uma fonte promissora de novas moléculas terapêuticas, visto a sua reconhecida biodiversidade a nível de fauna e flora. Pouco se conhece sobre a diversidade de microrganismos nativos, alvo da indústria farmacêutica, especialmente o grupo das actinobactérias (Tranchida *et al.*, 2008). Estas bactérias filamentosas, Gram-positivas, colonizam os mais variados ambientes, estabelecendo relações de simbiose com outros organismos e podem produzir diversas moléculas bioativas de aplicação farmacêutica, especialmente espécies do gênero *Streptomyces* sp., reconhecidos por sua habilidade em produzir substâncias de estrutura química e ação biológica variada. Este estudo foi direcionado à prospecção de actinobactérias nativas de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *fragrans* (macacaporanga – MPO) produtoras da enzima antitumoral L-glutaminase.

## Material e Métodos

O solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *Fragrans* (macacaporanga), planta nativa da Amazônia foi coletado de uma área de transição entre floresta densa e savana (Latitude 2° 28' 01.28" S e longitude 54° 49' 45.32" O), em Santarém, PA, Brasil. A permissão para conduzir o estudo foi emitida pelo Ministério do Meio Ambiente - MMA, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, pelo número 47530-1.

Para o isolamento bacteriano, foi preparada uma suspensão microbiana a partir de 10 g de solo aderido à raiz vegetal em 90 mL de solução tampão fosfato (PBS)(1X) pH 7.0 e realizada a diluição seriada. Uma alíquota de 100 µL da diluição 10<sup>-3</sup> foi semeada em placas de Petri contendo o meio Agar Arginina Levedura – ALA (Nonomura e Ohara, 1969) contendo nistatina (64 µg.mL<sup>-1</sup>) como agente antifúngico.

O isolamento bacteriano foi realizado durante 21 dias a 30°C sendo que as colônias de actinobactérias foram selecionadas e transferidas para placas de Petri contendo o meio Agar International *Streptomyces* Project n°2 - ISP2, e por meio de sucessivos repiques foram obtidas as linhagem puras (Pridham *et al.*, 1956; Shirling e Gottlieb, 1966). As actinobactérias isoladas foram depositadas no acervo da Bacterioteca do Laboratório de Microbiologia, da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA) e preservadas em óleo mineral.

Para a identificação preliminar foi realizado a caracterização morfológica e bioquímica, segundo o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Parte *et al.*, 2012). Foram utilizados os meios de cultura ISP – *International Streptomyces Project* (Pridham *et al.*, 1956) para caracterização do micélio aéreo e vegetativo, produção de pigmentos difuso ou melanoide, e padronização do meio de cultura para esporulação bacteriana e consumo de fontes de carbono e nitrogênio (Shirling e Gottlieb, 1966; Williams *et al.*, 1989). A avaliação do crescimento foi realizada após a incubação nos respectivos meios durante 14 dias a 30°C.

A morfologia da cadeia de esporos foi verificada por meio de análise microscópica em microscopia óptica de luz comum e microscopia eletrônica de varredura. Para a microscopia óptica de luz comum após o microcultivo (Holt *et al.*, 1994), as lamínulas contendo o micélio aéreo formado foram depositadas na superfície de lâminas de vidro para microscopia com o aumento de 400 X (Pridham *et al.*, 1956).

Para a microscopia eletrônica de varredura, colônias bacterianas foram obtidas após cultivo em meio Agar ISP2 a 30°C durante 7 dias, removidas e fixadas em glutaraldeído (2.5% v/v), lavado com água e pós-fixado em tetróxido de ósmio (1% w/v) por 1 h. A amostra foi lavada por duas vezes com água e desidratada em etanol ascendente antes da secagem em um aparelho de secagem em pontos críticos (Polaron E3000) e por final revestidos em ouro e examinados no microscópio eletrônico de varredura (LEO 5410LV) em 10 kV.

O DNA bacteriano foi obtido a partir da biomassa resultante do cultivo microbiano em 5 ml de meio líquido ISP2 a 30°C durante 72h (Stirling, 2003). Posteriormente, a reação de amplificação (Reação em cadeia de polimerase – PCR) foi realizada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (Eub338F/Act1159R) nas seguintes condições: 3' a 95°C; 35 ciclos a 94°C (30"), 68°C (30"), 72°C (90"), 72°C (7").

O produto da PCR foi purificado utilizando o Kit GFX (GE Healthcare 28-9034-70) e subclonado em vetor utilizando o Kit TOPO TA (Thermo Fisher Scientific 451641). O completo sequenciamento dos fragmentos subclonados e do RNAr 16S foi realizado através de sequenciamento Sanger utilizando os oligonucleotídeos iniciadores M13F (GTAAAACGACGGCCAGT) e M13R (AACAGCTATGACCATG) e 341-357F (CCTACGGGAGGCAGCAGCAG), 685-704F (GTAGSGGTGAAATACGTAGA) e 1099-1114F (GCAACGAGCGCAACCC) (Lane, 1991), em sequenciador ABI PRISM 3730 DNA Analyzer AppliedBiosystems/Hitashi no Laboratório de Genômica e Elementos de Transposição (GaTE) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

A determinação preliminar qualitativa da produção da enzima L-glutaminase foi realizada após inoculação de esporos bacterianos no centro de placas de Petri contendo o meio Mínimo Glutamina (MGA) (Balagurunathan *et al.*, 2010). As placas foram mantidas a 28°C por 7 dias e a produção da enzima foi indicada por meio da mudança da cor amarelo para rosa, indicando a produção de L-glutaminase. O controle negativo foi realizado com o meio MGA modificado pela ausência de L-glutamina (Balagurunathan *et al.*, 2010).

A seleção da actinobactérias com maior potencial na produção da enzima L-glutaminase foi realizada avaliando a intensidade da coloração rosa observada no meio de cultura, sendo atribuído uma escala de intensidade de atividade correspondendo as cores: laranja - baixa atividade (+), rosa claro - moderada atividade (++) e rosa escuro - alta atividade (+++).

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias são apresentadas com o desvio padrão e analisadas pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ), utilizando o software Assisat® 7.7 (E Silva, DE Azevedo., 2009).

## Resultados e Discussão

Foram isoladas 5 actinobactérias nomeadas como MPO2, MPO6, MPO8, MPO9, MPO11, as quais apresentaram bom desenvolvimento do micélio aéreo nos meios de cultura ISP1, ISP2 e MMG, com formação de colônias bacterianas de micélio aéreo cinza claro e micélio vegetativo bege, bordas irregulares e aspecto pulverulento (Figura 1). Foi observada a formação de cadeias de esporos simples do tipo *Rectoflexibilis* e *Retinaculum apertun* (Fig. 1B), sugestivo do gênero *Streptomyces* sp. (PARTE *et al.*, 2012).

A análise molecular das sequências obtidas do RNAr 16S mostrou 99% de similaridade com o gênero *Streptomycescinereus*, entretanto com a diferença bioquímica observada entre as linhagens, identificamos como *Streptomyces* sp. MPO2, MPO6, MPO8, MPO9, MPO11 (Tabela 1).

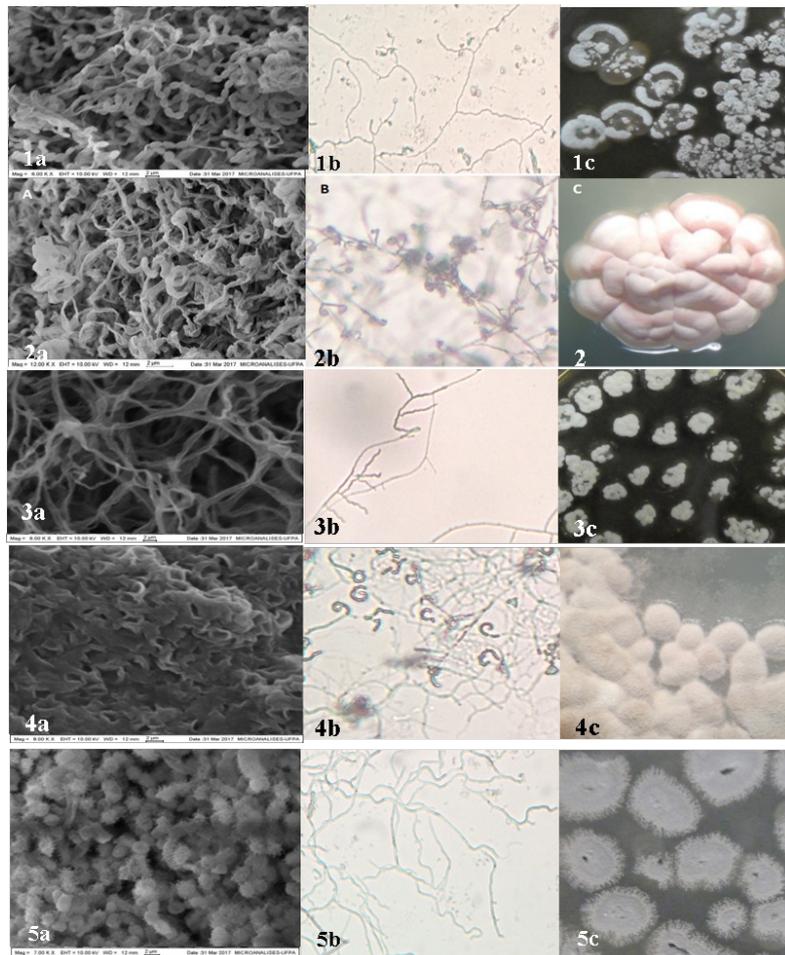
Todos os *Streptomyces* sp. isolados são fermentadores de carboidratos, apresentaram tolerância ao meio contendo concentrações variadas de NaCl (3 a 7% de NaCl) (Tabela 2) e utilizam a maioria das fontes de carbono e nitrogênio testadas.

Todos as cepas de *Streptomyces* sp. isoladas da rizosfera de *Aniba parviflora* Syn *Fragans* produzem L-glutaminase, exceto *Streptomyces* sp. MPO9 e *Streptomyces* sp. MPO11, e o isolado com melhor potencial enzimático foi *Streptomyces* sp. MPO2.

**Tabela 1.** Dados moleculares dos fragmentos de RNAr 16S dos isolados.

Isolado	Pb <sup>1</sup>	C+G (%) <sup>2</sup>	Similaridade (%)	GeneBank ID
<i>Streptomyces</i> sp. MPO2	767	58,28	99	KR063215.1
<i>Streptomyces</i> sp. MPO6	769	58,26	99	KR063215.1
<i>Streptomyces</i> sp. MPO8	769	58,26	99	KR063215.1
<i>Streptomyces</i> sp. MPO9	769	58,26	99	KR063215.1
<i>Streptomyces</i> sp. MPO11	769	58,26	99	KR063215.1

<sup>1</sup>Conteúdo de pares de bases do fragmento do RNAr 16S obtido. <sup>2</sup>percentual de Guanina e Citosina no fragmento do RNAr 16S obtido.



**Figura 1.** Morfologia das actinobactérias isoladas da rizosfera de *Aniba parviflora* Syn *Fragans* (macacaporanga). a. Esporos observados em Microscopia eletrônica de varredura (2 $\mu$ m). b. Cadeia de esporos observados em microscopia óptica de luz comum (400x). c. Aspecto das colônias bacterianas. 1. *Streptomyces* sp. MPO2; 2. *Streptomyces* sp. MPO6; 3. *Streptomyces* sp. MPO8; 4. *Streptomyces* sp. MPO9; 5. *Streptomyces* sp. MPO11.

O solo abriga uma gama de microrganismos, dos quais, ao longo dos últimos anos, são obtidas inúmeras moléculas de aplicação industrial. Microrganismos produtores de L-asparaginase e L-glutaminase de uso terapêutico (Meena, Anburajan, Sathish *et al.*, 2015), foram isolados do solo, sendo este ambiente considerado promissor na obtenção destas enzimas. Estudos de prospecção de microrganismos alvo em ambientes pouco explorado, são promissores tanto na descrição de novas espécies, quanto na descoberta de novas moléculas bioativas.

Nosso estudo foi realizado com actinobactérias rizosféricas da planta *Aniba parviflora* Syn *Fragans* (macacaporanga), espécie da família Lauraceae, tendo o seu representante mais conhecido *Aniba roseodora* (pau rosa), espécie mais explorada durante a colonização do Brasil visto sua aplicação na indústria cosmética devido a suas propriedades aromáticas (Tranchida *et al.*, 2008). Estudos com foco na prospecção de actinobactérias isoladas de *Aniba parviflora* produtoras de substâncias antitumorais não foram relatados na literatura, sendo então, aqui apresentamos pela primeira vez a presença de espécies de *Streptomyces* sp. isolados de macacaporanga capazes de produzir a enzima antitumoral L-glutaminase.

A capacidade de actinobactérias rizosféricas em produzir L-glutaminase em meio sólido também foi observada por , sendo que das 57 actinobactérias isoladas com potencial enzimático na produção de L-asparaginase e L-glutaminase, 89,5% produziram apenas a enzima L-glutaminase. A habilidade destes microrganismos em colonizar substratos contendo com única fonte nutricional o aminoácido L-glutamina, demonstra a versatilidade metabólica na produção de enzimas extracelulares.

**Tabela 2.** Características bioquímicas das actinobactérias isoladas do solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *fragrans* (Macacaporanga - MPO).

Característica	Linhagem de <i>Streptomyces</i> sp.				
	MPO2	MPO6	MPO8	MPO9	MPO11
Fermentação de glicose	+	+	+	+	+
Fermentação de sacarose	+	+	+	+	+
Fermentação de lactose	+	+	+	+	+
Produção de H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-
Amilase	-	+	+	+	+
Caseinase	+	-	+	+	+
Lipase	+	+	+	-	+
Hemolisina	+	+	+	-	+
L - glutaminase	+++	++	++	-	-
Utilização de fonte de carbono					
D-manose	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	+	-
D-manitol	+	+	+	+	-
D-melezitose	-	+	+	+	+
D-sacarose	+	+	+	+	+
D-glicose	+	+	+	+	+
D-celulose	+	++	+	++	-
D-frutose	+	++	+	+	++
Utilização de fonte de nitrogênio					
L-tirosina	+	+	+	+	+
L-ornitina	+	+	+	+	+
L- glutamina	+	+	+	+	+
L-histidina	+	-	+	+	+
L-valina	+	+	+	+	+
L-asparagina	+	+	+	+	+
L-metionina	++	-	+	+	-
L-arginina	++	++	++	++	+
Concentrações de NaCl					
3%	+	+	+	+	+
5%	+	+	+	+	+
7%	+	+	+	+	-
10%	-	-	-	-	-

(+++)  
Altamente positivo; (++) moderadamente positiva; (+) levemente positiva. (-) negativo.

Além das propriedades antitumorais, L-glutaminase apresenta também atividade antiviral contra HIV (PLNSN *et al.*, 2014), e sua utilização na indústria de alimentos é vasta, proporcionando a intensificação de sabor, uma vez que aumenta o teor de ácido glutâmico nos alimentos em decorrência da hidrólise da glutamina.

## Conclusão

Este estudo descreve pela primeira vez a capacidade de três linhagens de *Streptomyces* sp. nativos de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn A. *Fragrans* (macacaporanga) da Amazônia em produzir a enzima antitumoral L-glutaminase.

## Referências

- Escher, SKS 2016. *Bioprospecção de actinobactérias isoladas da rizosfera de Aniba parviflora Syn Fragrans (Macacaporanga) da amazônia e avaliação da atividade antimicrobiana*. Universidade Federal de Pernambuco. (Drº Dissertação, Universidade Federal de Recife. UFRE).
- Fifi MR 2015. Kinetic properties of *Streptomyces canarius* L- Glutaminase and its anticancer efficiency. *Jornal Brasileiro de Microbiologia* 46, 4, 957-968.

- Balagurunathan R, Radhakrishnan M, Somasundaram ST 2010. L-glutaminase Producing *Actinomycetes* from Marine Sediments – Selective Isolation, Semi Quantitative Assay and Characterization of Potential Strain. *Jornal Australiano de Ciência Básica e Aplicada*, 4(5): 698-705,
- Arasu MV *et al.* 2009. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, 19(1):22-28.
- Balagurunathan R, Radhakrishnan M, Somasundaram S 2010. L-Glutaminase producing actinomycetes from marine sediments–selective isolation, semi quantitative assay and characterization of potential strain. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4( ):698-705.
- Batista WB, Nobre SAM, Nobre, PB, Fernandes, BHA, Gomes HAR, Aguiar RM, Melo, GA 2011. Avaliação de actinomicetos com potencial para promoção de crescimento em plântulas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) de diferentes cultivares. *Unimontes Científica*, 12(1/2):60-68.
- Cwala Z, Igbinsosa, EO, Okon AI 2011. Assessment of antibiotics production potentials in four actinomycetes isolated from aquatic environments of the Eastern Cape Province of South Africa. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5: 118-124.
- Dang, CV 2010. Glutaminolysis: supplying carbon or nitrogen or both for cancer cells? *Cell cycle*, 9(1):3884-3886.
- Divya Teja D, Sri Devi V, Harsha, N 2014. Production of L-glutaminase from marine ecosystems and optimal conditions for maximal production by actinomycetes. *International Journal of Advanced Research*, 2:485-491,
- E Silva FDAS, Azevedo, CAV 2009. Principal Components Analysis in the Software Assisat-Statistical Assistance. 7th World Congress on Computers in Agriculture Conference Proceedings, 22-24 June 2009, Reno, Nevada, American Society of Agricultural and Biological Engineers. p.1.
- El-Naggar Nel *et al.* 2015 Optimization of Culture Conditions for Production of the Anti-Leukemic Glutaminase Free L-Asparaginase by Newly Isolated *Streptomyces olivaceus* NEAE-119 Using Response Surface Methodology. *Biomed Res Int*, v. 2015, p. 627031.
- Holt J *et al* 1994. Gram-positive cocci. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Ed. Williams e Wilkins, p. 544-51.
- Jorgensen H *et al* 2010. Insights into the evolution of macrolactam biosynthesis through cloning and comparative analysis of the biosynthetic gene cluster for a novel macrocyclic lactam, ML-449. *Appl Environ Microbiol*, 76(1):283-93.
- Lane D 1991. *16S/23S rRNA sequencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, p. 125-175.
- Meena B *et al* 2015. Novel glutaminase free L-asparaginase from *Nocardiosis alba* NIOT-VKMA08: production, optimization, functional and molecular characterization. *Bioprocess Biosyst Eng*, 38(2):373-88.
- Narayana KJ, Kumar KG, Vijayalakshmi, M 2008. L-asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. *Indian J Microbiol*, 48(3):331-6.
- Nonomura, H, Ohara, Y 1969. The distribution of actinomycetes in soil. VI. A selective plate culture isolation method for *Microbispora* and *Streptosporangium* strains Part I. *J. Ferm. Technol*, 47:463-469.
- Parte A *et al.* 2012. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria*. Springer Science & Business Media.
- Plnsn SD *et al.* 2014. Antitumour property l-glutaminase on from *Aspergillus oryzae* through submerged fermentation. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 3(3):819-823.
- Pridham TG *et al.* 1956. A selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*. *Antibiot Annu*, p. 947-53.
- Saxena A, Upadhyay R, Kango N 2015. Isolation and identification of actinomycetes for production of novel extracellular glutaminase free L-asparaginase. *Indian J Exp Biol*, 53 (12):786-93.
- Shirling ET, Gottlieb D 1966. Method for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst, Citeseer*.
- Stirling D 2003. DNA extraction from fungi, yeast, and bacteria. *Methods Mol Biol*, 226: 53-4.
- Tranchida PQ *et al.* 2008. Analysis of macacaporanga (*Aniba parviflora*) leaf essential oil by using comprehensive two-dimensional gas chromatography combined with rapid-scanning quadrupole mass spectrometry. *Chromatography Today*, p. 5-9.
- Williams S, Sharpe M, Holt J 1989. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 4. Williams and Wilkins, London.

## Seleção e produção de exo ou polissacarídeos microbianos da Amazônia para o uso em Odontologia

Rachid Pinto Zacarias Filho<sup>1</sup>, Ana Paula Coelho Vieira<sup>1</sup>, Simone Assayag Hanan<sup>2</sup>,  
Afonso Duarte Leão de Souza<sup>3</sup>, Antonia Queiroz Lima de Souza<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (BIONORTE), Universidade do Estado do Amazonas – UEA

<sup>2</sup> Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM

<sup>3</sup> Departamento de Química da Universidade Federal do Amazonas – UFAM

<sup>4</sup> Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas – UFAM  
Emails: rachidfilho@hotmail.com, antoniaqlsouza@gmail.com

### Resumo

Nos últimos anos, vem sendo dada importância aos metabólitos produzidos por microrganismos endofíticos, em razão de suas diferentes aplicações biotecnológicas. Entre os polissacarídeos microbianos, o interesse principal encontra-se voltado aos extracelulares ou exopolissacarídeos, por serem biocompatíveis e muitos destes apresentarem atividade antibiótica. Com o objetivo de selecionar e analisar linhagens fúngicas da região Amazônica produtoras de exo e/ou polissacarídeos e avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos frente a patógenos da cavidade oral, foram selecionados e cultivados 20 gêneros de fungos endofíticos e aquáticos, em meio de cultura batata-dextrose (BD), acrescido de 0,2% de extrato de levedura, a  $24 \pm 1^\circ \text{C}$  por 21 a 28 dias. O micélio foi separado por filtração a vácuo e os constituintes fixos extracelulares (meio de cultura fermentado) e intracelulares (micélio) foram extraídos com MeOH. Os microrganismos testados foram: *Staphylococcus aureus* (S007), *Escherichia coli* (E004), *Pseudomonas aeruginosa* (P004), *Enterococcus faecalis* (E002), *Candida albicans* (CC001) e *C. tropicalis* (CC002). As amostras foram solubilizadas na concentração de 2 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO) 10 % + água destilada autoclavada 90 %. O controle negativo usado foi o DMSO 10 % e o positivo, a tetraciclina 2 mg/mL para *E. coli* e *P. aeruginosa*, a ampicilina 2 mg/mL para *S. aureus* e *E. faecalis* e o fluconazol 2 mg/mL para as leveduras. Os ensaios para determinação da atividade antimicrobiana foram realizados em placas de ELISA, a  $36 \pm 1^\circ \text{C}$  por 24 h. Foi colocado 10  $\mu\text{L}$  do revelador NBT a 1 % nos poços com inóculo leveduriforme, e 10  $\mu\text{L}$  de revelador TTC a 1 % nos poços com inóculo bacteriano. Das linhagens testadas, os extratos codificados como TRICHO2 R1A1, ASP1 e PestaPH foram os que apresentaram atividade biológica contra *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *C. tropicalis*, patógenos de interesse odontológico, causadores de infecção endodôntica refratária e candidíase. As linhagens testadas foram promissoras para a obtenção de polissacarídeos com atividade antimicrobiana contra os patógenos mais comuns da cavidade bucal.

**Palavras-chave:** Endófitos, polissacarídeos fúngicos, biomateriais, odontologia.

### Introdução

O Brasil detém cerca de 20% da biodiversidade mundial principalmente na Floresta Amazônica. Apesar da imensa diversidade biológica amazônica, as espécies que a compõem e suas relações filogenéticas são pouco conhecidas, muito menos seus organismos e suas interações com outros seres (Souza *et al.*, 2004). Possivelmente, há inúmeras espécies de plantas, animais e microrganismos ainda por serem descobertas (Oliveira, 2013; Banhos *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, uma importância maior vem sendo dada aos microrganismos associados as plantas, principalmente os endófitos, como fungos e bactérias, que habitam o interior de diferentes tecidos das plantas sem causar danos aparentes ao seu hospedeiro. Embora tenham sido mais investigados a partir do século passado, estes microrganismos só receberam uma maior atenção há pouco mais de vinte anos, quando verificou-se que eles podem desempenhar funções importantes no processo de adaptação da

planta, na proteção do hospedeiro contra herbívoros e patógenos, além de produzir uma infinidade de metabólitos de interesse econômico, tanto primários quanto secundários, os quais apresentam diferentes aplicações biotecnológicas (produção de vacinas, enzimas, antibióticos, antifúngicos, anticancerígenos e outros) (Azevedo e Araújo, 2005; Rodriguez *et al.*, 2009; Porrás-Alfaro e Bayman, 2011; Teiten *et al.*, 2013; Mapperson *et al.*, 2014).

Do ponto de vista ecológico, é extremamente importante elucidar interações entre possíveis simbioses como são os endófitos e as plantas hospedeiras, minimizando assim, o perigo de extinção de algumas espécies vegetais. Dessa forma, a utilização de microrganismos endofíticos representa uma perspectiva de suma importância, garantindo a preservação de espécies vegetais, ao mesmo tempo em que mantém a produção de compostos produzidos pela planta hospedeira. Existem relatos na literatura de que microrganismos endofíticos podem gerar os mesmos compostos produzidos pela planta hospedeira, havendo assim a possibilidade de descobrir novos compostos de valor comercial interessante, além dos já produzidos pela própria planta, como novos antibióticos, antifúngicos, agentes terapêuticos, enzimas, entre outros (Mesquita, 2005; Facundo *et al.*, 2008; Oliveira, 2010).

Os Polissacarídeos (PS) são macromoléculas naturais, constituídas de unidades monossacarídicas unidas por ligações glicosídicas, diferindo entre si na unidade monomérica, no grau de ramificação, no tipo de ligações que as unem e no comprimento de suas cadeias, sendo encontrados em todos os organismos vivos e constituindo um dos grupos de compostos mais abundantes e importantes da biosfera. Constituem uma importante percentagem da biomassa fúngica, onde a parede da hifa é formada por mais de 75 % deste tipo de biomolécula, principalmente em basidiomicetos. Além de atuarem como elemento de suporte para as hifas, alguns -PSs constituem uma “capa” extracelular ao redor do micélio, proporcionando um suporte para adesão das enzimas excretadas (Silva *et al.*, 2006; Freitas *et al.*, 2009; Fukuda *et al.*, 2009).

Na produção de PSs microbianos, o interesse principal é voltado aos PSs extracelulares ou exopolissacarídeos (EPS). Os EPS são produzidos por fungos e bactérias, excretados para o meio de cultura e têm sido reconhecidos como biomacromoléculas de elevado valor agregado.

Na área biológica, os PSs são aplicados em engenharia de tecidos, em processos de imobilização de enzimas e como veículo de liberação de fármacos. Atividades biológicas como ação antiviral, antitumoral, antioxidante, hipoglicemiante, anticoagulante e antitrombótica também vêm sendo investigadas em PSs oriundos de diferentes fontes (Feitosa e Cunha, 2009). Atuação na diminuição da pressão arterial e na concentração de lipídios sanguíneos, na inibição da ação inflamatória e microbiana também têm sido analisadas (Alquini *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006; Freitas *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017).

Desta forma, tornam-se cada vez mais necessárias pesquisas científicas que contribuam para a elucidação de novos compostos de fungos que tenham potenciais aplicações na indústria farmacêutica, tendo em vista que tais microrganismos compreendem uma enorme diversidade de espécies, e a sua aplicação é mais vantajosa já que os processos operacionais são relativamente mais simples. Em comparação com as plantas, os fungos possuem crescimento mais rápido, em menor tempo e ocupam menor espaço, além de ter um menor custo (Borges, 2008).

Neste trabalho, realizou-se a seleção e a análise de linhagens microbianas fúngicas produtoras de EPS e/ou PSs, a fim de avaliar-se a atividade antimicrobiana dos extratos frente a microrganismos patógenos da cavidade oral.

## Material e Métodos

Foram selecionados e cultivados 20 gêneros de linhagens endofíticas e aquáticas, isoladas de espécies Amazônicas e inoculadas em triplicata em frascos Erlenmeyer de 1 L, com 300 mL de meio batata dextrose (Kasvi, Curitiba – PR), com 0,2 % de extrato de levedura (Kasvi, Curitiba – PR) sob condições estéreis.

As amostras foram incubadas de acordo com o desenvolvimento fisiológico de cada gênero, variando de 21 a 28 dias, sob temperatura de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  e retiradas durante a fase estacionária de crescimento, evitando a fase de catálise.

Decorrido o tempo necessário para o crescimento em meio líquido, o micélio foi separado por filtração a vácuo em papel Whatman® n°4 (Sigma-Aldrich Co., Missouri - EUA) em conjunto com funil de Büchner e Kitassato, em cabine de segurança biológica.

Os constituintes fixos extracelulares (meio de cultura fermentado) e intracelulares (micélio) foram extraídos com solvente orgânico conforme descrito: ao meio de cultura foi adicionado metanol (MeOH) resfriado a 4° C na proporção de 1:4 (v/v), sendo, em seguida, mantido por 48 h sob refrigeração. O micélio foi deixado para macerar em MeOH por um período de 48 h em temperatura ambiente, posteriormente filtrado a vácuo e guardado em frascos estéreis. Parte destas amostras foram retiradas, secas em rotaevaporador e pesadas, para avaliação quanto à atividade antimicrobiana.

Os microrganismos testados foram cepas adquiridas da coleção Cefar Diagnóstica (CCCD): *Staphylococcus aureus* (S007), *Escherichia coli* (E004), *Pseudomonas aeruginosa* (P004), *Enterococcus faecalis* (E002), *Candida albicans* (CC001) e *Candida tropicalis* (CC002). As bactérias foram reativadas em Brain Heart Infusion (BHI) e as leveduras em Sabouraud (SB) ambos Ágar (HIMEDIA®), mantidas a 30 °C por 24 e 48 h, respectivamente. Após reativação dos patógenos, uma colônia isolada foi transferida para um tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo BHI para bactérias e caldo SB para levedura, ambos foram mantidos a 36 ± 1°C, sendo as bactérias por 24 h e as leveduras por 48 h. A concentração utilizada foi correspondente a 0,5 na escala de McFarland para as bactérias e o número 6 para as leveduras.

As amostras foram pesadas e solubilizadas na concentração de 2 mg/mL (solução-mãe) em dimetil-sulfóxido (DMSO) 10 % + água destilada autoclavada 90 %. O controle negativo constituiu-se da mesma solução. O controle positivo foi realizado com tetraciclina 2 mg/mL para *E. coli* e *P. aeruginosa*, ampicilina 2 mg/mL para *S. aureus* e *E. faecalis* e fluconazol 2 mg/mL para *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Os ensaios para determinação da atividade antimicrobiana foram realizados em placas de ELISA, nas quais foi adicionado 100 µL do meio de cultura com concentração dobrada, 100 µL da amostra preparada (2 mg/mL) e 10 µL da suspensão de células do patógeno testado, de acordo com a metodologia descrita por Souza (2006). Por fim, as placas de ELISA ficaram incubadas a 36 ± 1°C por 24 h.

A quantidade de 100 µL da amostra preparada foi introduzida em triplicata nos primeiros poços correspondentes a A1, A2 e A3 das placas e assim sucessivamente.

Após 24 h, foi colocado 10 µL do revelador NBT (nitroazul de tetrazólio) a 1 % nos poços com inóculo leveduriforme, e 10 µL de revelador TTC (2,3,5-cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio) a 1 % nos poços com inóculo bacteriano. A leitura foi realizada visualmente observando a alteração de cor proporcionada pela solução. Quando houve crescimento microbiano, o revelador NBT mudou a cor da solução para azul escuro e o TTC para a cor vermelha.

Realizou-se novamente o ensaio biológico, porém com as amostras que apresentaram atividade, por meio de diluições sucessivas para a determinação da dosagem mínima inibitória (MID) onde 100 µL da amostra foi colocada nos primeiros poços, em triplicata (A1, A2, A3) juntamente com 100 µL do meio dobrado. O primeiro poço foi homogeneizado e deste retirou-se 100 µL da solução que foi plaqueada nos poços seguintes (B1, B2, B3) e assim, sucessivamente. Por fim, realizou-se o plaqueamento de 20 µL dos poços que apresentaram atividade.

## Resultados e Discussão

Quanto à avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos frente aos microrganismos patógenos, aqueles que tiveram ação foram: Bas 3M e Bas1, do gênero Basideomiceto; TRICHO2 R1A1, 869, 870, do gênero *Trichoderma*; os extratos dos fungos 877, 878, do grupo de Ascomicetos; 901, 902, 882, 883, 885, 905, 906, com identificação pendente; Asp1, do gênero *Aspergillus* e PestaPH, do gênero *Pestalotiopsis* (Tabela 1).

Os fungos aquáticos, obtidos dos rios da Amazônia, têm seu ciclo de vida completamente adaptado a habitats aquáticos dulcícolas, conforme relataram Shearer *et al.* (2007), e podem ser encontrados sob diversos gêneros, como os quitridiomicetos, ascomicetos, fungos conidiais, basidiomicetos, zigomicetos

**Tabela 1.** Atividade antimicrobiana dos extratos contra os patógenos.

Código fungo	Gênero	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
BAS D14039	B <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-
BAS 3M	B	A	-	A	-	-	-
TRICHO1R1A1	T <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-
TRICHO2 R1A1	T	A	-	A	-	A	A
BAS 1	B	A	-	A	A	-	-
BAS 2	B	-	-	-	-	-	-
BAS 3	B	-	-	-	-	-	-
877	A <sup>6</sup>	A	-	-	-	A	A
878	A	A	-	-	-	A	A
902	IP <sup>5</sup>	A	-	-	-	A	A
882	IP	-	-	-	-	A	A
869	T <sup>2</sup>	-	-	-	-	A	A
906	IP	-	-	-	-	A	A
870	T	-	-	-	-	A	A
883	IP	-	-	-	-	A	A
901	IP	-	-	-	-	A	A
885	IP	-	-	-	-	A	A
905	IP	-	-	-	-	A	A
ASP1	A <sup>3</sup>	A	-	A	-	A	A
PestaPH	P <sup>4</sup>	A	-	A	-	A	A

<sup>1</sup>Basidiomiceto; <sup>2</sup>Trichoderma; <sup>3</sup>Aspergillus; <sup>4</sup>Pestalotiopsis; <sup>5</sup>Identificação pendente; <sup>6</sup>Ascomiceto; - Sem atividade; A Com atividade.

e tricomietos (Bench e White, 2012). Os gêneros oriundos da microbiota Amazônica, sejam eles endofíticos ou aquáticos, apresentam potencial antimicrobiano por meio de compostos bioativos presentes em seus PSs. Representam uma fonte rica de novos compostos químicos com potencial de exploração principalmente na área médica (Strobel *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2017).

Na área de saúde, metabólitos secundários de origem fúngica têm sido utilizados como princípio ativo, ajudando a prevenir e curar inúmeras doenças, como antibióticos e anticancerígenos (Guimarães, 2006; Aly *et al.*, 2010; Kharwar *et al.*, 2011; Kusari, Hertweck e Spiteller, 2012). Estudos destes metabólitos têm demonstrado que novas moléculas produzidas por endófitos (51%) e seus extratos contendo atividades biológicas (80%) ocorrem em número consideravelmente mais elevado do que as produzidas por microrganismos do solo (38% das novas moléculas e 64% de extratos bioativos) (Yang *et al.*, 2013; Silva, 2014).

A cavidade bucal abriga uma variada microbiota, a qual é favorecida pelas características anátomo-fisiológicas desse local, principalmente bactérias e fungos, dentre eles *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus*. As espécies *E. faecalis* e *C. albicans* constituem-se nos principais patógenos associados à infecção pulpar secundária ou persistente, pois podem se manter no sistema de canais radiculares mesmo após tratamento endodôntico, o que poderá induzir uma reação inflamatória tardia (Molina, 2008; Cestari *et al.*, 2013).

Dos gêneros testados, os extratos codificados como TRICHO2, R1A1, ASP1 e Pesta PH foram os que apresentaram atividade biológica contra *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *C. tropicalis*, patógenos de interesse odontológico, causadores de infecção endodôntica refratária e candidíase (Cestari *et al.*, 2013).

## Conclusões

As linhagens testadas foram promissoras para a obtenção de compostos com atividade antimicrobiana contra os patógenos mais comuns da cavidade bucal.

Com este trabalho, tornou-se possível selecionar sete extratos de gêneros de fungos endofíticos e aquáticos, a fim de isolar e identificar seus compostos com propriedades bioativas.

## Agradecimentos

À Central Analítica do Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas e ao Laboratório de Bioensaios e de Microrganismos da Amazônia (LABMICRA). À CAPES – Programa Pró-Amazônia pelo financiamento da pesquisa.

## Referências

- Alquini G, Carbonero ER, Rosado FR, Cosentino C, Iacomini M 2004. Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, 230(1):47-52.
- Aly AH 2010. Fungal endophytes from higher plants: A prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Diversity*, 41:1-16.
- Azevedo JL, Araújo WL 2005. *Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants*. Fungi: Multifaceted Microbes. New Dehli: Anamaya Publication. p.189-207.
- Banhos EF dos, Souza AQL, de Andrade JC, Souza ADL, Koolen HHF, Albuquerque PM 2014. Endophytic fungi from *Myrcia guianensis* at the Brazilian Amazon: distribution and bioactivity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1):153-61.
- Bench ME, White MM 2012. New species and first records of trichomycetes from immature aquatic insects in Idaho. *Mycologia*, 104(1): 295-312.
- Borges WS 2008. *Estudo de fungos endofíticos associados a plantas da família Asteraceae como fontes de metabólitos secundários e em processos de biotransformações*. Ribeirão Preto, Brasil. (Dr Tese. Universidade de São Paulo. USP). 350 p.
- Cestari TN, Vieira KS, Pfau VJM, Pfau EA 2013. Atividade antimicrobiana de agentes tóxicos e químicos utilizados em Odontologia. *Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar*, 17(1):19-22.
- Facundo VA, Polli AR, Rodrigues RV, Militão JSLT, Stabelli RG, Cardoso CT 2008. Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K. *Acta Amazonica*, 38(4):743-8.
- Feitosa JPA, Paula RCM, Cunha PLR 2009. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. *Química Nova*, 32:649-60.
- Freitas F, Alves VD, Pais J, Costa N, Oliveira C, Mafra L, Hilliou L, Oliveira R, Reis MA 2009. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. *Bioresource Technology*, 100(2):859-65.
- Freitas F, Torres CAV, Reis MAM 2017. Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. *Bioresource Technology*, 245(part B):1674-83.
- Fukuda EK, Vasconcelos AFD, Matias AC, Barbosa AM, Deckker RFH, Silva MLC da 2009. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. *Semina Ciências Agrárias*, Londrina, 30(1):117-34.
- Guimarães DO 2006. *Prospecção química e biológica em fungos endofíticos associados a *Viguiera arenaria* (Asteraceae)*. Ribeirão Preto, Brasil. (MSc Dissertação. Universidade de São Paulo. USP). 236p.
- Guo L, Wu JZ, Han T, Cao T, Rahman K, Qin LP 2008. Chemical Composition, antifungal and antitumor properties of ether extracts of *Scapania verrucosa* Heeg. and its endophytic fungus *Chaetomium fusiforme*. *Molecules*, 13(9):2114-25.
- Kharwar RN, Mishra A, Gond SK, Stierle A, Stierle D 2011. Anti-cancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. *Natural Product Reports*, 28 (7):1208-28.
- Kusari S, Hertweck C, Spiteller M 2012. Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. *Chemistry & Biology*, 19(7):792-8.
- Liu J, Wang X, Pu H, Liu S, Kan J, Jin G 2017. Recent advances in endophytic exopolysaccharides: Production, structural characterization, physiological role and biological activity, *Carbohydrate Polymers*, 157(10):1113-24.
- Mapperson RR, Kotiw M, Davis RA, Dearnaley JD 2014. The diversity and antimicrobial activity of *Preussia* sp. endophytes isolated from Australian dry rainforests. *Current Microbiology*, 68 (1):30-7.
- Mesquita JMO, Cavaleiro C, Cunha AP, Lombardi JA, Oliveira AB 2005. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de *Piperaceae*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(1):6-12.

- Molina FP 2008. *Associação de Enterococcus faecalis, Candida albicans e Escherichia coli em canais radiculares e avaliação dos efeitos de extratos naturais sobre os microrganismos e endotoxinas*. São José dos Campos, Brasil. (M.Sc. Dissertação. Universidade Estadual Paulista, UNESP). 110 p.
- Oliveira RL 2010. *Avaliação do Potencial Biotecnológico de Fungos Endofíticos de Piper hispidum*. Manaus, Brasil (MSc Dissertação. Universidade do Estado do Amazonas. UEA). 95p.
- Oliveira MN, Santos TM, Vale HM, Delvaux JC, Cordero AP, Ferreira AB, Miguel PS, Tótola MR, Costa MD, Moraes CA, Borges AC 2013. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. *Canadian Journal of Microbiology*, 59(4): 221- 30.
- Porras-Alfaro A, Bayman P 2011. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annual Review of Phytopathology*, 49: 291-315.
- Rodriguez RJ, White JF Jr, Arnold AE, Redman RS 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182(2):314-30.
- Silva MLC, Martinez PF, Izeli NR, Silva IR, Vasconcelos AFD, Cardoso MS, Stelutti RM, Giese EC, Barbosa AM 2006. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. *Química Nova*, 29(1):85-92.
- Silva IP 2014. *Fungos endofíticos: fonte alternativa a metabólitos secundários de plantas*. Enciclopédia Biosfera: Centro Científico Conhecer, 10(18):3888-905.
- Shearer CA, Raja HA, Smith JP, Descals E, Kohlmeyer B, Kohlmeyer J 2007. Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity Conservation*, 16:49-67.
- Souza AQL, Souza ADL, Astolfi Filho S, Pinheiro MLB, Sarquis MIM, Pereira JO 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens bentham*. *Acta Amazonica*, 34(2):185-95.
- Souza AQL 2006. *Potencial genético e químico dos endófitos de Murraya paniculata L. (Jack)*. São Carlos, Brasil. (Dr Tese. Universidade Federal de São Carlos. UFSCar). 128p.
- Strobel G, Daisy B, Castillo U, Harper J (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, 67 (2):257-68.
- Teiten MH, Mack F, Debbab A, Aly AH, Dicato M, Proksch P, Diederich M 2013. Anticancer effect of altersolanol A, a metabolite produced by the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum*, mediated by its pro-apoptotic and anti-invasive potential via the inhibition of NF-κB activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(13):3850-8.
- Yang M, Wang Y, Liu X, Wu J, Qian J 2013. Study on *Angelica sinensis* endophytic fungi and antibacterial activity. *Advanced Materials Research*, 641-2:816-9.
- Zhang HW, Song YC, Tan RX 2017. Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*, 23(5):753-71.





Ministério da Saúde  
**FIUCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz  
Fiocruz Rondônia



Ministério da Saúde  
**FIUCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz  
Fiocruz Amazônia



**ILMD** INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE  
Fiocruz Amazônia



MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



**PÁTRIA AMADA  
BRASIL**  
GOVERNO FEDERAL

