

Micologia: Fungos e/ou seus Metabólitos como Objeto de Estudo



Benedito Rodrigues da Silva Neto
(Organizador)

Micologia: Fungos e/ou seus Metabólitos como Objeto de Estudo



Benedito Rodrigues da Silva Neto
(Organizador)

2020 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do Texto © 2020 Os autores

Copyright da Edição © 2020 Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação: Camila Alves de Cremo

Edição de Arte: Lorena Prestes

Revisão: Os Autores



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons. Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso

Profª Drª Angeli Rose do Nascimento – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais

Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Carlos Antonio de Souza Moraes – Universidade Federal Fluminense

Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa

Profª Drª Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia

Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá

Prof. Dr. Elio Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima

Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dr. Gustavo Henrique Cepolini Ferreira – Universidade Estadual de Montes Claros

Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie di Maria Ausiliatrice

Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense

Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso

Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins

Prof. Dr. Luis Ricardo Fernandes da Costa – Universidade Estadual de Montes Claros

Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Universidade Federal do Maranhão

Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará

Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste

Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador

Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará

Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Prof. Dr. William Cleber Domingues Silva – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos – Universidade Federal da Grande Dourados
Prof^a Dr^a Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof^a Dr^a Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará
Prof^a Dr^a Girelene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof^a Dr^a Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa
Prof^a Dr^a Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof^a Dr^a Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília
Prof^a Dr^a Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Prof^a Dr^a Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília
Prof^a Dr^a Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof^a Dr^a Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Fernando José Guedes da Silva Júnior – Universidade Federal do Piauí
Prof^a Dr^a Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof^a Dr^a Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas
Prof^a Dr^a Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof^a Dr^a Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma
Prof^a Dr^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá
Prof^a Dr^a Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora
Prof^a Dr^a Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof^a Dr^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto

Prof. Dr. Alexandre Leite dos Santos Silva – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Luciana do Nascimento Mendes – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá
Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Conselho Técnico Científico

Prof. Me. Abrão Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
Prof. Me. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza
Prof. Me. Adalto Moreira Braz – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba
Prof. Me. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Profª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Profª Drª Andrezza Miguel da Silva – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Prof. Dr. Antonio Hot Pereira de Faria – Polícia Militar de Minas Gerais
Profª Ma. Bianca Camargo Martins – UniCesumar
Profª Ma. Carolina Shimomura Nanya – Universidade Federal de São Carlos
Prof. Me. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Ma. Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo
Profª Drª Cláudia Taís Siqueira Cagliari – Centro Universitário Dinâmica das Cataratas
Prof. Me. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará
Profª Ma. Daniela da Silva Rodrigues – Universidade de Brasília
Profª Ma. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Me. Douglas Santos Mezacas – Universidade Estadual de Goiás
Prof. Dr. Edwaldo Costa – Marinha do Brasil
Prof. Me. Eduardo Gomes de Oliveira – Faculdades Unificadas Doctum de Cataguases
Prof. Me. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
Prof. Me. Euvaldo de Sousa Costa Junior – Prefeitura Municipal de São João do Piauí
Profª Ma. Fabiana Coelho Couto Rocha Corrêa – Centro Universitário Estácio Juiz de Fora
Prof. Dr. Fabiano Lemos Pereira – Prefeitura Municipal de Macaé
Prof. Me. Felipe da Costa Negrão – Universidade Federal do Amazonas
Profª Drª Germana Ponce de Leon Ramírez – Centro Universitário Adventista de São Paulo
Prof. Me. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária
Prof. Dr. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná
Prof. Me. Gustavo Krahl – Universidade do Oeste de Santa Catarina
Prof. Me. Helton Rangel Coutinho Junior – Tribunal de Justiça do Estado do Rio de Janeiro
Profª Ma. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Me. Javier Antonio Albornoz – University of Miami and Miami Dade College
Profª Ma. Jéssica Verger Nardeli – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Prof. Me. Jhonatan da Silva Lima – Universidade Federal do Pará
Prof. Me. José Luiz Leonardo de Araujo Pimenta – Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria Uruguay
Prof. Me. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco

Profª Ma. Juliana Thaisa Rodrigues Pacheco – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Kamilly Souza do Vale – Núcleo de Pesquisas Fenomenológicas/UFPA
Profª Drª Karina de Araújo Dias – Prefeitura Municipal de Florianópolis
Prof. Dr. Lázaro Castro Silva Nascimento – Laboratório de Fenomenologia & Subjetividade/UFPR
Prof. Me. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Ma. Lilian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará
Profª Ma. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ
Profª Drª Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás
Prof. Me. Lucio Marques Vieira Souza – Secretaria de Estado da Educação, do Esporte e da Cultura de Sergipe
Prof. Me. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados
Prof. Dr. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual do Paraná
Prof. Dr. Michel da Costa – Universidade Metropolitana de Santos
Prof. Dr. Marcelo Máximo Purificação – Fundação Integrada Municipal de Ensino Superior
Prof. Me. Marcos Aurelio Alves e Silva – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo
Profª Ma. Marileila Marques Toledo – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Prof. Me. Ricardo Sérgio da Silva – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Me. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
Profª Ma. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Profª Ma. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo
Prof. Me. Tallys Newton Fernandes de Matos – Faculdade Regional Jaguaribana
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)
M619 Micologia [recurso eletrônico] : fungos e/ou seus metabólitos como objeto de estudo / Organizador Benedito Rodrigues da Silva Neto. – Ponta Grossa, PR: Atena, 2020. Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-65-5706-161-9 DOI 10.22533/at.ed.619200207 1. Micologia. 2. Fungos. I. Silva Neto, Benedito Rodrigues da. CDD 589.2
Elaborado por Maurício Amormino Júnior CRB6/2422

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
 contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

Micologia é o estudo de microrganismos eucariontes que possuem parede celular rígida, membrana e organelas, apresentando aspectos leveduriformes e/ou filamentos morfológicamente. Trata-se, portanto, de uma área de estudo ampla que atrai diversos pesquisadores em diferentes campos científicos, tecnológicos e industriais.

Sabemos que os fungos são microrganismos que possuem uma diversidade de características únicas que refletem em seu modo de vida, nas suas interações e na sua aplicabilidade. A grande maioria das espécies fúgicas ainda é um vasto campo de estudo para os micologistas, assim como suas características individuais e formas de desenvolvimento no ambiente ou no hospedeiro

O Brasil é uma referência em se tratando de estudos em micologia, principalmente na subárea que denominamos micologia médica, tanto pelos pesquisadores precursores quanto pela nova geração armada com as evoluções biotecnológicas e moleculares. O uso de estratégias biotecnológicas tem sido primordial na pesquisa com fungos. A vasta diversidade fúngica apresenta grande potencial, principalmente associada à estudos de aplicações biotecnológicas, como no campo ambiental, farmacêutico, industrial, agrícola, alimentício, genômico dentre outros.

É um privilégio organizar e compartilhar conhecimento na obra “Micologia: fungos e/ou seus metabólitos como objeto de estudo” publicada pela editora Atena, por se tratar de um material extremamente interessante e muito bem produzido por seus autores que evidencia essa área tão importante. Como pesquisador da área desejo que esse primeiro volume seja apenas o início e que desperte o interesse dos acadêmicos atraindo pesquisadores da micologia médica e áreas correlatas para publicação em novos volumes com esse foco.

Desejo à todos uma excelente leitura!

Benedito Rodrigues da Silva Neto

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 1

A DISSEMINAÇÃO DA ESPOROTRICOSE ZOONÓTICA PELO BRASIL E PELO NORDESTE BRASILEIRO:
UMA REVISÃO INTEGRATIVA

Jayne Omena de Oliveira

Laís Nicolly Ribeiro da Silva

Davi Porfírio da Silva

Rodrigo José Nunes Calumby

Rossana Teotônio de Farias Moreira

DOI 10.22533/at.ed.6192002071

CAPÍTULO 2 11

AÇÃO DE COMPOSTOS DE *Piper aduncum* L. NA INIBIÇÃO DA GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS DE HORTALIÇAS

Ananda dos Santos Vieira

Solange de Mello Véras

André Correa de Oliveira

Rita de Cassia Saraiva Nunomura

DOI 10.22533/at.ed.6192002072

CAPÍTULO 3 22

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF MUSHROOM (AGARICALES) EXTRACTS FOR CONTROL OF *Fusarium
graminearum*

Marina Giombelli Rosenberger

Roberta Paulert

Vagner Gularde Cortez

DOI 10.22533/at.ed.6192002073

CAPÍTULO 4 32

ATIVIDADES BIOLÓGICAS E PROSPECÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE
Duroia macrophylla HUBER (RUBIACEAE)

Juliana Gomes de Souza Oliveira

Cecilia Veronica Nunez

DOI 10.22533/at.ed.6192002074

CAPÍTULO 5 44

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE *Monascus ruber* FRENTE AO RESÍDUO DE SORVETE

Vitória Cristina Santiago Alves

Emanuella Maria da Conceição

Sarah Signe do Nascimento

Thales Henrique Barbosa de Oliveira

Luana Maria Cavalcanti Teixeira

Hugo Marques Galindo

Renata Aczza Alves Cândido

Norma Buarque de Gusmão

DOI 10.22533/at.ed.6192002075

CAPÍTULO 6 47

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Pleurotus eryngii* (DPUA 1816) A PARTIR DA BATATA-
DOCE CASCA ROXA

Cleudiane Pereira de Andrade

Aldiane Passos de Oliveira

Luana Araújo Martins
Rafael Lopes e Oliveira
Larissa de Souza Kirsch

DOI 10.22533/at.ed.6192002076

CAPÍTULO 7 58

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA SUSCEPTIBILIDADE DE *CANDIDA ALBICANS* AO FLUCONAZOL UTILIZANDO DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Edinaira Sulany Oliveira de Sousa
Silviane Pinheiro
João Vicente Braga de Sousa
Ana Cláudia Alves Cortez

DOI 10.22533/at.ed.6192002077

CAPÍTULO 8 60

CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Candida* ISOLADAS DA MUCOSA ORAL DE PACIENTES PRÉ E PÓS-CIRURGIA PARA IMPLANTE DENTÁRIO

Eulélia Antônio de Barros
Vivianny Aparecida Queiroz Freitas
Andressa Santana Santos
Carolina Rodrigues Costa
Antonio Márcio Teodoro Cordeiro Silva
Milton Camplesi Junior
Fábio Silvestre Ataides

DOI 10.22533/at.ed.6192002078

CAPÍTULO 9 72

CRESCIMENTO DE CRYPTOCOCCUS GATTII EM MEIO DE CULTURA FEITO A PARTIR DE SERRAPILHEIRA DO SOLO DA FLORESTA AMAZÔNICA

Silviane Bezerra Pinheiro
Edinaira Sulany Oliveira de Souza
João Vicente Braga de Souza

DOI 10.22533/at.ed.6192002079

CAPÍTULO 10 74

ESTUDO SOBRE A DIVERSIDADE DE FUNGOS ZOOSPÓRICOS QUE OCORRERAM NO LAGO DO PURAQUEQUARA, MANAUS, AMAZONAS

Jean Ludger Barthelemy
Maria Ivone Lopes Da Silva

DOI 10.22533/at.ed.61920020710

CAPÍTULO 11 98

FATORES DE VIRULÊNCIA DE LEVEDURAS DO GÊNERO *CANDIDA* EM CAVIDADE BUCAL E PRÓTESES DENTÁRIAS DE IDOSOS DE UMA UNIDADE BÁSICA DE SAÚDE – TEFÉ – AM

Ellen Roberta Lima Bessa
Daniela Marinho da Silva
Giselle Diniz Guimarães da Silva
Fernando José Herkrath
Ormezinda Celeste Cristo Fernandes

DOI 10.22533/at.ed.61920020711

CAPÍTULO 12	103
ISOLAMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS E PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO DO MICRO-ORGANISMO ISOLADO <i>Aspergillus</i> sp. MB 2.7 PARA PRODUÇÃO DE LIPASES	
Mábilli Mitalli Correia de Oliveira Adeline Cristina Pereira Rocha Barbhara Mota Marinho Vivian Machado Benassi	
DOI 10.22533/at.ed.61920020712	
CAPÍTULO 13	115
OCORRÊNCIA DE FUNGOS ASSOCIADOS AO TRATO DIGESTIVO DE ABELHAS SEM FERRÃO <i>Melipona seminigra</i> MERRILLAE COCKERELL, 1919	
João Raimundo Silva De Souza Melquiades De Oliveira Costa Maria Ivone Lopes Da Silva Carlos Gustavo Nunes Da Silva	
DOI 10.22533/at.ed.61920020713	
CAPÍTULO 14	123
INFLUÊNCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>CYMBOPOGON FLEXUOSUS</i> SOBRE A SUSCETIBILIDADE E FATORES DE VIRULÊNCIA DE LEVEDURAS DO COMPLEXO <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>	
Lucas Daniel Quinteiro de Oliveira Lúcia Kioko Hasimoto e Souza Maria do Rosário Rodrigues Silva Benedito Rodrigues da Silva Neto	
DOI 10.22533/at.ed.61920020714	
CAPÍTULO 15	134
PRINCIPAIS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E DE AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE <i>Candida</i> sp.	
Regiane Nogueira Spalanzani Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos-Weiss	
DOI 10.22533/at.ed.61920020715	
CAPÍTULO 16	149
SCREENING DE FUNGOS FILAMENTOSOS VOLTADO PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS	
Inaiá Ramos Aguiar Mônica Stropa Ferreira-Nozawa	
DOI 10.22533/at.ed.61920020716	
CAPÍTULO 17	157
SELEÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS PRODUTORES DE LIPASE	
Vitória Cristina Santiago Alves Fábio Figueiredo de Oliveira Marcela Vanessa Dias da Costa Sarah Signe do Nascimento Joenny Maria da Silveira de Lima Cristina Maria de Souza-Motta	
DOI 10.22533/at.ed.61920020717	
SOBRE O ORGANIZADOR.....	161
ÍNDICE REMISSIVO	162

CAPÍTULO 1

A DISSEMINAÇÃO DA ESPOROTRICOSE ZOONÓTICA PELO BRASIL E PELO NORDESTE BRASILEIRO: UMA REVISÃO INTEGRATIVA

Data de aceite: 01/06/2020

Data de submissão: 23/04/2020

Jayne Omena de Oliveira

Universidade Federal de Alagoas Maceió –
Alagoas

<http://lattes.cnpq.br/9310170533694308>

Laís Nicolly Ribeiro da Silva

Universidade Federal de Alagoas Maceió -
Alagoas

<http://lattes.cnpq.br/7328503872503669>

Davi Porfírio da Silva

Universidade Federal de Alagoas Maceió -
Alagoas

<http://lattes.cnpq.br/2075807860933282>

Rodrigo José Nunes Calumby

Universidade Federal de Alagoas Maceió -
Alagoas

<http://lattes.cnpq.br/4983598747086439>

Rossana Teotônio de Farias Moreira

Universidade Federal de Alagoas Maceió –
Alagoas

<http://lattes.cnpq.br/0930200680636809>

por transmissão zoonótica, envolvendo, principalmente, os felinos domésticos. A partir desta época, a epidemia da doença cresceu pelo território brasileiro, atingindo, inclusive, a região Nordeste. Este trabalho teve o objetivo de avaliar a produção científica sobre a disseminação da esporotricose no Brasil e no Nordeste. Trata-se de um estudo bibliográfico, descritivo, tipo revisão integrativa, com busca de artigos entre os meses de agosto a setembro de 2019, nas bases de dados LILACS e MEDLINE, através da BVS e na SciELO, utilizando-se os descritores em Ciências da Saúde Esporotricose, Gatos e Brasil. Dos quinze e nove artigos resgatados, incluíram-se dezesseis estudos, publicados entre os anos de 2001 a 2019. As publicações incluídas tiveram como objetivo analisar, descrever e relatar sobre a disseminação da esporotricose por transmissão zoonótica no Brasil e em algum estado do nordeste brasileiro. Evidencia-se que a esporotricose é uma doença que está presente em todo o território nacional, embora seja perceptível a baixa quantidade de informações sobre casos de esporotricose no nordeste brasileiro.

PALAVRAS-CHAVE: Esporotricose; Gatos domésticos; Transmissão zoonótica; Nordeste brasileiro.

RESUMO: A esporotricose é uma micose subcutânea que, classicamente, está associada à inoculação traumática do fungo, o *Sporothrix schenckii*, na pele. No entanto, desde a década de 1990, no Brasil, ocorrem surtos da doença

BRAZIL: AN INTEGRATIVE REVIEW

ABSTRACT: Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis that, classically, is associated with traumatic inoculation of the fungus, *Sporothrix schenckii*, on the skin. However, since the 1990s, in Brazil, outbreaks of the disease by zoonotic transmission have occurred, mainly involving domestic cats. As of this time, the epidemic of the disease has grown throughout Brazil, reaching even the Northeast region. This work aimed to evaluate the scientific production on the spread of sporotrichosis in Brazil and in the Northeast. This is a bibliographic, descriptive, integrative review type study, with a search for articles between the months of August and September 2019, in the LILACS and MEDLINE databases, through the BVS and SciELO, using the descriptors in Sciences Health Sporotrichosis, Cats and Brazil. Of the eighty-nine articles retrieved, sixteen studies were included, published between 2001 and 2019. The publications included were aimed at analyzing, describing and reporting on the spread of sporotrichosis by zoonotic transmission in Brazil and in some state in the northeast of Brazil. It is evident that sporotrichosis is a disease that is present throughout the national territory, although the low amount of information on sporotrichosis cases in northeastern Brazil is noticeable.

KEYWORDS: Sporotrichosis; Domestic cats; Zoonotic transmission; Brazilian Northeast.

1 | INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea de caráter zoonótico que vem se disseminando pelo Brasil ao longo dos anos. É causada por um complexo de espécies de fungos saprófitas, denominado complexo *Sporothrix schenckii*, que crescem no solo, em espinhos, vegetação em decomposição e em cascas de árvores (MARQUES-MELO et al., 2014; SILVA et al., 2015; MONTEIRO; TANENO; NEVES, 2008; XAVIER et al., 2004; FALCÃO et al., 2019; NOBRE et al., 2002; BARROS et al., 2001). Dessa forma, jardineiros, agricultores e horticultores estão mais sujeitos a adquirirem a doença devido à maior exposição e contato com o solo (SILVA et al., 2015; BARROS et al., 2001; LARSSON, 2011; SILVA et al., 2012; BARROS et al., 2008; MONTENEGRO et al., 2014; BARROS et al., 2004), além de animais como os felinos, que devido ao seu hábito de cavar, enterrar suas excretas no solo, afiar suas unhas e sua relação conflituosa com outros gatos, tornam-se potencialmente mais acometidos pela micose (MARQUES-MELO et al., 2014; LARSSON, 2011; GALATI et al., 2017).

Nessa perspectiva, após a infecção do animal, há o aparecimento de lesões ulceradas na pele com a presença de exsudato rico em carga fúngica, sendo essa a principal característica da esporotricose no felino, transformando-o num importante meio de transmissão zoonótica da doença a outros animais, como o próprio ser humano (MARQUES-MELO et al., 2014; SILVA et al., 2015; XAVIER et al., 2004; BARROS et

al., 2001; LARSSON, 2011; BARROS et al., 2008; MONTENEGRO et al., 2014; BARROS et al., 2004; GALATI et al., 2017). Desse modo, após a mordedura ou arranhadura do felino contaminado, pode-se desenvolver dois tipos de lesões características, a saber: as lesões cutâneas, que podem permanecer fixas no local de entrada do fungo, acompanhar o trajeto dos vasos linfáticos adjacentes ou ainda surgir em locais diferentes do corpo; e a forma extra-cutânea, que acomete especialmente o pulmão (LARSSON, 2011; SILVA et al., 2015).

Classicamente, a transmissão da esporotricose está associada à inoculação traumática do fungo na pele (MARQUES-MELO et al., 2014; BARROS et al., 2001; BARROS et al., 2008). No entanto, nos últimos anos, é possível observar um crescimento de surtos de esporotricose pela transmissão zoonótica, em especial no Brasil (MONTEIRO; TANENO; NEVES, 2008; FALCÃO et al., 2019; BARROS et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013).

Dessa forma, em alguns estados brasileiros, como no Rio de Janeiro, essa doença atingiu níveis epidêmicos, seja devido ao alto índice de animais nas ruas ou pela sua subnotificação (FALCÃO et al., 2019; SILVA et al., 2009; BARROS et al., 2010; CORDEIRO et al., 2011). Em outros estados, principalmente os da região sul e sudeste, já provocou várias hospitalizações e atualmente, recobre uma maior área do solo brasileiro, alcançando inclusive o nordeste, atingindo estados como Alagoas, Bahia, Pernambuco e Paraíba (MARQUES-MELO et al., 2014; FALCÃO et al., 2019).

Nesse sentido, esse artigo tem a finalidade de descrever a disseminação da esporotricose no Brasil e sua recente chegada ao Nordeste.

2 | MÉTODOS

Trata-se de um estudo bibliográfico, de caráter descritivo, tipo revisão integrativa de literatura. Para tanto, seguiu-se as seguintes etapas: (1) Elaboração da pergunta norteadora; (2) Busca ou amostragem na literatura; (3) Coleta de dados; (4) Análise crítica dos estudos incluídos; (5) Discussão dos resultados; (6) Apresentação da revisão integrativa (SOUZA; SILVA; CARVALHO, 2010).

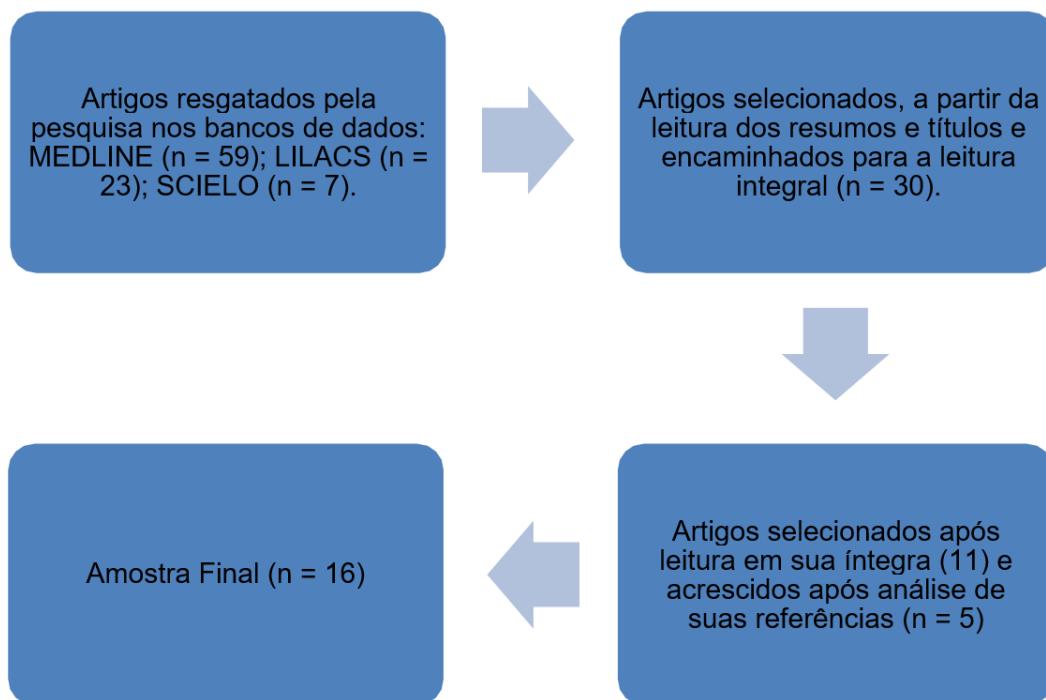
Norteou-se este estudo pela seguinte pergunta: O que se têm escrito, na literatura mundial, sobre a disseminação da esporotricose no Brasil e no Nordeste?

A seleção dos artigos ocorreu entre os meses de agosto a setembro de 2019, nas bases de dados Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), Literature and Retrieval System on Online (MEDLINE), por meio da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e na biblioteca Scientific Electronic Library Online (SciELO). Utilizou-se a combinação dos Descritores em Ciências da Saúde (Decs) Esporotricose, Gatos e Brasil, separados pelo operador booleano AND.

Estabeleceram-se como critérios de inclusão artigos disponibilizados nas bases de dados citadas, disponíveis na íntegra, nos idiomas português, inglês ou espanhol e que

apresentassem familiaridade e relevância com a pergunta norteadora. Não houve recorte temporal. Excluíram-se publicações duplicadas, cartas ao editor, editoriais e notas prévias (SILVA et al., 2018).

Resgataram-se 89 artigos. Por meio da leitura dos títulos e dos resumos foram selecionados 30, porém, após a leitura na íntegra, para confirmar a inclusão dos estudos, foram selecionados 11, que posteriormente foram submetidos a uma análise de suas referências, a fim de identificar novos estudos que não tenham sido contemplados, somando-se assim, mais 5 estudos na amostra (SILVA et al., 2018), conforme mostra o fluxograma 1.



Fluxograma 1: Seleção dos estudos incluídos na revisão. Maceió, Al, Brasil, 2020.

Nesse sentido, a extração dos dados dos 16 artigos selecionados ocorreu através de uma tabela, elaborada no programa Microsoft Word, que contemplou país de origem, ano de publicação, delineamento, título, objetivo e resultados dos estudos. Ademais, os estudos selecionados foram classificados em níveis de evidência, a saber: Nível 1- evidências resultantes da meta- análise de múltiplos estudos clínicos controlados e randomizados; - Nível 2: evidências obtidas em estudos individuais com delineamento experimental; - Nível 3: evidências de estudos quase-experimentais; - Nível 4: evidências de estudos descritivos (não-experimentais) ou com abordagem qualitativa; Nível 5: evidências provenientes de relatos de caso ou de experiência; - Nível 6: evidências baseadas em opiniões de especialistas (SOUZA; SILVA; CARVALHO, 2010). Posteriormente realizou-se a análise dos dados.

3 | RESULTADOS

Para saber sobre a disseminação da esporotricose pelo Brasil, incluíram-se dezesseis estudos nos idiomas português ($n = 10$) e inglês ($n = 6$), publicados entre os anos de 2001 a 2019 no Brasil. A figura 1 apresenta a síntese dos estudos incluídos e contempla título, autores, objetivo, delineamento do estudo e nível de evidência.

Título	Autores	Objetivo	Delineamento do Estudo	Nível de Evidência
Hospitalizações e óbitos relacionados à esporotricose no Brasil (1992-2015)	FALCÃO et al.	Analizar a distribuição da esporotricose pelas hospitalizações e óbitos no Brasil, utilizando dados do sistema único de saúde.	Estudo observacional, exploratório e qualitativo	Nível 4
Ocorrência familiar de esporotricose zoonótica	CORDEIRO et al.	Relatar a ocorrência simultânea da doença em 3 membros de uma mesma família através da arranhadura por gato doméstico infectado.	Relato de Caso	Nível 5
Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia	BARROS et al.	Relatar a evolução e os desafios da esporotricose no Rio de Janeiro, Brasil	Estudo descritivo e observacional	Nível 4
Esporotricose felina com envolvimento humano na cidade de Pelotas, RS, Brasil	XAVIER et al.	Relatar e documentar caso de esporotricose felina na cidade de Pelotas (RSBrasil) com envolvimento zoonótico	Relato de Caso	Nível 5
Felino doméstico como agente transmissor de esporotricose para humano: relato do primeiro caso no estado de Alagoas	MARQUES-MELO et al.	Relatar o primeiro caso de esporotricose em felino doméstico com envolvimento zoonótico no estado de Alagoas, Brasil	Relato de Caso	Nível 5
Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil	SILVA et al.	Descrever a ocorrência da epidemia de esporotricose humana em residentes de área urbana no Estado do Rio de Janeiro no período de 1997-2007	Estudo exploratório, observacional e qualitativo	Nível 4
Sporotrichosis – cat as the source of familial infection outbreak in Guarulhos, São Paulo: a case report	GALATI et al.	Relatar a ocorrência de esporotricose em um gato na Cidade de Guarulhos, São Paulo	Relato de Caso	Nível 5
Feline sporotrichosis due to <i>Sporothrix brasiliensis</i> : na emerging animal infection in São Paulo, Brazil	MONTENEGRO et al.	Relatar a epidemiologia molecular da <i>Sporothrix</i> como patógeno emergente entre felinos na região metropolitana de São Paulo	Estudo Experimental, descritivo e qualitativo	Nível 2

Sporotrichosis: an Emergent Zoonosis in Rio de Janeiro	BARROS et al.	Relatar a epidemia emergente de esporotricose no Rio de Janeiro, Brasil	Estudo Observacional, descritivo e qualitativo	Nível 4
An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases	BARROS et al.	Relatar e descrever a ocorrência da esporotricose em 255 indivíduos no estado do Rio de Janeiro, Brasil	Estudo observacional, descritivo e qualitativo	Nível 4
Molecular identification of <i>Sporothrix</i> species involved in the first familial outbreak of sporotrichosis in the state of Espírito Santo, south eastern Brazil	OLIVEIRA et al.	Relatar a caracterização molecular de amostras coletadas no primeiro surto familiar de esporotricose no estado do Espírito Santo, Brasil.	Estudo Experimental, descritivo e qualitativo	Nível 2
Surto de esporotricose em gatos – investigação e ações de controle, município de São Paulo/SP	SILVA et al.	Descrever a investigação e as medidas de controle utilizadas pela Coordenação de Vigilância em Saúde, da Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo, acerca da esporotricose no estado.	Estudo observacional, descritivo e qualitativo	Nível 4
Esporotricose	LARSSON, C.E	Descrever a cerca da esporotricose, abordando suas principais características	Estudo observacional, descritivo e qualitativo	Nível 4
Esporotricose em felinos domésticos	MONTEIRO; TANENO; NEVES.	Descrever os achados clínicos da esporotricose em gatos domésticos, seu diagnóstico, prevenção e tratamento, além de alertar sobre seu potencial zoonótico	Estudo observacional, descritivo e qualitativo	Nível 4
Esporotricose zoonótica na região sul do Rio Grande do Sul (Brasil) e revisão da literatura brasileira	NOBRE et al.	Descrever casos de esporotricose felina com transmissão para humanos ocorridos na região sul do Rio Grande do Sul, Brasil.	Relato de Caso	Nível 5
Cat-Transmitted Sporotrichosis Epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: Description of a Series of Cases	BARROS et al.	Descrever dados clínicos e epidemiológicos de 178 pacientes com esporotricose durante o período de 1998-2001 no estado do Rio de Janeiro, Brasil.	Relato de Caso	Nível 5

Figura 1: Caracterização dos estudos incluídos conforme título, autores, objetivo, delineamento do estudo e nível de relevância. Maceió, AL, Brasil. 2020.

Destaca-se que as publicações incluídas tiveram como objetivo analisar, descrever e relatar sobre a disseminação da esporotricose por transmissão zoonótica, em especial por felinos domésticos infectados, em todo o território brasileiro, com predomínio na região

sudeste.

4 | DISCUSSÃO

A chegada da esporotricose ao Brasil

O *Sporothrix schenkii*, fungo causador da esporotricose, possui distribuição mundial, porém apresenta preferência por países que possuem climas tropicais e subtropicais (MARQUES-MELO et al., 2014; SILVA et al., 2015; MONTEIRO; TANENO; NEVES, 2008; BARROS et al., 2001; LARSSON, 2011; BARROS et al., 2008; MONTENEGRO et al., 2014), o que torna a esporotricose uma doença epidêmica em alguns países da América latina e América do Sul (Silva et al., 2015; BARROS et al., 2001; MONTENEGRO et al., 2014).

Embora muitos países tenham relatado casos e surtos de esporotricose, em nenhum outro lugar do mundo essa zoonose alcançou proporções tão significativas como no Brasil, registrando seu primeiro surto epidêmico no Rio de Janeiro durante a década de 1990. Posteriormente, sua ocorrência foi relacionada como uma doença de transmissão zoonótica, em que os gatos domésticos eram os principais animais envolvidos (MARQUES-MELO et al., 2014; SILVA et al., 2015; MONTEIRO; TANENO; NEVES, 2008; FALCÃO et al., 2019; BARROS et al., 2001; BARROS et al., 2008; MONTENEGRO et al., 2014; BARROS et al., 2004; BARROS et al., 2010; GALATI et al., 2017).

A doença começou a se espalhar de modo que, passados oito anos do primeiro caso de esporotricose por transmissão felina, mais de 900 pessoas já haviam sido diagnosticadas e mais de 3.000 gatos estavam infectados apenas no estado do Rio de Janeiro (BARROS et al., 2010). Além disso, no período de 1992 a 2015, todos os estados brasileiros, com exceção de Roraima, apresentaram ocorrências de hospitalizações devido à esporotricose por transmissão zoonótica, sendo os maiores índices nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Goiás (FALCÃO et al., 2019).

Ademais, entre os anos de 1998 e 2015, ocorreram 682 hospitalizações em 302 municípios brasileiros, das quais, 612 hospitalizações tiveram a esporotricose como diagnóstico primário, sendo a forma pulmonar a mais prevalente, com o total de 220 casos. Nesse sentido, o medicamento de escolha para o tratamento dessa micose trata-se do itraconazol, por apresentar poucos efeitos adversos e boa eficácia. Por outro lado, para aqueles que não apresentam melhora clínica com essa medicação, o iodeto de potássio mostra- se como ótima alternativa (BARROS et al., 2010; FALCÃO et al., 2019).

Ainda que, classicamente, a esporotricose seja uma micose com predominância em área rurais, onde há envolvimento com o trabalho agrícola e manipulação do solo, no Brasil, ao final da década de 90, ainda era uma doença pouco conhecida, especialmente quando transmitida de forma não usual por felinos domésticos. Desse modo, a falta de

conhecimento dos profissionais da saúde associado à ineficiência dos serviços laboratoriais, que não estavam preparados para atender a uma demanda tão grande, foram fatores que auxiliaram na crescente epidemia da esporotricose pelo Brasil (BARROS et al., 2010; MARQUES-MELO et al., 2014; FALCÃO et al., 2019; BARROS et al., 2001).

A chegada da esporotricose ao Nordeste brasileiro

Após o surto epidêmico iniciado no estado do Rio de Janeiro durante a década de 1990, a esporotricose por transmissão felina acabou por se espalhar por todo o território brasileiro, atingindo, inclusive, o nordeste, embora os casos da doença sejam mais evidentes nas regiões sul e sudeste. Desse modo, há relatos, ainda que escassos, de casos ou de hospitalizações de esporotricose zoonótica nos estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco, Paraíba e Sergipe. (MARQUES-MELO et al., 2014; FALCÃO et al., 2019).

Entre os estados do Nordeste, Pernambuco tem apresentado a maior ocorrência de surtos de esporotricose (SILVA, 2018). Casos esporádicos desta doença eram notificados de forma ocupacional em indivíduos de área rural. No entanto, nos últimos 5 anos, há uma percepção de aumento do número de casos por transmissão zoonótica, em que indivíduos relatam contato com felinos doentes, especialmente na capital Recife e em Olinda (CIEVS/PE, 2018). Esta modificação coincidiu com o aumento de casos de esporotricose felina no estado e motivou a Secretaria Estadual de Saúde a incluir esta micose na lista de doenças de notificação compulsória (PERNAMBUCO, Portaria SES/PE, 2015).

Nesse sentido, Silva et al. (2018) realizaram estudo experimental em hospitais veterinários e relataram a ocorrência de surto de esporotricose felina na Região Metropolitana do Recife. Avaliando-se os casos ocorridos entre março de 2014 e fevereiro de 2016, observou-se que das 115 amostras suspeitas, 59 foram positivas para esporotricose, correspondendo a um percentual de 51,3%. Em outro estudo, Silva (2018), determinou as características clínicas, epidemiológicas e a resposta terapêutica dos casos de esporotricose humana em Pernambuco diagnosticados no período de março de 2017 a março de 2018 e observou um percentual elevado de casos desta doença no estado. No período pesquisado, foram atendidos no ambulatório de referência 131 pacientes com suspeita clínica de esporotricose, havendo confirmação diagnóstica em 111 pacientes (84,7%), confirmado esta micose como um problema crescente de saúde pública neste estado.

O aumento do número de casos zoonóticos de esporotricose pode estar associado à presença de muitos felinos nas ruas, que, por vezes, são abandonados por seus antigos proprietários (MARQUES-MELO et al., 2014). Somado a isso está o fato de que essa doença não é de notificação compulsória, sendo somente notificada em Pernambuco, Paraíba e no município de Camaçari, na Bahia (FALCÃO et al., 2019).

Ressalta-se que no nordeste brasileiro, a esporotricose, como doença zoonótica, foi responsável por hospitalizações nos estados da Paraíba e da Bahia. Além disso, provocou

um óbito no estado da Bahia e no estado de Sergipe (FALCÃO et al., 2019).

5 | CONCLUSÃO

Evidencia-se que a esporotricose por transmissão zoonótica é uma casuística relevante no Brasil e que se caracteriza por uma doença que está presente em todo o território nacional, em especial na região sudeste. Embora seja perceptível a baixa quantidade de registros de casos de esporotricose no nordeste brasileiro, esse fato precisa ser melhor investigado, considerando-se que o estado de Pernambuco tenha apontado uma maior frequência de episódios, antes inexistentes. Dessa forma, é necessário mais estudos sobre a temática, a fim de ampliar os conhecimentos, permitindo, assim, uma análise real do seu impacto na região nordeste.

REFERÊNCIAS

- BARROS, M. B. L. et al. **Sporotrichosis: an Emergent Zoonosis in Rio de Janeiro.** Mem Inst Oswaldo Cruz. V. 96, n.6, p. 777-779, 2001. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762001000600006>. Acesso em: 05 set. 2019.
- BARROS, M. B. L. et al. **Cat-Transmitted Sporotrichosis Epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: Description of a Series of Cases.** Clinical Infectious Diseases. V. 38, n. 4, p. 529-535, 2004. Disponível em:<<https://academic.oup.com/cid/article/38/4/529/352030>>. Acesso em: 05 set. 2019.
- BARROS, M. B. L. et al. **An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases.** Epidemiol. Infect. V. 136, p. 1192-1196, 2008. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2870916/>>. Acesso em: 18 set. 2019.
- CIEVS/PE – Centro de Informações estratégicas de Vigilância em Saúde de Pernambuco.
Boletim Esporotricose Humana. 2018. Disponível em: <https://docs.wixstatic.com/ugd/3293a8_4076b337ef7a4681885bbea9fa1d6aa1.pdf>. Acesso em: 17abr. 2020.
- CORDEIRO, F. N. et al. **Ocorrência familiar de esporotricose zoonótica.** An. Bras. Dermatol. V. 86, n.4, p. 121-124, 2011. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962011000700032>. Acesso em: 08 set. 2019.
- FALCÃO, E. M. M. et al. **Hospitalizações e óbitos relacionados à esporotricose no Brasil (1992-2015).** Cad. Saúde Pública. V. 35, n. 4, 2019. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2019000406002>. Acesso em: 08 set. 2019.
- GALATI, L. H. H. et al. **Sporotrichosis – cat as the source of familiar infection outbreak in Guarulhos, São Paulo: a case report.** Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. V . 54, n. 4, p. 439-444, 2017. Disponível em:<https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:Bl9GNz1mXMUJ:https://www.revistas.usp.br/bjvras/article/download/133772/138248/+&cd=2&h_l=pt-BR&ct=clnk&gl=br>. Acesso em: 05 set. 2019.
- LARSSON, C. E. **Esporotricose.** Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. V. 48, n. 3, p. 250-259, 2011. Disponível em: <<https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:7yitoE5yG0IJ:https://www.revistas.usp.br/bjvras/article/download/34389/37127/+&cd=2&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br>>. Acesso em: 05 set. 2019.
- MARQUES-MELO, E. H. et al. **Felino doméstico como agente transmissor de esporotricose para**

humano: relato do primeiro caso no estado de Alagoas. Rev. Baiana de Saúde Pública. V.38, n.2, p.490-498, Salvador, 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/276859084_Felino_domestico_como_agente_transmissor_de_esporotricose_para_humano_relato_do_primeiro_caso_no_estado_de_Alagoas>. Acesso em: 18 set. 2019.

MONTEIRO, H. R. B.; TANEO, J.C.; NEVES, M. F. **Esporotricose em felinos domésticos.** Rev. Cient. Eletrônica de Medicina Veterinária. V. 6, n. 10, 2018. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/images_arquivos/arquivos_destaque/vQG71uhM09YIxit_2013-5-29-10-19-35.pdf>. Acesso em: 18 set. 2019.

MONTENEGRO, H. et al. **Feline sporotrichosis due to Sporothrix brasiliensis: na emerging animal infection in São Paulo, Brazil.** BCM Vet. Res. V.10, n. 269, 2014. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4244058/>>. Acesso em 05 set 2019.

NOBRE, M. O. et al. **Esporotricose zoonótica na região sul do Rio Grande do Sul (Brasil) e revisão de literatura brasileira.** Rev. Bras. Cien. Vet. V. 9, n. 1, p. 36-41, 2002. Disponível em:<<http://doi.editoracubo.com.br/10.4322/rbcv.2015.347>>. Acesso em: 18 set. 2019.

OLIVEIRA, M.M.E. et al. **Molecular identification of Sporothrix species involved in the first familial outbreak of sporotrichosis in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz . V. 108, n. 7, p. 936-938, 2013. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762013000700936. Acesso em: 05 set. 2019.

PERNAMBUKO. Portaria SES/PE Nº. 279 de 23 de julho de 2015. **Acrescenta doenças, agravos e eventos estaduais à Lista Nacional de Doenças de Notificação Compulsória e dá outras providências.** Recife, Pernambuco, 2015.

SILVA, C. E. F. **Esporotricose humana em Pernambuco: apresentação clínica, identificação e sensibilidade das espécies, avaliação dos testes diagnósticos e resposta terapêutica.** Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE, 2018. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/33234/1/TESE%20Cl%c3%a1 udia%20Elise%20Ferraz%20Silva.pdf>>. Acesso em: 17 abr. 2020.

SILVA, D.P. et al. **Infecções fúngicas em prematuros por leveduras do gênero malassezia.** Rev. Enferm. UFPE online. V. 12, n. 10, p. 2836-43, 2018. Disponível em:<<https://periodicos.ufpe.br/revistas/revistaenfermagem/article/view/236345>>. Acesso em: 06 jul. 2019.

SILVA, E. A. et al. **Surto de esporotricose em gatos – investigação e ações de controle, município de São Paulo/SP.** Boletim Epidemiológico Paulista. V. 12, n.133, p. 1-16, 2015. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/ccd/homepage/bepa/edicao-2015/edicao_133_-janeiro.pdf?attach=true>. Acesso em: 18 set. 2019.

SILVA, G. M. et al. Surto de esporotricose felina na região metropolitana do Recife. Brazilian Journal of Veterinary Research, v. 38, n. 9, p. 1767-1771, 2018. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v38n9/1678-5150-pvb-38-09-1767.pdf>>. Acesso em: 17 abr. 2020.

SILVA, M. B. T. et al. **Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil.** Cad. Saúde Pública. V. 28, n.10, p.1867-1880, 2012. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2012001000006>. Acesso em: 12 set. 2019.

SOUZA, M.T.; SILVA, M. D.; CARVALHO, R. **Revisão Integrativa: o que é e como fazer.** Rev. Einstein. V.8, n.1, p. 102-6, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/eins/v8n1/pt_1679-4508-eins-8-1-0102.pdf. Acesso em: 19 maio 2019.

XAVIER, M.O. et al. **Esporotricose felina com envolvimento humano na cidade de Pelotas, RS, Brasil.** Cien. Rural. V. 34, n. 6, p. 1961-1963, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782004000600047&script=sci_abstract&tlang=pt>. Acesso em: 08 set. 2019.

AÇÃO DE COMPOSTOS DE *Piper aduncum* L. NA INIBIÇÃO DA GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS DE HORTALIÇAS

Data de aceite: 01/06/2020

Data de submissão: 06/03/2020

Ananda dos Santos Vieira

Universidade Federal do Amazonas - Faculdade de Ciências Agrárias
Manaus - Amazonas
<http://lattes.cnpq.br/7183779928476044>

Solange de Mello Véras

Universidade Federal do Amazonas-Faculdade de Ciências Agrárias
Manaus-Amazonas
<http://lattes.cnpq.br/9714755543865522>

André Correa de Oliveira

Universidade Federal do Amazonas - Laboratório de Abertura de Amostras e Ensaios Químicos
Manaus - Amazonas
<http://lattes.cnpq.br/6365703429939147>

Rita de Cassia Saraiva Nynomura

Universidade Federal do Amazonas - Laboratório de Abertura de Amostras e Ensaios Químicos
Manaus - Amazonas
<http://lattes.cnpq.br/4964432473792729>

theobromicola) e a cercosporiose da alface (*Cercospora longissima*) estão entre os principais problemas fitossanitários desses cultivos no Estado. O uso de compostos de *Piper aduncum* poderá ser mais uma alternativa para o manejo eficiente de doenças de plantas. O estudo objetivou avaliar o efeito das frações do extrato vegetal e do óleo essencial de *P. aduncum* sobre a germinação de conídios dos fitopatógenos. Os fungos foram coletados em áreas de produção na região de Manaus e cultivados em meio BDA. A verificação da patogenicidade foi realizada mediante Postulado de Koch, utilizando-se 5 mudas de cada hortaliça. As folhas para a preparação do óleo e frações foram coletadas na rodovia BR-174. O extrato aquoso foi obtido pela maceração a frio de folhas verdes; o extrato etanólico foi obtido por intermédio da maceração a frio de folhas secas com etanol; o óleo essencial foi extraído das folhas pelo método de hidrodestilação; as frações hexânica e clorofórmica, por meio do fracionamento dos extratos aquoso e o etanólico pelo processo de partição por solventes. As análises foram realizadas pelo método da bioautografia, em placas de CCD fase normal, sendo feito em triplicata. O óleo essencial inibiu o desenvolvimento de *C. theobromicola* e *A. japonica* nas concentrações de 100, 50 e 10

RESUMO: A produção de hortaliça sofre com diversos problema fitossanitários, que variam em função de uma série de fatores. A mancha-de-alternaria da couve (*Alternaria japonica*), a antracnose da cebolinha (*Colletotrichum*

mg.mL⁻¹, o fator de retenção para *C. theobromicola* foi de Rf=0,27; Wb- 1 cm, Rf=0,22; Wb- 0,7 cm e Rf=0,24; Wb- 2,6 cm e, para *A. japonica*, de Rf=0,14; Wb- 1,6 cm, Rf=0,1; Wb- 1,6 cm e Rf=0,37; Wb- 1,7 cm. O óleo essencial e os extratos não tiveram efeito frente *C. longissima*. Concluiu-se que o óleo tem potencial para ser utilizado no manejo das doenças.

PALAVRAS-CHAVE: Antagonismo; bioautografia; extrato aquoso

ACTION OF *Piper aduncum* L. COMPOUNDS IN INHIBITING THE GERMINATION OF SPORES OF PLANT PATHOGENIC FUNGI

ABSTRACT: Vegetable production suffers from several phytosanitary problems, which vary according to a number of factors. Cabbage leaflet (*Alternaria japonica*), chives anthracnose (*Colletotrichum theobromicola*) and lettuce cercosporiosis (*Cercospora longissima*) are among the main phytosanitary problems of these crops in the State. The use of *Piper aduncum* compounds may be another alternative for the efficient management of plant diseases. The study aimed to evaluate the effect of fractions of plant extract and essential oil of *P. aduncum* on the germination of conidia of phytopathogens. Fungi were collected in production areas in the Manaus region and grown in BDA culture. The verification of pathogenicity was performed using Koch's Postulate, using 5 seedlings of each vegetable. The leaves for the preparation of oil and fractions were collected on the BR-174 highway. The aqueous extract was obtained by cold maceration of green leaves; the ethanolic extract was obtained through cold maceration of dry leaves with ethanol; the essential oil was extracted from the leaves by the hydrodistillation method; the hexane and chloroform fractions, by fractioning the aqueous and ethanolic extracts by the solvent partition process. The analyzes were carried out by the bioautography method, in normal phase CCD plates, being done in triplicate. The essential oil inhibited the development of *C. theobromicola* and *A. japonica* at concentrations of 100, 50 and 10 mg.mL⁻¹, the retention factor for *C. theobromicola* was Rf = 0.27; Wb - 1 cm, Rf = 0.22; Wb - 0.7 cm and Rf = 0.24; Wb- 2.6 cm and, for *A. japonica*, Rf = 0.14; Wb - 1.6 cm, Rf = 0.1; Wb - 1.6 cm and Rf = 0.37; Wb - 1.7 cm. The essential oil and extracts had no effect on *C. longissima*. It was concluded that the oil has the potential to be used in the management of diseases.

KEYWORDS: Antagonism; bioautography; aqueous extract

1 | INTRODUÇÃO

O Estado do Amazonas é grande importador de hortaliças de outras regiões do País, essa produção, principalmente por agricultores familiares, serve para consumo e complementação de renda dessas famílias e tem importante contribuição para o abastecimento do mercado local (SILVA et al., 2018).

Em um estudo sobre a comercialização e produção de hortaliças orgânicas e convencionais em Manaus, Santiago e Gentil (2014) verificaram que os principais

municípios produtores de hortaliças do Estado são Iranduba, Rio Preto da Eva e a capital Manaus, além de Presidente Figueiredo e Manacapuru.

Dentre as culturas de importância econômica para a agricultura familiar no Estado do Amazonas destacam-se a cebolinha-verde (*Allium fistulosum* L.), sendo uma hortaliça amplamente conhecida e aceita pela população brasileira, utilizada como condimento no preparo de alimentos, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do país (SOUZA et al., 2015). No Estado do Amazonas, os últimos dados de 2017 mostram que a produção foi de 273.577,40 mil maços (IDAM, 2017). As altas temperaturas associadas a alta umidade relativa do ar são fatores favoráveis à disseminação de diversos fitopatógenos, em plantas cultivadas, no estado do Amazonas.

Dentre as doenças fúngicas destaca-se a antracnose, causada pelo fungo, *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *cepae* Penz., o qual sobrevive no solo, em restos de culturas e nas sementes, podendo ser disseminado a longas distâncias.

Por este motivo este é um gênero de grande importância na produção agrícola, sendo responsável por causar danos em diversas culturas economicamente importantes. É provável que todos as cultivares de alimentos plantados ao redor do mundo sejam susceptíveis a uma ou mais espécies de *Colletotrichum* (KANEMARU, 2017). Na região de Manaus, Santanta et. al (2016) identificaram mais uma espécie de *Colletotrichum* causando antracnose em cebolinha, o *Colletotrichum spaethianum* (Allesch.) Damm, P. F. Cannon & Crous. Almeida et. al (2017), identificaram *Colletotrichum brevisporum* Phouliv., Noireung, L. Cai & K.D. Hyde infectando plantas de pimenta malagueta em Manacapuru, no Amazonas, mostrando a variabilidade do fungo e adaptabilidade em vários tipos de hospedeiros.

A couve manteiga (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) é uma hortaliça arbustiva anual ou bienal, cujo consumo no Brasil tem gradativamente aumentado devido às novas maneiras de utilização na culinária e às recentes descobertas da ciência. Luengo et al. (2018) quantificou minerais em folhas de couves, no Distrito Federal, fornecidos através da adubação refletindo diretamente na obtenção de teores mais equilibrados de minerais para as plantas e para a dieta humana.

A mancha de alternaria é causada por mais de uma espécie de fungo do gênero *Alternaria* (*Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc e *A. brassicicola* (Schwn.) Wilt.). O patógeno é transmitido por sementes, causando danos desde a fase de plântula. Os sintomas são caracterizados inicialmente por pequenas manchas circulares de coloração marrom-escura e circundadas por um halo amarelado, a *A. brassicicola* produz pequenas lesões negras, pontuais que se fundem. A *A. brassicae*, caracteriza-se por lesões castanhas de maior tamanho, nas quais se desenvolve uma massa castanha escura de esporos (AGOSTINHO et al., 2016). A correta identificação do patógeno consiste no primeiro passo para realização do manejo da doença por ele causado, pois auxilia em novas estratégias de controle e nas corretas recomendações de produtos a serem aplicados às sementes e

plantas (CARVALHO et al., 2014).

Em meio das hortaliças folhosas, a alface (*Lactuca sativa* L.) está entre as dez mais produzidas e consumidas no Brasil. Em 2017, a produção no Amazona foi de 60.421,63 mil pés, considerando plantio convencional e hidropônico, mostrando a grande aceitação na mesa dos consumidores (IDAM, 2017). A cercosporiose, causada por *Cercospora longissima* (Cugini) Sacc., é uma das principais doenças da alface. O patógeno se desenvolve em grande variação de temperatura e sua disseminação ocorre por meio de sementes infectadas ou através de vento e água.

Pesquisas desenvolvidas com extrato bruto ou óleo essencial, obtidos de plantas medicinais, têm indicado o potencial dos mesmos no controle de fitopatógenos, segundo Costa et al. (2008) as propriedades antimicrobianas de substâncias presentes em extratos e óleos essenciais produzidos pelas plantas são reconhecidas empiricamente há séculos.

Nesse sentido, a espécie *P. aduncum* já teve comprovada atividade antagônica contra fungos fitopatogênicos em diversos estudos *in vitro* e *in vivo*, sendo também a mais investigada quanto a sua composição química e efeito antifúngico do óleo volátil (LIMA, 2012).

A bioautografia é uma das técnicas mais importantes para a separação e avaliação da atividade antimicrobiana de compostos vegetais. Esta técnica consiste na separação do composto do extrato por cromatografia em papel ou em camada delgada e posterior revelação utilizando-se os efeitos biológicos da substância de interesse (KANEMARU, 2017).

O uso de compostos de *P. aduncum* poderá ser uma alternativa para o manejo eficiente de doenças de plantas, com consequente redução do custo de produção e proteção do meio ambiente, homem e animais dos efeitos adversos causados pelos agrotóxicos. A avaliação da atividade positiva das moléculas oriundas dos seus compostos pode trazer informações substanciais no controle da doença, podendo ser um controle efetivo e ecologicamente aceito.

O estudo objetivou analisar a ação de compostos de *Piper aduncum* na inibição da germinação de *Alternaria japonica*, *Colletotrichum theobromicola* e *Cercospora longissima*.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Os trabalhos foram desenvolvidos nos laboratórios: Princípios Bioativos de Origem Microbiana e Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas – Ufam e casa-de-vegetação da Faculdade de Ciências Agrárias da Ufam.

2.1 Material vegetal

Folhas de *Piper aduncum* foram coletadas no km 8 da BR-174, Município de Manaus – AM e identificadas de acordo com registro depositado no Herbário HUAM/UFAM sob o

2.2 Obtenção e isolamento de fitopatógenos

Os fungos fitopatogênicos foram obtidos a partir de folhas de couve, cebolinha-verde e alface apresentando sintomas, como manchas foliares em propriedades rurais na região de Manaus-AM e na feira do Mercado Adolfo Lisboa.

O isolamento dos fungos foi realizado pelo método indireto (ALFENAS, et al., 2007). O material infectado foi lavado com água corrente, retirados fragmentos das margens das lesões e desinfetados em álcool 70% por 30 seg., hipoclorito de sódio 1% por 30 seg., seguido de duas lavagens em água destilada.

Os fragmentos foram depositados em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) a 27 °C, com fotoperíodo de 12 horas. Ao meio de cultura foi acrescido o antibiótico cloranfenicol ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), para evitar contaminação com bactérias.

2.3 Teste de patogenicidade

Para avaliar a patogenicidade dos fungos, foi realizada todas as etapas do postulado de Koch. A inoculação foi realizada em mudas de couve, cebolinha e alface das mesmas variedades em que os fungos foram isolados. Foi preparada uma suspensão de inóculo na concentração de 10^6 conídios/ mL^{-1} e pulverizada na superfície das folhas. A suspensão de esporos foi preparada partir de cada uma das colônias das espécies, por meio da adição de 10 mL de água destilada esterilizada nas placas, seguida da raspagem da colônia e filtragem em gaze, com posterior contagem do número de esporos/ cm^2 com auxílio de uma câmara de Neubauer no microscópio ótico.

Após a inoculação as plantas foram mantidas em câmara úmida, durante 48 horas. A avaliação foi feita pela observação do surgimento dos sintomas típicos das doenças nas plantas, com posterior reisolamento do fungo para a confirmação da etiologia. A identificação das espécies de *C. theobromicola* e *A. japonica* foi realizada, através da análises morfocultural e molecular.

2.4 Preparação do extrato e obtenção do óleo essencial

No Laboratório de Abertura de Amostras e Ensaios Químicos (LAEQ/UFAM) foram seguidas as metodologias descritas pelos pesquisadores (REEGAN et al., 2014; ALI et al., 2015) com algumas modificações. Foi usado o sistema de extração pelo clevenger com balão de capacidade de 4 L e manta aquecedora com ajuste de temperatura até 100°C. Separadamente foram usados 258 g do material vegetal moídos e 1 L de água destilada para a extração do óleo essencial.

Os volumes obtidos das extrações do óleo essencial foram lidos a cada 15 minutos durante o tempo de 1h, contabilizados a partir do momento da fervura da água.

Terminadas as extrações, o volume do óleo essencial foi aferido diretamente no

aparelho clevenger através de uma escala volumétrica existente no aparelho. Por fim, o óleo essencial foi pesado em balança analítica, armazenado em 2 ependorfs de 2 mL e mantidos em refrigeração constante a uma temperatura de -5°C até ser utilizado no estudo.

Os extratos vegetais foram obtidos através do processo de maceração utilizando 250 g do material vegetal moído. O material vegetal foi colocado dentro de um frasco tipo Mariotte com capacidade de 4L, em seguida, foi adicionado 3L do solvente metanol com grau de pureza analítica. Por conseguinte, o frasco foi lacrado, identificado e deixado em repouso por dez dias em local protegido da umidade e luz do sol (MADHIYAZHAGAN et al., 2014).

Terminado o prazo da maceração, o extrato foi filtrado utilizando papel de filtro Whatman No. 1 para a separação da parte líquida e parte sólida. A remoção do solvente foi através de evaporador rotativo a 40°C, o extrato bruto, devidamente seco, foi coletado e armazenado separadamente em um Becker de 50 mL e mantido sobre refrigeração a temperatura de 4°C até serem utilizados nos bioensaios. (MUNUSAMY et al., 2016).

2.5 Bioautografia

A identificação dos constituintes bioativos contra os fitopatógenos, foi investigada, por meio da técnica de bioautografia direta, de acordo com o método de Hamburger e Hostettmann (1991) modificado. Duas placas de sílica gel TLC sílica gel 60 RP-18 de marca Merck foram inoculadas com uma suspensão uma suspensão de inoculo na concentração de 1×10^5 conídios/mL em meio líquido de BDA e outra placa foi inoculada apenas com a suspensão de esporo borrifada sobre as placas.

Todas as placas preparadas do óleo essencial foram reveladas com vanilina sulfúrica e aquecidas em estufa por 3 minutos, as placas tanto do óleo quanto das frações foram colocadas sob luz ultravioleta para serem observadas em comprimentos de onda de 365 nm.

A comparação entre as placas foi realizada por meio da determinação do fator de retenção (R_f) dos compostos com atividade antifúngica. O experimento foi realizado em triplicata.

$$R_f = dc / ds$$

dc = distância percorrida pelo componente da mistura

ds = distância percorrida pelo eluente

2.6 Obtenção das fases

Foi pesado 20 mg do extrato, em seguida colocado dentro de becker (500 mL) acrescido de 100 mL MeOH/H₂O (Metanol) na proporção 90:10. Em seguida, a amostra solubilizada foi colocada dentro de um funil de partição de 1 L. Por conseguinte, foram acrescidos ao funil 100 mL de hexano (processo repetido 3x). Em seguida, foi feita a agitação manual e

coletada a fração hexânica. Terminado esse processo, foram acrescentados 100 mL de CHCl₃ (clorofórmio) (processo repetido 3x) e mais 30 mL de H₂O. Posteriormente feita a coleta da fração clorofórmica.

2.7 Efeito das frações hexânica e clorofórmica do extrato etanólico na inibição da germinação de conídios, por meio da bioautografia.

Nessa fase, foi preparado dois sistema de eluentes:

1. Hexano/acetato (7:3) v/v de etila para análise da fase hexânica (extrato etanólico)
2. Diclorometano/Iso-Propanol (9:1) v/v para análise da fração clorofórmica

Foram avaliadas as concentrações de 100, 50, 10 e 5 mg.mL⁻¹. Uma alíquota de cada amostra foi aplicada em placas TLC sílica gel, descritas anteriormente, com suporte de alumínio a uma distância de 1,0 cm entre as amostras. Como controle negativo foi usado uma solução de Nistatina (100 mL). As placas foram aspergidas individualmente com suspensão de inóculo das espécies fúngicas na concentração de 1x10⁵ conídios. mL⁻¹, em seguida, colocadas em bandejas, nas quais foram adicionados um chumaço de algodão embebido em água esterilizada e mantidas em câmara de crescimento BOD, sob temperatura de 28,5 °C com fotoperíodo de 12 horas. A avaliação foi realizada, por meio da observação das zonas de inibição ao redor das bandas (separação cromatográfica).

2.8 Efeito do óleo essencial na inibição da germinação de conídios

Neste ensaio foi utilizado o sistema de eluente hexano/diclorometano (5:5) v/v. A metodologia do teste microbiológico seguiu a descrita acima para a avaliação das frações do extrato etanólico. A solução do fungicida Nistatina (100 mL) foi usado como controle positivo. A avaliação foi realizada como descrita anteriormente.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teste de patogenicidade

Os sintomas das doenças começaram a ser observados aos 8 dias em todos os patossistemas, conforme apresentado nas figuras 1 (A, B e C). Aos 15 dias da inoculação, procedeu-se o reisolamento dos fungos para completar os postulados de Koch, momento em que estruturas de *Cercospora longissima* (Figura 2) em folhas de alface, mostravam-se visíveis em microscópio estereoscópico.



Figura 1: Folhas de couve apresentando os sintomas da mancha de *A. japonica* (A), folhas de alface com sintomas de *C. longissima* (B) e folhas de cebolinha apresentando sintomas típicos de antracnose, causadas por *C. theobromicola* (C), todas aos 15 dias após inoculação.

O fungo responsável pela antracnose foliar da cebolinha-verde foi identificado como *Colletotrichum theobromicola* Delacr e o responsável pela mancha-de-alternaria foi o fungo *Alternaria japonica* Yoshii.

3.2 Bioautografia

A inibição do crescimento dos fungos em placas de cromatografia foi avaliada através da análise cromatográfica direta, visando detectar a atividade biológica diretamente sobre as placas de CCD. A quantidade aplicada permitiu observar diferenças na composição química das frações e do óleo essencial de *P. aduncum*, além de sua possível interação com os fungos testados.

3.3 Efeito do óleo essencial na inibição da germinação de conídios

Utilizando a bioautografia identificou-se halos de inibição, não havendo desenvolvimento micelial dos fungos avaliados, nas concentrações do óleo essencial avaliadas. A figura 2 apresenta uma fotografia, obtida após 6 dias de incubação, para o fungo *C. theobromicola* e *A. japonica*.



Figura 2: Placas CCD de *C. theobromicola* e *A. japonica*, mostrando halo de inibição, indicado pelas setas, nas concentrações do óleo essencial de Piper.

O óleo essencial apresentou diferentes fatores de retenção (R_f), no caso dos fungos *C. theobromicola* e *A. japonica*, pois foram os únicos que tiveram inibição em 3 concentrações do óleo de Piper.

Os Rf para os seguintes fungos foram:

C. theobromicola

Banda 1- Rf=0,27; W_b= 1cm

Banda 2- Rf= 0,22; W_b= 0,7 cm

Banda 3- Rf=0,24; W_b= 2,6 cm

A. japonica

Banda 1- Rf= 0,14; W_b = 1,6 cm

Banda 2- Rf= 0,1; W_b=1,6 cm

Banda 3- Rf=0,37; W_b= 1,7 cm

Cada substância possui um fator de retenção próprio, mas não exato, ele pode ter algumas alterações, dependendo das condições com que a cromatografia é feita, combinado a outros valores e fatores pode-se identificar a substância.

Em 2007, Silva e Bastos testaram a atividade antifúngica de outras espécies do gênero *Piper* (*P. callosum*, *P. marginatum* var. *anisatum* *P. enckea*) sobre o crescimento micelial de *Moniliophthora perniciosa* e observaram a inibição em 100% a partir da concentração de 0,75 µL/mL do óleo essencial das espécies de piperáceas.

Segundo TAKEARA et al. (2017), podemos dizer que os óleos essenciais das espécies de *Piper* do Brasil têm muitos usos. Além disso, eles são dotados de atividades biológicas interessantes e têm um potencial terapêutico. Por exemplo, eles exibem atividades antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória e podem ser úteis como remédios naturais além de serem usados na agricultura.

3.4 Efeito das frações hexânica e clorofórmica do extrato etanólico na inibição da germinação de conídios, por meio da bioautografia.

Não foi observado perfil de resistência ao fungicida (Nistatina) utilizado no ensaio. As frações hexânica e clorofórmica não apresentaram atividade, não sendo caracterizada por zonas de inibição da germinação de esporos. No caso de *C. longissima* não foi possível observar inibição em nenhuma concentração tanto das frações quanto do óleo.

Em trabalho mais recente Costa (2018) observou que houve uma zona de inibição nas placas de CCD com diferentes concentrações da fração hexânica de *P. marginatum* frente o fungo *Corynespora cassiicola*, este resultado é importante, pois corrobora com a possibilidade de obtenção de novas substâncias, o que justificaria a atividade antifúngica desta fração. Almeida et. al (2019) testou extrato etanólico de *P. mollicomum* e comprovou a inibição sobre a bactéria *Staphylococcus aureus*.

4 | CONCLUSÃO

O óleo essencial de *Piper* teve efeito sobre o desenvolvimento dos fitopatógenos *C. theobromicola* e *A. japonica*, o que permitiu inferir a existência de alguma substância que inibiu a esporulação dos fungos, através do clareamento nas zonas de inibição.

As frações clorofórmica e hexânica do extrato de *P. aduncum* não apresentaram metabólitos com atividade antimicrobiana frente os fungos *A. japonica*, *C. theobromicola* e *C. longissima* utilizados neste estudo.

Sugere-se futuro isolamento dos fitoconstituintes ativos, presente nas zonas de inibição de esporos do óleo essencial de *P. aduncum*, visando novos ensaios para a identificação da (s) substância (s) antagônica (s).

REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, C; GODINHO, M. C.; PINTO, A. (2016). Rastreio de Alternaria spp. em sementes de brócolos. **Revista da Unidade de Investigação do Instituto Politécnico de Santarém**, 4 (2): 114-125.
- ALFENAS, A. C. et al. Isolamento de fungos fitopatogênicos. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2007. p. 53-90.
- ALI, I.B.H.; CHAOUACHI, M.; BAHRI, R.; CHAIEB, I.; BOUSSAID, M.; HARZALLAH-SKIRI, F. 2015. Chemical composition and antioxidant, antibacterial, allelopathic and insecticidal activities of essential oil of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. **Industrial Crops and Products**. 77: 631-639.
- ALMEIDA, L.B.; MATOS, K.S.; ASSIS, L.A.G; HANADA, R.E. First report of anthracnose of *Capsicum chinense* in Brazil caused by *Colletotrichum brevisporum*. **Plant disease**. v. 101, p. 1035, 2017.
- ALMEIDA, K.P.C; BARROS, A.C.V; PANTOJA, T.M.A.; CAVALCANTE, F.S.; LIMA, R.A. **Revista Gestão e Sustentabilidade Ambiental**, v. 8, n. 3, p. 550-565, jul/set. 2019.
- CARVALHO, D. D. C.; OLIVEIRA, A. M. E.; LAGO, H. M. S.; RODRIGUES, F. Incidência de *Bipolaris bicolor* em sementes de sorgo granífero no Brasil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas-MG, v. 13, n.2, p. 240-247, 2014.
- CAVALCANTE, R. P. et al. Eficiência do extrato de *Piper aduncum* no controle da vassoura de bruxa do cupuaçuzeiro, na Amazônia Central. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.54, p.1-4, 2008.
- COSTA, C. M. G. R. et al. Inibição do crescimento bacteriano in vitro de *Erwinia Carotovora* pelo óleo essencial de alecrim. **Tecnol. & Ciênc. Agropec.** João Pessoa - PB, v.2., n.2, p.7-10, jun. 2008.
- COSTA, S.C.T. Fungos endofíticos e extratos vegetais no controle alternativo da mancha-alvo do tomateiro. 2018. 98 f. **Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical)** - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2018.
- CULTIVO de hortaliças 4. ed. Manaus: IDAM, 2003. 20 p.
- HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the links between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry** 12: 3864-3874, 1991.
- IDAM - **Instituto de Desenvolvimento Agropecuário e Florestal Sustentável do Estado do Amazonas**, 2017.
- JOHANN, S. et al. Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 632-637, 2007.
- KANEMARU, M.Y.S. Determinação do efeito antifúngico de *Phaeosphaeria* sp. isolado de goiaba contra fungos de relevância agroalimentar. **Dissertação (mestrado)** – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2017.
- LEFSRUD M.; KOPSELL D.; WENZEL A.; SHEEHAN J. 2007. Chances in kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) carotenoid and chlorophyll pigment concentrations during leaf ontogeny. **Scientia Horticulturae** 112: 136-141.

LIMA, M.V.L. Atividade do óleo volátil, fases e extrato etanólico de *Piper aduncum L.* contra *Corynespora cassiicola*(Berk. & M. A. Curtis) C.T. Wei, agente causal da mancha-alvo do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). 2012. 62p. **Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical)** -Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.

LUENGO, R. F. A. et al. Determinação de minerais no solo e análise de folhas de couve produzida em Brasília. **Braz. J. Food Technol.**, v. 21, e2017141, 2018.

MADHIYAZHAGAN, P.; MURUGAN, K.; KUMAR, A.N.; NATARAJ, T. 2014. Extraction of mosquitocidals from *Ocimum canum* leaves for the control of dengue and malarial vectors. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**. 4: S549-S55.

MOURA, V. S.; VÉRAS, S.M.; NETO, P.Q.C. Atividade antagônica de compostos de *Piper aduncum L.* na germinação de fungos fitopatogênicos de hortaliças. **Anais - Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental**. 2016.

MUNUSAMY, R.G.; APPADURAI, D.R.; KUPPUSAMY, S.; MICHAEL, G.P.; SAVARIMUTHU, I. 2016. Ovicultural and larvicidal activities of some plants extracts against *Aedes aegypti* L. and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**. 6: 468-471.

RAHMAN, A. et al. Antifungal activity of essential oil and extracts of *Piper chaba* Hunter against phytopathogenic fungi. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 4, p. 573–579, 2011.

REEGAN, A.D.; KANNAN, R.V.; PAULRAJ, M.G.; IGNACIMUTHU, S. 2014. Synergistic effects of essential oils-based cream formulations against *Culex quinquefasciatus* Say and *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**. 17: 327-331.

SANTANA, K. F. A.; GARCIA, C. B.; MATOS, K. S.; HANADA, R.E. First Report of Anthracnose Caused by *Colletotrichum spaethianum* on *Allium fistulosum* in Brazil. **Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia**, Manaus, 69060-001, Amazonas, Brazil.

SANTIAGO, O.M.A.; GENTIL, D.F.O. Estudo comparativo da comercialização de hortaliças orgânicas e convencionais em Manaus, Amazonas. **Rev. Bras. de Agroecologia**, 2014.

SILVA, D.M.; BASTOS, C.N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis perniciosa*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatol. bras.**, Brasília, v.32, n.2, p.143-145.2007.

SILVA, G.F.; SOUSA, N.R. **Embrapa Amazônia Ocidental**. Amazonas, Brazil, 2016.

SILVA, J.R.; GONÇALVES, C.C.; VIANA, F.M.F. Sistema para produção de hortaliças em várzea na Amazônia: experiência da comunidade Costa da Ilha II – Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas. **Cadernos de Agroecologia** – Vol. 13, N° 1, Jul. 2018.

SOUZA, B. P. de; SIMÕES, A. C.; ALVES, G. K. E. B.; FERREIRA, R. L. F.; ARAÚJO NETO, S. E. de. Produtividade e rentabilidade de cebolinha orgânica sob diferentes densidades de plantio e métodos de colheita. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 11, n. 21, p. 1576-1585, maio/jun. 2015.

VÉRAS, S.M. Controle de *Ralstonia solanacearum* raça 2, agente causal do moko da bananeira (*Musa* spp.), por meio de extratos, frações e óleo volátil de *Piper aduncum* L. 2007. 86p. **Tese (Doutorado em Biotecnologia)** - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2007.

VÉRAS, S.M. Doenças de plantas: controles convencionais e alternativos. **Editora EDUA**, 2014.

CAPÍTULO 3

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF MUSHROOM (AGARICALES) EXTRACTS FOR CONTROL OF *Fusarium graminearum*

Data de aceite: 01/06/2020

Data de submissão: 06/03/2020

Marina Giombelli Rosenberger

Universidade Federal do Paraná, Departamento
de Biociências
Palotina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/4220381477915852>

Roberta Paultert

Universidade Federal do Paraná, Departamento
de Ciências Agronômicas
Palotina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/7459733421548622>

Vagner Gularde Cortez

Universidade Federal do Paraná, Departamento
de Biodiversidade
Palotina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/7851346442060529>

from the third to the fifteenth day of mycelial growth were submitted to analysis of variance, and the means were compared by the Tukey test at 5% of probability. Among ten evaluated extracts, six significantly inhibited the growth of *F. graminearum*, namely: *Calvatia rugosa*, *Coprinopsis* sp., *Leucocoprinus cf. brebissonii*, *Leucopaxillus gracillimus*, *Simocybe tucumana* and *Xeromphalina tenuipes*. The results indicate that these four mushroom species produce substances with antifungal activity. On the other hand, the extract of *Pleurotus opuntiae* stimulated mycelial growth of the fungus. When comparing the effect of the extracts with the fungicide Cercobin®, only the *Simocybe tucumana* obtained similar results, proving the antifungal potential of this species.

KEYWORDS: alternative control, Basidiomycota, fusariosis, natural products, phytopathogen.

ABSTRACT: Mushrooms produce a wide variety of bioactive secondary metabolites that may be useful to control phytopathogenic bacteria and fungi. Aiming to verify *in vitro* the antifungal potential against *Fusarium graminearum*, methanolic extracts from the basidiomata of ten mushroom species were obtained. Antifungal activity was evaluated through agar dilution test at a concentration of 1.0 mg ml⁻¹. Data obtained

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATO DE COGUMELOS (AGARICALES) PARA CONTROLE DE *Fusarium graminearum*

RESUMO: Os cogumelos produzem uma ampla variedade de metabólitos secundários bioativos que podem ser úteis no controle de bactérias e fungos fitopatogênicos. O objetivo deste

trabalho foi testar *in vitro* o potencial antifúngico de extratos metanólicos de basidiomas de dez espécies de cogumelos, frente ao fitopatógeno *Fusarium graminearum*. A atividade antifúngica dos extratos foi avaliada pelo teste de diluição em ágar na concentração de 1,0 mg ml⁻¹. Os dados obtidos, do terceiro ao décimo quinto dia de crescimento micelial, foram submetidos à análise de variância, sendo que as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Entre os dez extratos avaliados, seis inibiram significativamente o crescimento de *F. graminearum* sendo: *Calvatia rugosa*, *Coprinopsis* sp., *Leucocoprinus* cf. *brebissonii*, *Leucopaxillus gracillimus*, *Simocybe tucumana* e *Xeromphalina tenuipes*. Os resultados indicam que as quatro espécies de cogumelos produzem substâncias com atividade antifúngica. Entretanto, o extrato de *Pleurotus opuntiae* estimulou o crescimento micelial do fungo. Quando o efeito dos extratos dos cogumelos foi comparado com o fungicida Cercobin®, somente a espécie *Simocybe tucumana* obteve resultados similares, comprovando o potencial antifúngico desta espécie.

PALAVRAS-CHAVE: Basidiomycota, controle alternativo, fitopatógeno, fusariose, produtos naturais.

1 | INTRODUCTION

Several fungi are widely known as responsible for causing diseases in plants, especially members of the genera *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Penicillium* and *Rhizopus* (Aqueveque et al., 2016). Among these, members of *Fusarium* are considered phytopathogens of major importance in agriculture, as they affect several agricultural crops (Ma et al., 2013). Cob fusariosis is one of the most important diseases of wheat crops in the world and is caused mainly by *Fusarium graminearum*, although other species of the genus may cause such disease (Ferrigo et al., 2016). Besides reducing grain production, the fungus produces toxic secondary metabolites (mycotoxins), which can contaminate agricultural products, rendering infected grains unsuitable for human and animal consumption (Alves et al., 2013; Ma et al., 2013).

Excessive use of agrochemicals to control diseases in plants, besides presenting a series of risks of contamination to the environment, can also harm the health of producers and consumers (Domingues et al., 2011; Aqueveque et al., 2016). Thus, must be emphasized the importance of research the use of alternative methods in agriculture that are efficient and generate the minimum environmental impact, such as the use of natural products (Ribas et al., 2016). In addition, resistant phytopathogens may arise to the chemical substances used in the field (Aqueveque et al., 2016), being necessary the search for new substances with antimicrobial properties.

Among the most important sources of bioactive metabolites, the fungi that belong to the phylum Basidiomycota, known as mushrooms, are considered highly promising, since various compounds were isolated from these organisms, presenting various biological

functions, including antifungal activity (Barneche et al., 2016). As for example, the metabolite Favolon B, obtained from the fermentation of mycelial cultures of basidiomycete *Mycena* sp., which presents antifungal activity against species: *Alternaria porri*, *Aspergillus ochraceus*, *Botrytis cinerea*, *Mucor miehei*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium notatum* and *Ustilago nuda* (Aqueveque et al., 2005).

Another example, the strobilurin, a natural product produced by a variety of basidiomycete fungi, such as the species *Oudemansiella mucida* and *Strobilurus tenacellus*. This natural product has become important for controlling a variety of disease-causing fungi in plants, and is currently produced by chemical synthesis for commercialization (Bartlett et al., 2002).

Based on the search for alternative and efficient products to control the growth of microorganisms, this work aimed to test, *in vitro*, the antifungal potential of methanolic extracts from mushrooms collected in the Western of Paraná, southern Brazil, against the phytopathogen *F. graminearum*.

2 | MATERIALS AND METHODS

Basidiomata (i.e., the macroscopic spore-producing bodies of agaricoid basidiomycetes) were collected in fragments of the Semideciduous Seasonal Forest, in Palotina, in the West of Paraná, from October 2016 to May 2017. After collecting, the mushrooms were dehydrated in a chamber with forced air circulation at 40°C until they reached constant weight (Carvalho et al., 2012). After drying, the basidiomata were stored in paper bags for further extraction.

Ten species of mushrooms were selected to perform antimicrobial activity tests, namely: *Calvatia rugosa*, *Coprinopsis* sp., *Leucoagaricus* sp., *Leucocoprinus* cf. *brebissonii*, *Leucopaxillus gracillimus*, *Pleurotus opuntiae*, *Psathyrella* sp., *Psathyrella candolleana*, *Simocybe tucumana* and *Xeromphalina tenuipes*.

Dried basidiomata were ground until a fine powder was obtained and the extraction was carried out with methanol using Soxhlet extractor. Extraction was carried out for approximately 8 hours for each species, completing five cycles in the extractor (Figueiredo & Silva, 2014; Ajith & Janardhanan, 2015). Methanol present in the extracts was evaporated in a rotary evaporator under vacuum at 45°C. Crude extracts were placed in glass jars, and stored at 4°C.

Samples of the fungus *F. graminearum* were kindly supplied by the Universidade Estadual de Maringá (UEM) and stored in Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA). For the experiment, the fungus was transferred onto a new plate containing PDA medium and incubated at 28°C for seven days.

The obtained mushroom extracts were tested against the phytopathogen *F.*

graminearum. The inhibition of micelial growth test (agar dilution test) was used to evaluate the antifungal activity, which consists of incorporating the dissolved extract to the agar; thus, each plate contains a different concentration of the agent (CLSI, 2012).

Culture medium used in the tests was also the PDA, prepared according to the manufacturer's instructions, and the extract of basidiomycetes was added at the end concentration of 1 mg ml⁻¹ before autoclaving the medium. The crude extract was previously solubilized with dimethylsulfoxide (DMSO), as it is a non-toxic solvent (Klaus et al., 2015). As a negative control, was used only the PDA medium plus DMSO, without the addition of the basidiomycete extract. For the positive control, the culture medium plus the fungicide methyl thiophanate (Cercobin®) at a concentration of 1 mg ml⁻¹ (Garcia et al., 2008; Silva et al., 2014).

After agar solidification, a mycelial disc (10 mm diameter) was transferred to the center of the culture medium surface. Petri dishes were kept at a controlled temperature of 28°C (D'addazio et al., 2016). The evaluation of the mycelial growth was performed every 48 hours for 15 days or until the fungus completed the entire diameter of the Petri dish, and the colony diameter (cm) was measured in perpendicularly opposite directions. For each extract, five replicates were performed.

The data were submitted to analysis of variance. The means between the different treatments were compared by the Tukey test at 5% probability. Statistical analyzes were performed in the Sisvar 5.6 Program of the Universidade Federal de Lavras.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

Extracts of the mushroom species *Psathyrella* sp. and *P. candelleana* did not presented significant differences in relation to the negative control, indicating that the extracts of these species did not influence the growth of *F. graminearum*. In contrast to our observations in this study, the extract of *Psathyrella* sp. was reported as active against *Fusarium oxysporum* (Reinoso et al., 2013). These differences between the results may be related to the method of obtaining the extract and also the species used, which certainly are different each other.

For extract of *P. opuntiae* (Table 1) it was observed that from the ninth evaluation day extract started to significantly stimulate the mycelial growth of the fungus *F. graminearum*. As well as reported for the mushroom extract *Agaricus blazei* against *Botrytis cinerea*, where it was verified that the extract had a stimulating effect both on the germination of the conidia and on the mycelial growth (Camili et al., 2009). This fact was also verified when the aqueous extract of coriander (*Coriandrum sativum*) was used in front of the fungus *F. verticillioides*; a significant increase in the conidia production was observed (Barros et al., 2013). The stimulus of mycelial growth or in the production and germination of conidia, may

be related to the presence of substances, which favor the fungi growth and development, such as carbohydrates, proteins, vitamins and even chemical elements.

	3° Day	5° Day	7° Day	9° Day	11° Day	13° Day	15° Day
<i>P. opuntiae</i>	1.80 ⁽¹⁾ b	3.18 b	4.32 a	5.58 a	7.02 a	8.48 a	8.80 a
Negative control	3.02 a	3.68 a	4.30 a	4.88 b	5.56 b	6.12 b	6.90 b
Positive control ⁽²⁾	1.76 b	2.36 c	2.88 b	3.32 c	3.76 c	4.22 c	4.54 c
CV ⁽³⁾ (%)	16.78	6.56	8.05	7.73	4.66	5.51	5.28

Table 1. Methanolic extract effect of *Pleurotus opuntiae* on the mycelial growth of *Fusarium graminearum*.

Means among the different treatments were compared among themselves within the same column by the Tukey 5% test.

⁽¹⁾ Mean diameter of the mycelium in cm. ⁽²⁾ Cercobin fungicide as positive control. ⁽³⁾ Coefficient of variation.

Extract of the species *Calvatia rugosa* significantly inhibited the growth of *F. graminearum* from the fifth day of evaluation (Table 2; Figure 1), with percentages of inhibition varying between 6.2% and 36.4%. Members of the genus *Calvatia* has been studied due to its biological properties, such as antitumor, anticancer, antiviral, antibacterial and antifungal activities (Coetzee & Van Wyk, 2009). Methanolic extract of *Calvatia fragilis* presented antifungal activity against *Candida albicans* and *Candida maltosa*, besides showing antibacterial activity against *B. subtilis*, *Micrococcus flavus* and *Staphylococcus aureus* (Al-Fatimi et al., 2013).

	3°	5°	7°	9°	11°	13°	15°
<i>Calvatia rugosa</i>	ns ⁽¹⁾	26,9 ⁽²⁾	36,4	31,2	17,7	8,0	6,2
<i>Coprinopsis</i> sp.	ns	38,6	38,3	25,1	12,7	6,4	4,7
<i>Leucoagaricus</i> sp.	ns	14,5	16,8	6,8	- ⁽³⁾	-	-
<i>Leucocoprinus cf. brebissonii</i>	ns	ns	ns	9,6	9,7	8,4	7,5
<i>Leucopaxillus gracillimus</i>	11,6	ns	ns	8,0	8,2	4,9	3,3
<i>Xeromphalina tenuipes</i>	ns	13,7	24,3	17,9	7,1	-	-

Table 2. Percentage inhibition of mycelial growth of *Fusarium graminearum* when using the extracts of mushrooms in the 15 days of evaluation.

⁽¹⁾ Not statistically significant. ⁽²⁾ Percentage inhibition of mycelial growth of *F. graminearum*. ⁽³⁾ Mycelial growth of *F. graminearum* already occupied the entire Petri dish.

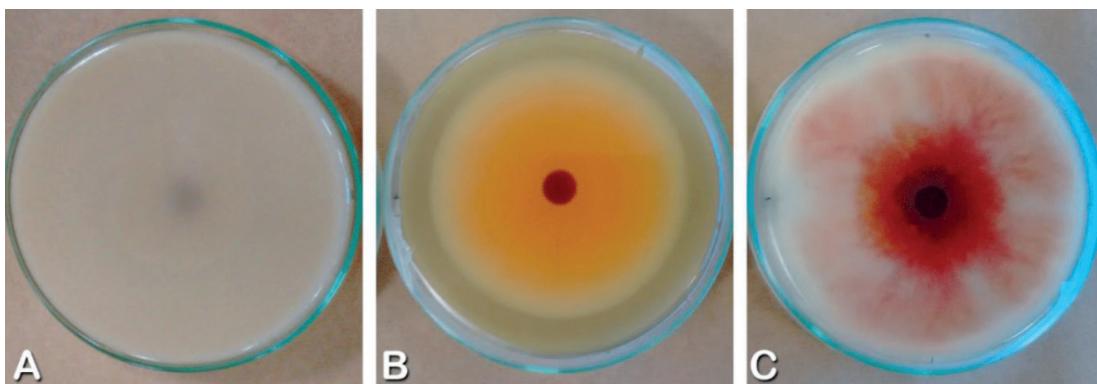


Figure 1. *Fusarium graminearum* mycelial growth inhibition test, after fifteen days of incubation.

A. Positive control; **B.** Methanolic extract of *Calvatia rugosa*; **C.** Negative control.

From the fifth day of evaluation, treatment containing *Coprinopsis* sp. extract showed significantly lower growth than the negative control (Table 2). The highest percentage of inhibition was observed on the fifth day of evaluation (38.6%). Methanolic extract of *Coprinopsis atramentaria* also showed antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium ochrochloron*, *Penicillium verrucosum* and *Trichoderma viride* (Heleno et al., 2014).

For the extract obtained from *Leucoagaricus* sp. basidiomata (Table 2), a significant inhibition of fungal growth was observed when measurements were performed between the fifth and ninth day of mycelial growth, with percentages of inhibition varying from 6.8% to 16.8%.

For the treatment containing the extract of *Leucocoprinus* cf. *brebissonii* we observed that from the ninth day of evaluation the mycelial growth of phytopathogenic *F. graminearum* was significantly inhibited (Table 2), with percentages of inhibition varying from 7.5 to 9.6%. Extract of *L. fragilissimus* showed antifungal activity against *Colletotrichum coffeatum* (Yaling et al., 2014).

When *Leucopaxillus gracillimus* extract was added to the culture medium we observed that the mycelial growth of *F. graminearum* was significantly inhibited mainly in the last days of evaluation (Table 2). Extract of *L. albissimus* showed antimicrobial activity against *Penicillium inflatum* and *Streptomyces galilaeus* (Alves et al., 2013). Even as *L. giganteus* which presented activity against several fungi, such as *Alternaria solani*, *Aspergillus solani*, *A. niger*, *Colletotrichum graminicola*, *Fusarium solani* and *F. oxysporum* (Feleke & Doshi, 2017). The antifungal activity of *L. gracillimus* observed here seems to be the first report for the species.

For the extract of *Xeromphalina tenuipes* it was observed that fungal mycelial growth was significantly lower in comparison to the negative control, exhibiting up to 24.3% inhibition (Table 2). On the third and on the thirteenth day no significant difference was observed, being that the phytopathogen *F. graminearum* already occupied the entire Petri

dish for the negative control and for the treatment.

Antimicrobial activity of *Xeromphalina* sp. has already been described, two isolated substances, xeromphalinones 1 and 2, presented antifungal activity against *Mucor miehei*, *Nematospora coryli*, *Penicillium notatum* and *Paecilomyces variotii*, besides showing antibacterial activity against *Bacillus brevis*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter dissolvens* and *Micrococcus luteus* (Liermann et al., 2010). Xeromphalinone 4 presented activity only against the fungus *N. coryli* (Liermann et al., 2010).

Extract of *Simocybe tucumana* (Table 3, Figure 2) significantly inhibited mycelial growth of *F. graminearum* during all evaluated days. Antifungal activity is reported for the first time to members of this genus.

	3° Day	5° Day	7° Day	9° Day	11° Day	13° Day	15° Day
<i>S. tucumana</i>	1.52 ^{(1)b}	1.98 c	2.72 b	3.54 b	4.12 b	4.58 b	4.96 b
Negative control	3.02 a	3.88 a	4.50 a	4.96 a	5.72 a	6.76 a	8.02 a
Positive control ⁽²⁾	1.76 b	2.36 b	2.88 b	3.32 b	3.76 b	4.22 b	4.54 b
CV (%)	14.82	6.22	7.92	7.63	6.62	6.00	8.38

Table 3. Methanolic extract effect of *Simocybe tucumana* on the mycelial growth of *Fusarium graminearum*.

Means among the different treatments were compared among themselves within the same column by the Tukey 5% test.

⁽¹⁾ Mean diameter of the mycelium in cm. ⁽²⁾ Cercobin fungicide as positive control. ⁽³⁾ Coefficient of variation.

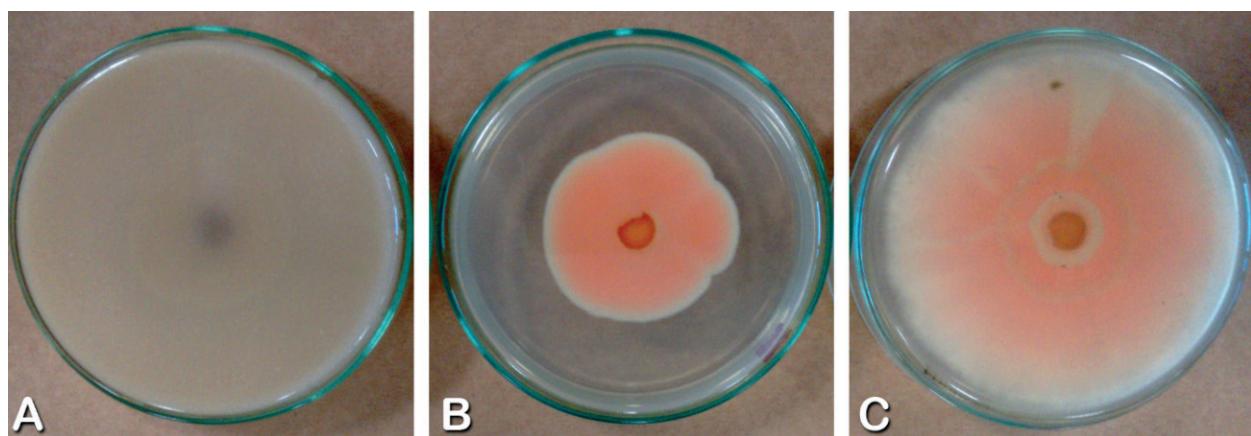


Figure 2. *Fusarium graminearum* mycelial growth inhibition test, after fifteen days of incubation.

A. Positive control; B. Methanolic extract of *Simocybe tucumana*; C. Negative control.

When comparing the effect of the extracts with the Cercobin® fungicide, used as a positive control, only the *S. tucumana* species obtained significantly similar results (Table 3), and on the fifth day of evaluation it was more efficient than the fungicide, proving a strong antifungal potential.

The use of extracts of basidiomycetes to inhibit the mycelial growth of fungi of the genus *Fusarium* has already been described in the literature. Extract of the basidiomycete

Inocybe geophylla inhibited the growth of the fungus *Fusarium oxysporum* (Reinoso et al. 2013). Extracts of species *Pycnoporus sanguineus* and *Lentinus crinitus*, also showed inhibition effect on mycelial growth, germination of conidia of the phytopathogen *Fusarium* sp. (Figueiredo & Silva, 2014). Evidencing that extracts of basidiomycetes contain substances that inhibit mycelial growth of fungi of the genus *Fusarium*.

Besides the antifungal activity observed here, *in vivo* studies are required to prove the efficacy of *C. rugosa*, *Coprinopsis* sp., *Leucocoprinus* cf. *brebissonii*, *L. gracillimus*, *S. tucumana* and *X. tenuipes* extracts on fusariosis. In addition, characterization and isolation studies of antifungal substances should be conducted, as well as studies on the mechanism of action of these substances.

4 | CONCLUSIONS

1. Methanolic extracts of *Calvatia rugosa*, *Coprinopsis* sp., *Leucocoprinus* cf. *brebissonii*, *Leucopaxillus gracillimus*, *Simocybe tucumana* and *Xeromphalina tenuipes* showed direct fungitoxic action inhibiting the mycelial growth of *Fusarium graminearum*.
2. Methanolic extract of *Pleurotus opuntiae* stimulated the mycelial growth of *Fusarium graminearum*.
3. Extract of *Leucopaxillus gracillimus* showed antifungal activity against *Fusarium graminearum*, and seems to be the first report of this type of activity for this species.
4. Extract of *Simocybe tucumana* showed significantly inhibition of the mycelia growth of *Fusarium graminearum* and it seems to be the first report demonstrating the antifungal activity of this genus.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the financial support of CNPq (Proc. 483455/2013-3) and Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (Conv. 675/2014), CAPES and CNPq for MSc. scholarship first author and UFPR for facilities.

REFERENCES

- AJITH, T. A.; JANARDHANAN, K. K. **Medicinal Mushroom Cracked-Cap Polypore, *Phellinus rimosus* (Higher Basidiomycetes) Attenuates Acute Ethanol-Induced Lipid Peroxidation in Mice.** International Journal of Medicinal Mushrooms, v.17, n. 11, p. 1061–1067, 2015.
- ALVES, M. J.; FERREIRA, I. C. F. R.; DIAS, J.; TEIXEIRA, V.; MARTINS, A.; PINTADO, M. **A review on antifungal activity of mushroom (basidiomycetes) extracts and isolated compounds.** Current Topics in Medicinal Chemistry, v. 13, n. 21, p. 2648-2659, 2013.

AL-FATIMI, M.; SCHRÖDER, G.; KREISEL, H.; LINDEQUIST, U. **Biological activities of selected basidiomycetes from Yemen.** Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 68, n. 3, p. 221-226, 2013.

AQUEVEQUE, P.; ANKE, T.; ANKE, H.; STERNER, O.; BECERRA, J.; SILVA, M. **Favolon B, a new triterpenoid isolated from the Chilean *Mycena* sp. strain 96180.** Journal of Antibiotics, v. 58, n. 1, p. 61-64, 2005.

AQUEVEQUE, P.; CÉSPEDES, C. L.; ALARCÓN, J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; CAÑUMIR, J. A.; BECERRA, J.; SILVA, M.; STERNER, O.; RADRIGÁN, R.; ARANDA, M. **Antifungal activities of extracts produced by liquid fermentations of Chilean *Stereum* species against *Botrytis cinerea* (grey mould agent).** Crop Protection, v. 89, p. 95-100, 2016.

BARNECHE, S.; JORCIN, G.; CECCHETTO, G.; CERDEIRAS, M. P.; VÁZQUEZ, A.; ALBORÉS, S. **Screening for Antimicrobial Activity of Wood Rotting Higher Basidiomycetes Mushrooms from Uruguay against Phytopathogens.** International Journal of Medicinal Mushrooms, v. 18, n. 3, p. 261-267, 2016.

BARROS, L. S.; ADRIAM, A. I.; KOBAYASTI, L. **Uso de extratos vegetais na inibição do crescimento micelial *in vitro* de *Acremonium* sp. e *Fusarium verticillioides*.** Enclopédia Biosfera, v.9, n.16, p. 2071-2076, 2013.

BARTLETT, D. W.; CLOUGH, J. M.; GODWIN, J. R.; HALL, A. A.; HAMER, M.; PARR-DOBRZANSKI, B. **The strobilurin fungicides.** Pest Management Science, v. 58, n. 7, p. 649-662, 2002.

CAMILI, E. C.; BENATO, E. A.; PASCHOLATI, S. F.; CIA, P. **Extrato de *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes* no controle pós-colheita de mofo cinzento em uva ‘Itália’.** Pesquisa Aplicada e Agrotecnologia, v. 2, n. 2, p. 155-162, 2009.

CARVALHO, C. S. M.; AGUIAR, L. V. B.; SALES-CAMPOS, C.; MINHONI, M. T. A.; ANDRADE, M. C. N. **Determinação Bromatológica de *Pleurotus ostreatus* cultivado em resíduos de diferentes cultivares de bananeira.** Interciencia, v. 37, n. 8, p. 621-626, 2012.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Ninth Edition.** CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

COETZEE, J. C.; VAN WYK, A. E. **The genus *Calvatia* (‘Gasteromycetes’, Lycoperdaceae): A review of its ethnomycology and biotechnological potential.** African Journal of Biotechnology, v. 8, n. 22, 2009.

D'ADDAZIO, V.; DOS SANTOS, R. A. A.; LEITAO, A. S. B.; DA SILVA, M. B.; FERNANDES, A. A.; FALQUETO, A. R. **Evaluation of *in vitro* inhibition of mycelial growth of *Fusarium solani* f. sp. *piperis* by different products in Brazil.** African Journal of Microbiology Research, v. 10, n. 47, p. 1992-1998, 2016.

DOMINGUES, R. J.; YOUNG, M. C. M.; TÖFOLI, J. G.; MATHEUS, D. R. **Antifungal potential of extracts of native plants and basidiomycetes on *Colletotrichum acutatum*, *Alternaria solani* and *Sclerotium rolfsii*.** Summa Phytopathologica, v.37, n.3, p.149-151, 2011.

FELEKE, H. T.; DOSHI, A. **Antimicrobial activity and bioactive compounds of Indian wild Mushrooms.** Indian Journal of Natural Products and Resources, v. 8, n. 3, p. 254-262, 2017.

FERRIGO, D.; RAIOLA, A.; CAUSIN, R. ***Fusarium* toxins in cereals: occurrence, legislation, factors promoting the appearance and their management.** Molecules, v. 21, n. 5, p. 627-662, 2016.

FIGUEIREDO, Á.; SILVA, A. C. **Activity “*in vitro*” of extracts from *Pycnoporus sanguineus* and *Lentinus crinitus* on the pathogen *Fusarium* sp.** Acta Amazonica, v. 44, n. 1, p. 1-8, 2014.

GARCIA, D. J.; VECCHIATO, M. H.; MENTEN, J. O. M. **Efeito de fungicidas no controle de *Fusarium graminearum*, germinação, emergência e altura de plântulas em sementes de trigo.** Summa phytopathologica, v. 34, n. 3, p. 280-283, 2008.

HELENO, S. A.; FERREIRA, I. C.; CALHELHA, R. C.; ESTEVES, A. P.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M. J. R. **Cytotoxicity of *Coprinopsis atramentaria* extract, organic acids and their synthesized methylated and glucuronate derivatives.** Food Research International, v. 55, p. 170-175, 2014.

KLAUS, A.; KOZARSKI, M.; VUNDUK, J.; TODOROVIC, N.; JAKOVLJEVIC, D.; ZIZAK, Z.; VAN GRIENSVEN, L. J. **Biological potential of extracts of the wild edible Basidiomycete mushroom *Grifola frondosa*.** Food Research International, v. 67, p. 272-283, 2015.

LIERMANN, J. C.; SCHUFFLER, A.; WOLLINSKY, B.; BIRNBACHER, J.; KOLSHORN, H.; ANKE, T.; OPATZ, T. **Hirsutane-Type Sesquiterpenes with Uncommon Modifications from Three Basidiomycetes.** The Journal of Organic Chemistry, v. 75, n. 9, p. 2955-2961, 2010.

MA, L. J.; GEISER, D. M.; PROCTOR, R. H.; ROONEY, A. P.; O'DONNELL, K.; TRAIL, F.; GARDINER, D. M.; MANNERS, J. M.; KAZAN, K. ***Fusarium* pathogenomics.** Annual review of microbiology, v. 67, p. 399-416, 2013.

REINOSO, R.; CAJAS-MADRIAGA, D.; MARTINEZ, M.; SAN MARTIN, A.; PEREZ, C.; FAJARDO, V.; BECERRA, J. **Biological activity of macromycetes isolated from Chilean subantarctic ecosystems.** Journal of the Chilean Chemical Society, v. 58, n. 4, p. 2016-2019, 2013.

RIBAS, A. D.; DEL PONTE, E. M.; DALBEM, A. M.; DALLA-LANA, D.; BÜNDCHEN, C.; DONATO, R. K.; SCHREKKER, H. S.; FUENTEFRIA, A. M. **Imidazolium salts with antifungal potential for the control of head blight of wheat caused by *Fusarium graminearum*.** Journal of Applied Microbiology, v. 121, n. 2, p. 445-452, 2016.

SILVA, A. N.; AZEVEDO, G. B.; SOBRINHO, G. G. R.; NOVAES, Q. S. **Efeito de produtos químicos e de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium solani* do maracujazeiro.** Interciencia, v. 39, n. 6, p. 398-403, 2014.

YALING, L.; PONGNAK, W.; KASEM, S. **Mushroom and macrofungi collection for screening bioactivity of some species to inhibit coffee antharcnose caused by *Colletotrichum coffeatum*.** Journal of Agricultural Technology, v. 10, n. 4, p. 845-861, 2014.

ATIVIDADES BIOLÓGICAS E PROSPECÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Duroia macrophylla* HUBER (RUBIACEAE)

Data de aceite: 01/06/2020

Data de submissão: 10/03/2020

Juliana Gomes de Souza Oliveira

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Manaus – AM

<http://lattes.cnpq.br/962058599635975>

Cecilia Veronica Nunez

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Manaus – AM

<http://lattes.cnpq.br/2046473694108264>

RESUMO: Os micro-organismos endofíticos apresentam um enorme potencial para a produção de substâncias bioativas. A planta *Duroia macrophylla* produz alcaloides com atividade antitumoral e antimicobacteriana, sendo selecionada para a pesquisa do potencial biotecnológico dos seus micro-organismos endofíticos. As folhas de *D. macrophylla* foram lavadas, submetidas à desinfecção, fragmentadas e inoculadas em BDA e Ágar Sabouraud com oxitetraciclina e incubadas a 30 °C por 20 dias. Isolaram-se 47 fungos e destes, 21 fungos morfologicamente diferentes foram selecionados para a prospecção química e biológica. O cultivo submerso foi realizado

em Caldo Sabouraud ou Batata Dextrose, a 26 °C e 120 rpm durante 14-30 dias. Os líquidos metabólicos foram filtrados e submetidos à partição líquido-líquido com diclorometano e acetato de etila. Os metabólitos do micélio foram extraídos em ultrassom com diclorometano, acetato de etila e metanol. Os extratos e fases foram analisados por cromatografia em camada delgada e por ressonância magnética nuclear de ¹H. Além disso, eles foram testados quanto às atividades antimicrobiana, antioxidante e contra *Artemia salina*. Como resultado deste trabalho a taxa de colonização fúngica de *D. macrophylla* foi de 94%. Nos 21 extratos foram encontrados indícios de substâncias fenólicas, terpenos, açúcares e em quatro deles, alcaloides. As fases AcOEt dos fungos Dm SB 43 e Dm BDA 12c foram ativas contra *A. salina*, com CL₅₀ de 109,5 e 605,5 µg/mL, respectivamente. Nenhum extrato apresentou atividade antioxidante e 18 mostraram atividade antimicrobiana pelo menos para uma bactéria. O fungo Dm SB 33 apresentou o maior espectro de atividade, sendo ativo contra quatro bactérias: *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumanii* e *Pseudomonas aeruginosa*. Apenas o fungo Dm SB 33 demonstrou atividade contra *S. aureus* e não foram observadas atividades contra *E. coli*. Portanto, este estudo

demonstrou a diversidade de classes químicas e o potencial de atividades biológicas dos fungos endofíticos de *D. macrophylla*.

PALAVRAS-CHAVE: Amazônia; Biotecnologia; Metabolismo secundário.

BIOLOGICAL ACTIVITIES AND CHEMICAL PROSPECTION OF ENDOPHYTIC FUNGUS EXTRACTS FROM *Duroia macrophylla* HUBER (RUBIACEAE)

ABSTRACT: Endophytic microorganisms have enormous potential for the production of bioactive substances. The plant *Duroia macrophylla* produces alkaloids with antitumor and antimycobacterial activity, being selected for research on the biotechnological potential of its endophytic microorganisms. The leaves of *D. macrophylla* were washed and submitted to disinfestation and were later fragmented and inoculated in BDA and Sabouraud Agar with oxytetracycline and incubated at 30 °C for 20 days. 47 fungi were isolated and of these, 21 morphologically different fungi were selected for chemical and biological prospection. The submerged culture was carried out in Sabouraud or Potato Dextrose Medium, incubated at 26 °C, at 120 rpm for 14-30 days. The metabolic liquids were filtered and subjected to liquid-liquid partition with dichloromethane and ethyl acetate (phases DCM and EtOAc). The mycelium metabolites were extracted on ultrasound with dichloromethane, ethyl acetate and methanol. Thin layer chromatography and ¹H Nuclear Magnetic Resonance were used to analyze the extracts. The extracts were tested for antimicrobial, antioxidant activities and against *A. salina*. As a result of this work, the fungal colonization rate of *D. macrophylla* was 94%. In the 21 extracts were found evidence of phenolic substances, terpenes, sugars and in four of them, alkaloids. The phase EtOAc of the fungi Dm SB 43 and Dm BDA 12c were active against *A. salina*, with LC₅₀ of 109.5 and 605.5 µg/mL, respectively. No extract showed antioxidant activity and 18 showed antimicrobial activity for at least one bacterium. The fungus Dm SB 33 showed the highest spectrum of activity, being active against four bacteria: *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumanii* and *Pseudomonas aeruginosa*. Only the fungus Dm SB 33 showed activity against *S. aureus*. No activity against *E. coli* was observed. Therefore, this study demonstrated the diversity of chemical classes and the potential for biological activities of the endophytic fungi of *D. macrophylla*.

KEYWORDS: Amazon; Biotechnology; Secondary metabolism.

1 | INTRODUÇÃO

Os produtos naturais foram e ainda são indispensáveis para o desenvolvimento e descoberta de novos medicamentos (BRANDÃO; P. DAVID; COUTO; NASCIMENTO; M. DAVID, 2010; CRAGG; KATZ; NEWMAN; ROSENTHAL, 2012; NEWMAN; CRAGG, 2016). Dos medicamentos novos e aprovados entre os anos de 1981 e 2014 apenas 27% eram totalmente sintéticos, sem nenhuma inspiração em produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016). Os vegetais são uma importante fonte de produtos naturais, entretanto, a

produção dos metabólitos pode variar de acordo com o clima, disponibilidade de nutrientes, dentre outros fatores, tornando-se um entrave para a produção industrial. Por isso, são necessárias pesquisas que abordem outras fontes dessas substâncias bioativas ou seus similares para uma produção mais eficiente (LI et al., 2015).

Os micro-organismos também apresentam um enorme potencial de produção de substâncias bioativas (NEWMAN; CRAGG, 2016; STROBEL, 2003). Parte destes micro-organismos é denominada como “micro-organismos endofíticos”, pois na totalidade ou em parte do seu ciclo de vida eles habitam o interior de uma planta no espaço intra ou intercelular, sem causar danos aparentes à hospedeira (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012; TAN; ZOU, 2001; ZHANG; SONG; TAN, 2006). Esses micro-organismos são parte da diversidade microbiana ainda pouco explorada, e apresentam um enorme potencial de produção de substâncias bioativas que poderão ser aplicadas na medicina, indústria ou agricultura (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013; STROBEL, 2003). Estima-se que existam aproximadamente 300 mil espécies de plantas e que cada uma possui pelo menos um endófito, assim sendo, o potencial de descoberta de novas espécies e de novas substâncias em estudos com micro-organismos endofíticos é muito elevado (CHAPLA; BIASETTO; ARAÚJO, 2013; KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012).

Como a diversidade de endófitos é maior em áreas de clima tropical e subtropical, as pesquisas com foco em plantas presentes nesses ecossistemas podem ser promissoras para a descrição de novas espécies de endófitos e de novos produtos naturais (STROBEL, 2003). Um importante representante da biodiversidade mundial é o Brasil, cuja biodiversidade é estimada em aproximadamente 1,8 milhões de espécies e apenas cerca de 11% já foram catalogadas (SISTEMA DE INFORMAÇÃO SOBRE A BIODIVERSIDADE BRASILEIRA [SiBBr], 2016). Embora já seja conhecido o grande potencial que os micro-organismos endofíticos possuem para a produção de metabólitos secundários bioativos, eles ainda são pouco explorados, inclusive os associados aos vegetais do Brasil (ZANARDI et al., 2012). Tal informação vem de encontro com o futuro das florestas tropicais que a cada ano está diminuindo, o que reduz as chances de descoberta de novos micro-organismos e de seus produtos e aumenta a necessidade e urgência de novos estudos com esta abordagem (STROBEL, 2003). Os micro-organismos endofíticos representam uma opção para a produção de metabólitos vegetais visto que devido à interação e coevolução ocorrida ao longo do tempo, alguns deles podem captar parte do DNA da planta e produzir compostos antes associados ao hospedeiro (STROBEL, 2003; ZHANG et al., 2006). Além disso, o cultivo microbiano é um processo controlado e sem interferências ambientais (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012).

2 | METODOLOGIA

A coleta do material vegetal utilizado neste trabalho ocorreu na Reserva Florestal Adolpho Ducke (Reserva Ducke), situada na periferia de Manaus, com acesso pelo Km 26 da estrada Manaus-Itacoatiara (AM-010), Amazonas, Brasil, número de autorização do IBAMA: 16970-1.

A desinfecção do material vegetal foi realizada em cinco folhas saudáveis e com poucos sinais de herbivoria que foram lavadas em água corrente com detergente líquido neutro. Na câmara de fluxo laminar, as folhas foram imersas sequencialmente em bêqueres contendo agentes desinfetantes: álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 2,5% por 3 minutos e álcool 70% por 1 minuto. Em seguida, o material vegetal foi imerso em dois bêqueres com água destilada estéril dos quais retirou-se uma alíquota de 50 μL para o controle da assepsia que foi inoculada em uma placa de Petri contendo BDA (SOUZA et al., 2004). As amostras foram cortadas em pequenos fragmentos (5 x 5 mm) que foram inoculados (cinco fragmentos por placa), em quintuplicata, em placas de Petri contendo Ágar Batata Dextrose e Ágar Sabouraud suplementados com oxitetraciclina 125 $\mu\text{g/mL}$. As placas foram incubadas a 30 °C por 20 dias e durante esse período acompanhou-se o surgimento das hifas fúngicas para fora do tecido vegetal e realizou-se o isolamento fúngico. Posteriormente os fungos foram submetidos à purificação e conservação pelo método Castellani e congelamento a -80 °C (SOUZA, 2006).

2.1 Preparo dos extratos fúngicos

Os fungos isolados foram cultivados em BDA e Ágar SB e após 8 dias de crescimento eles foram submetidos ao cultivo submerso. O cultivo submerso foi realizado em Erlenmeyers de 500 mL contendo 300 mL de caldo Sabouraud ou Batata Dextrose acrescidos de 0,2% de Extrato de Levedura. Quatro fragmentos do meio (6 x 6 mm) contendo o crescimento fúngico foram inoculados nos Erlenmeyers que foram incubados a 26 °C sob agitação de 120 rpm. Os fungos endofíticos foram incubados de 14 a 30 dias, de acordo com a observação de suas características morfofisiológicas durante o experimento.

Após o término do cultivo submerso, utilizando um sistema a vácuo (kitassato, funil de Büchner e papel de filtro) os líquidos metabólicos foram filtrados e separados dos micélios. As extrações dos metabólitos secundários intra e extracelulares (dos micélios e dos líquidos metabólicos, respectivamente) ocorreram com solventes de baixa a alta polaridade. Utilizando-se os micélios realizaram-se de três a quatro extrações, para cada solvente, em um banho de ultrassom durante 20 minutos. As substâncias presentes nos líquidos metabólicos foram extraídas a partir de uma partição líquido-líquido. Preparou-se uma solução hidroalcoólica adicionando-se aos líquidos metabólicos o mesmo volume do solvente MeOH (1:1). Esta solução foi transferida para um funil de separação e foram

realizadas pelo menos três extrações com os solventes DCM e AcOEt. Os extratos foram concentrados em rotaevaporador sob temperatura de 40 °C.

2.2 Prospecção Química

Todos os extratos fúngicos foram submetidos à análise por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), utilizando-se cromatofolhas de alumínio impregnadas com sílica 60 contendo indicador de fluorescência UV 254 nm. Como revelador físico empregou-se a luz ultravioleta nos comprimentos de onda UV 254 e 365 nm (revelador para duplas ligações conjugadas), e como reveladores químicos: vapores de iodo (revelador para substâncias contendo ligações duplas - manchas amareladas), reagente de Dragendorff (revelador para alcaloides, compostos nitrogenados heterocíclicos e aminas quaternárias – manchas de coloração alaranjada), sulfato cérico (revelador geral, mas especialmente usado para detectar terpenos – manchas roxas - avermelhadas) e cloreto férrico (revelador para substâncias fenólicas – manchas azuladas) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997; WAGNER; BLADT, 1996).

Os extratos provenientes de cada fungo endofítico que possuíam massa acima de 15 mg ou que apresentaram indícios de alcaloides na CCDC foram submetidos à Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (com frequência de 300 MHz). Para o processamento dos dados e análises dos espectros utilizou-se o software TopSpin 3.5pl7 (Bruker).

2.3 Atividades Química e Biológica

2.3.1 Ensaio de Toxicidade Frente à *Artemia salina* Leach

O ensaio de atividade citotóxica foi realizado de acordo com o desenvolvido por Meyer e colaboradores (1982) com adaptações. Para uma triagem inicial, os extratos foram testados em triplicata, na concentração de 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, solubilizados em DMSO 25%. Após esses resultados prosseguiu-se com o ensaio em diferentes concentrações apenas com os extratos que foram ativos. Neste teste, os ovos de *Artemia salina* Leach foram eclodidos durante 48 h em água do mar sintética (38 g/L de sal marinho) sob aeração e iluminação artificiais. Em uma placa de 24 poços transferiram-se dez náuplios para cada poço contendo os extratos fúngicos. Como controle negativo do ensaio utilizaram-se DMSO 25% e água do mar sintética. Após 24 h sob iluminação artificial contaram-se os microcrustáceos mortos. Consideraram-se mortos os microcrustáceos que, mesmo com uma leve agitação no sistema, não apresentavam movimentos por mais de dez segundos. A CL₅₀ (concentração necessária para matar a metade dos organismos testes) foi determinada usando o software PoloPlus versão 1.0, com intervalo de confiança de 95%, e a média e desvio padrão foram calculados pelo programa Microsoft Excel 2013. De acordo com a toxicidade, os extratos foram classificados em: inativos (CL₅₀ acima de 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), moderadamente ativos (CL₅₀ entre 100 e 900 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou fortemente ativos

(CL₅₀ abaixo de 100 µg/mL) (ANDERSON et al., 1991; DAVID et al., 2001).

2.3.2 Ensaio antioxidante

No ensaio antioxidante utilizou-se a metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). O ensaio antioxidante foi realizado em triplicata, empregou-se como controle negativo água deionizada, como o agente oxidante o DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e como padrão de referência o ácido ascórbico. Os extratos foram testados na concentração de 0,5 mg/mL, solubilizados em MeOH. Adicionaram-se em microtubos 10 µL de extrato (0,5 mg/mL) e 990 µL de DPPH e aguardou-se 30 minutos em local escuro. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro ($\lambda = 517$ nm) e a partir da curva-padrão (ação antioxidante do ácido ascórbico sobre o DPPH) e das absorbâncias resultantes da ação dos extratos avaliou-se o potencial antioxidante dos extratos testados.

2.3.3 Ensaio antibacteriano

Neste ensaio empregou-se a técnica de difusão em Ágar conforme o manual M02-A11 (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE [CLSI], 2012). Neste ensaio utilizaram-se as cepas: *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Citrobacter freundii* (ATCC 8090), *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047), *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) cedidas pela Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária – CRMVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ. Os meios de cultura empregados foram o caldo e o ágar Müller-Hinton, a temperatura de incubação foi de 35 ± 2 °C, e foram testados os extratos metanólicos na concentração de 5 mg/mL solubilizados em DMSO 10%.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isolados e purificados 47 fungos endofíticos a partir de 50 fragmentos foliares, resultando em uma taxa de colonização de 94%. De acordo com as características morfológicas, macro e microscópicas (colônia: tipo de borda, raio de crescimento, relevo, textura, coloração; tipo de hifas, presença e formato de esporos) selecionaram-se 21 fungos diferentes para a realização das fermentações submersas.

Ao analisar os micro-organismos isolados, observa-se que a comunidade de fungos endofíticos de *D. macrophylla* é diversa, sendo composta por fungos morfologicamente distintos, bem como ocorre em outras espécies da família Rubiaceae (FERNANDES et al., 2009; VIEIRA et al., 2012).

A descrição de fungos endofíticos associados ao gênero *Duroia* é extremamente escassa. Além da pesquisa com endófitos de *Duroia macrophylla* encontra-se na literatura apenas o estudo com *Duroia hirsuta* que possibilitou o isolamento de *Stelliosphaera formicum*, uma nova espécie fúngica com atividade contra *S. aureus* (FORCINA et al.,

2015). Portanto, a presente pesquisa possui um importante papel para a contribuição do conhecimento de endófitos e de seus extratos em espécies do gênero *Duroia*.

3.1 Prospecção química

A prospecção química dos extratos revelou indícios de substâncias com duplas ligações, substâncias fenólicas, alcaloides, terpenos, açúcares e graxas. A presença de alcaloides foi detectada através da CCDC nos extratos diclorometânicos dos micélios dos fungos Dm SB 43 e Dm BDA 41b e nos líquidos metabólicos extraídos com DCM (fase-DCM) dos fungos Dm SB 43, Dm BDA 13 e Dm BDA 21.

Os espectros de RMN de ^1H dos extratos dos fungos endofíticos com indícios de alcaloides na CCDC apresentaram uma grande variedade de sinais. Os espectros dos extratos MDCM e FDCM do fungo Dm SB43 (Figuras 1 e 2) apresentaram sinais característicos de hidrogênios metílicos, hidrogênios metínicos e metilênicos ligados a carbono com duplas ligações, hidrogênios de carbonos carbinólicos, de hidrogênios ligados a carbonos de duplas ligações isoladas e conjugadas. O espectro do extrato FDCM do fungo Dm SB43 é semelhante ao do extrato MDCM do mesmo fungo, exceto pelos sinais característicos de hidrogênios metilênicos (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012). Além desses sinais observa-se no espectro de RMN de ^1H do extrato FDCM do fungo Dm BDA 13 (Figura 3) um sinal (9,69 ppm) que pode indicar a presença de aldeído e a ausência de sinais de hidrogênios metínicos e metilênicos ligados a carbono com duplas ligações.

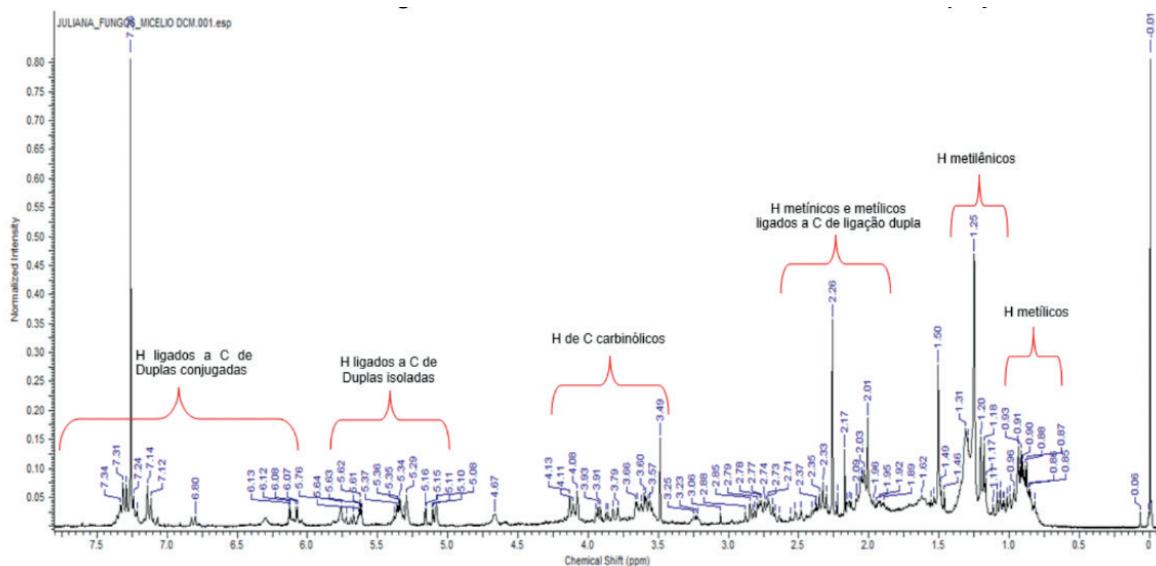


Figura 1: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do extrato diclorometânico do micélio do fungo endofítico Dm SB 43 de *Duroia macrophylla*.

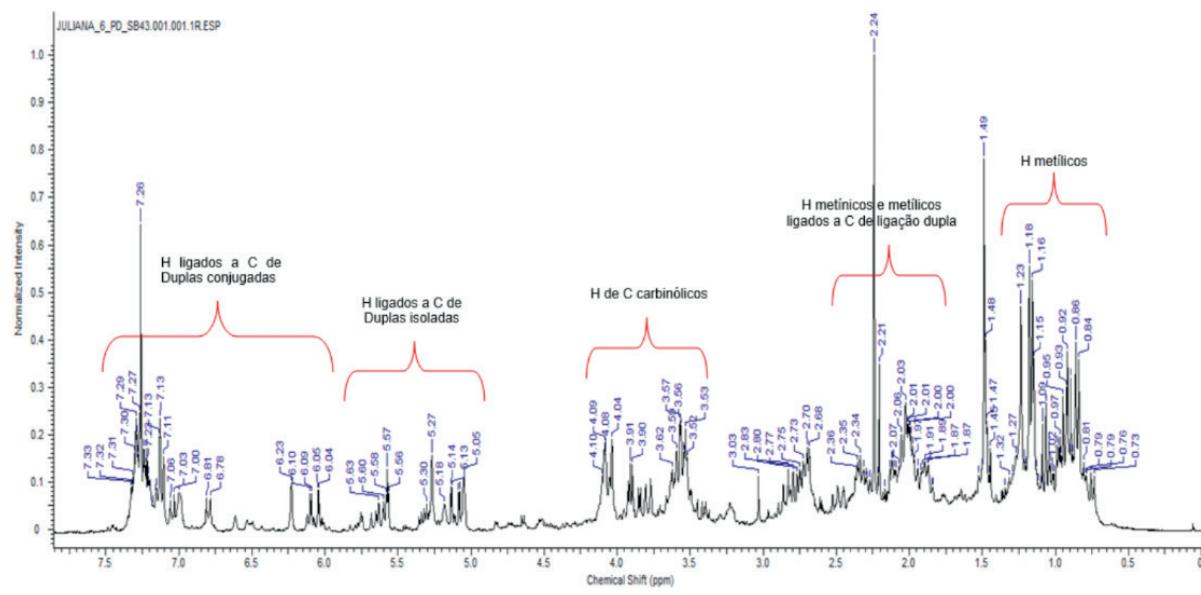


Figura 2: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) da fase diclorometânica do líquido metabólico do fungo endofítico Dm SB 43 de *Duroia macrophylla*.

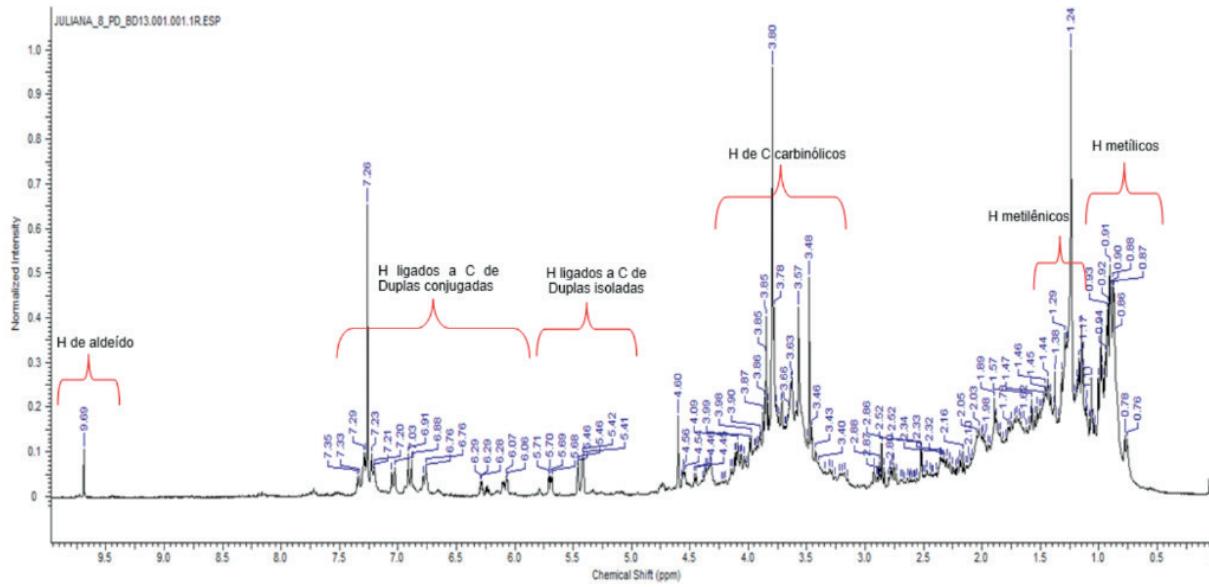


Figura 3: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) da fase diclorometânica do caldo metabólico do fungo endofítico Dm BDA 13 de *Duroia macrophylla*.

Os espectros do extrato MDCM do fungo Dm BDA41b apresentou sinais característicos de hidrogênios metílicos, metilênicos de alcanos alifáticos, hidrogênios característicos de triglicerídeos e de carbono de dupla ligação isolada (Figura 4). O espectro do extrato FDCM Dm BDA 21 (Figura 5) apresentou sinais característicos de hidrogênios metílicos e de alcanos olefínicos (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012).

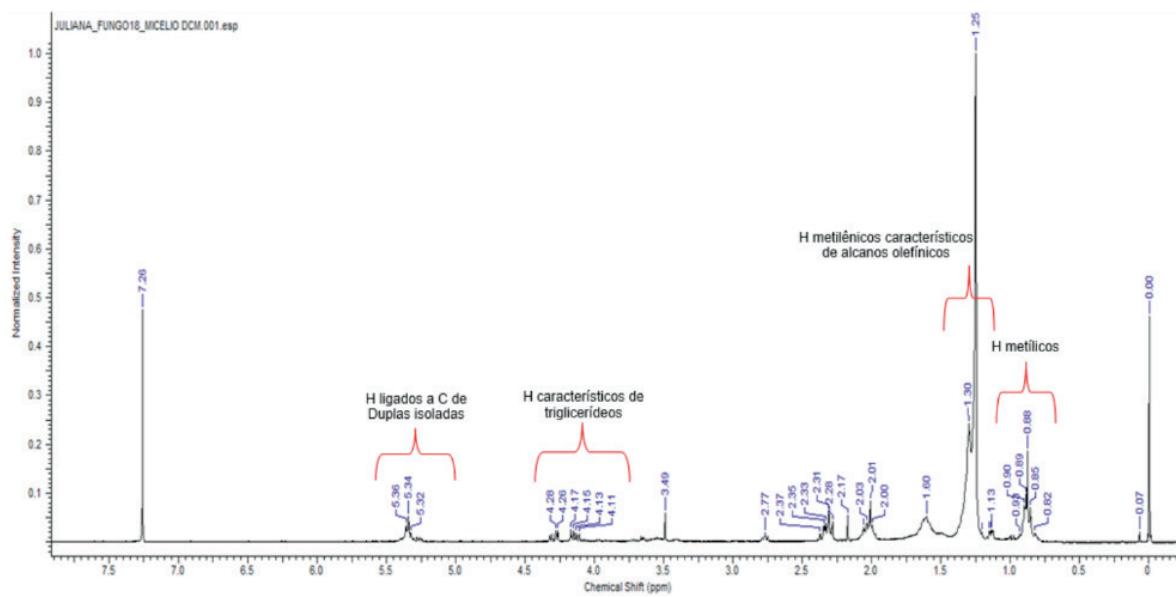


Figura 4: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do extrato diclorometânico do micélio do fungo endofítico Dm BDA 41b de *Duroia macrophylla*.

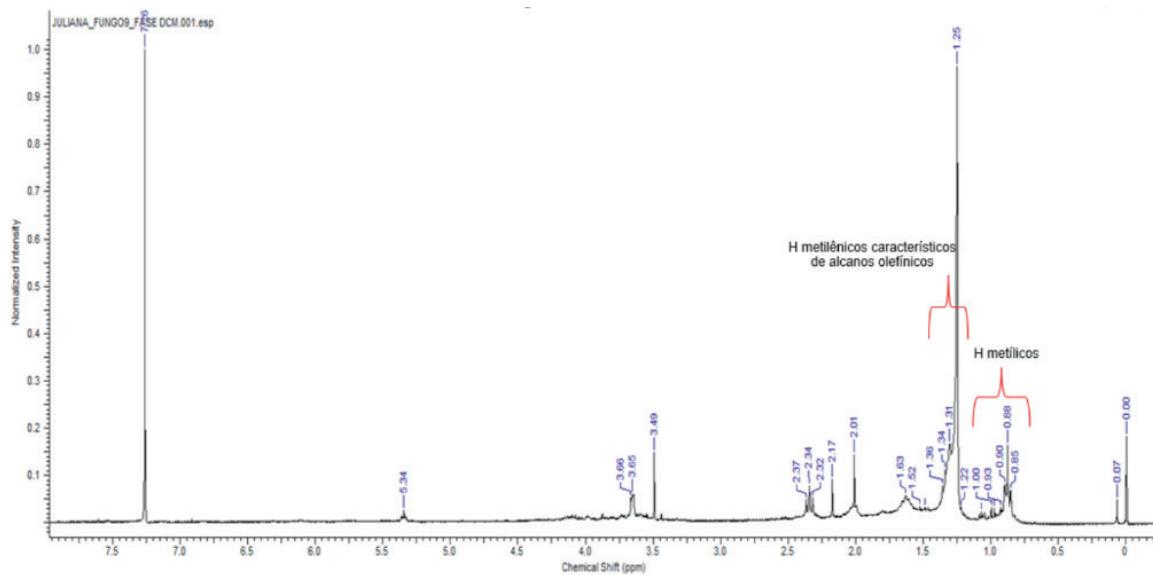


Figura 5: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da fase diclorometânica do caldo metabólico do fungo endofítico Dm BDA 21 de *Duroia macrophylla*.

3.2 Atividades Química e Biológica

Os extratos ativos contra *A. salina* foram os provenientes da partição fase-acetato de etila (FAcOEt) dos líquidos metabólicos dos fungos Dm SB 43 e Dm BDA 12c com CL_{50} de 109,5 e 605,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, classificados com atividade moderada. Esses resultados são importantes para uma pré-avaliação dos extratos fúngicos e monitoramento de suas bioatividades. Após essa triagem, os extratos podem ser encaminhados para uma avaliação mais específica, como os testes de atividade antitumoral (HARADA, 2009; MEYER et al., 1982).

Não foi observada nenhuma atividade antioxidante significativa nos extratos fúngicos testados na concentração de 0,5 mg/mL, apesar dos espectros de RMN de ^1H

apresentarem sinais na região de hidrogênios aromáticos. Portanto, esses sinais não devem ser de substâncias fenólicas ou esse tipo de substância encontra-se em uma baixa quantidade no extrato.

Os extratos apresentaram atividade contra pelo menos um micro-organismo teste, exceto os extratos dos fungos Dm SB 21, Dm BDA 24 e Dm BDA 53. O extrato do fungo Dm SB 33 apresentou o maior espectro de atividade, sendo ativo contra quatro bactérias: *E. cloacae*, *S. aureus*, *A. baumanii* e *P. aeruginosa* (9, 10, 11 e 11 mm, respectivamente). Os maiores halos de inibição do ensaio foram observados para o extrato do fungo Dm SB 43 contra *S. epidermidis* e *K. pneumoniae* (13 mm). Apenas o extrato do fungo Dm SB 33 demonstrou atividade contra *S. aureus* (halo de 10 mm).

Não foram observadas atividades contra *E. coli* em nenhum extrato testado. Observa-se que dentre os 21 fungos testados, 18 apresentaram atividade antibiótica contra pelo menos um micro-organismo. Tal fato reafirma o potencial que esses micro-organismos podem apresentar.

Portanto, considerando que o surgimento de micro-organismos resistentes aos antibióticos impulsiona o aumento das pesquisas que desenvolvem novas alternativas a esses medicamentos, reafirma-se que os endófitos apresentam-se como uma opção, por serem potenciais produtores de substâncias antimicrobianas (MARTINEZ-KLIMOVA; RODRÍGUEZ-PEÑA; SÁNCHEZ, 2017).

4 | CONCLUSÃO

A partir desta pesquisa pode-se concluir que a planta *Duroia macrophylla* possui um alto índice de colonização fúngica e que os extratos de seus fungos endofíticos apresentam uma diversidade de classes químicas com potencial de atividade biológica.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, J. E.; GOETZ, C. M.; McLAUGHLIN, J. L.; SUFFNESS, M. **A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens**. Phytochemical Analysis, v. 2, n. 3, p. 107–111, 1991.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity**. LWT - Food Science and Technology, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRANDÃO, H. N. DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. **Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas**. Química Nova, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. **Endophytic Fungi: An Unexplored and Sustainable Source of New and Bioactive Natural Products**. Revista Virtual de Química, v. 5, n. 3, p. 421–437, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE [CLSI]. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests - approved standard – M02-A11**, v. 32, n. 1, 2012.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7a. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1997.

CRAGG, G. M.; KATZ, F.; NEWMAN, D. J. **The impact of the United Nations Convention on Biological Diversity on natural products research**. Natural Products Reports, v. 29, p. 1407–1423, 2012.

DAVID, J. P.; SILVA, E. S.; MOURA, D. L.; GUEDES, M. L. S.; ASSUNÇÃO, R. J.; DAVID, J. M. **Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii***. Química Nova, v. 24, n. 6, p. 730–733, 2001.

FERNANDES, M. D. R. V.; SILVA, T. A. C.; PFENNING, L. H.; COSTA-NETO, C. M.; HEINRICH, T. A.; ALENCAR, S. M.; LIMA, M. A.; IKEGAKI, M. **Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from Coffea arabica L.** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 45, n. 4, p. 677–685, 2009.

FORCINA, G. C.; CASTRO, A.; BOKESCH, H. R.; SPAKOWICZ, D. J.; LEGASPI, M. E.; KUCERA, K.; VILLOTA, S.; NARVÁEZ-TRUJILLO, A.; McMAHON, J. B.; GUSTAFSON, K. R.; STROBEL, S. **Stelliosphaerols A and B, sesquiterpene-polyol conjugates from an ecuadorian fungal endophyte**. Journal of Natural Products, v. 78, n. 12, p. 3005–3010, 2015.

HARADA, T. N. **Correlação entre os ensaios de citotoxicidade em *Artemia salina Leach* e atividade antineoplásica sobre linhagens de células tumorais para algumas classes de produtos naturais**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 92p. 2009.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. **Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites**. Chemistry & Biology, v. 19, n. 7, p. 792–798, 27 jul. 2012.

LI, Y.-L.; XIN, X.-M.; CHANG, Z.-Y.; SHI, R.-J.; MIAO, Z.-M.; DING, J.; HAO, G.-P. **The endophytic fungi of *Salvia miltiorrhiza* Bge.f. alba are a potential source of natural antioxidants**. Botanical Studies, v. 56, n. 1, p. 5, 1 abr. 2015.

MARTINEZ-KLIMOVA, E.; RODRÍGUEZ-PEÑA, K.; SÁNCHEZ, S. **Endophytes as sources of antibiotics**. Biochemical Pharmacology, v. 134, p. 1–17, 2017.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; McLAUGHLIN, J. L. **Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents**. Journal of Medicinal Plant Research, v. 45, p. 31–34, 1982.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014**. Journal of Natural Products, v. 79, p. 629–661, 2016.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação de compostos orgânicos**. 7a ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO SOBRE A BIODIVERSIDADE BRASILEIRA [SIBBR]. **Biodiversidade Brasileira**. Disponível em: <<http://www.sibbr.gov.br/areas/?area=biodiversidade>>. Acesso em: 8 jul. 2016.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. **Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham**. Acta Amazônica, v. 34, n. 2, p. 185–195, 2004.

SOUZA, A. Q. L. **Potencial genético e químico dos endófitos de *Murraya paniculata* L. (Jack)**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, 128 p. 2006.

STROBEL, G. A. **Endophytes as sources of bioactive products**. Microbes and Infection, v. 5, p. 535–544, 2003.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. **Endophytes: a rich source of functional metabolites**. Natural Product Reports, v. 18, n. 4, p. 448–459, 2001.

VIEIRA, D. P. DE S.; SILVA, F. G.; SILVA, W. M. T.; CAVALCANTI, P. A.; LIMA, D. **Primeiro registro de fungos endofíticos em folhas de Ixora coccinea L. em Pernambuco, Brasil**. Revista Brasileira de Biociências, v. 10, n. 1, p. 1–4, 2012.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis - A thin layer chromatography atlas**. 2a. ed. Alemanha: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1996.

ZANARDI, L. M.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; TREVISAN, H. C.; ARAÚJO, A. R.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; YOUNG, M. C. M. **Sesquiterpenos produzidos pelo fungo endofítico Phomopsis cassiae com atividade antifúngica e inibidora de acetilcolinesterase**. Química Nova, v. 35, n. 11, p. 2233–2236, 2012.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. **Biology and chemistry of endophytes**. Natural Product Reports, v. 23, n. 5, p. 753–771, 2006.

CAPÍTULO 5

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE *Monascus Ruber* FRENTE AO RESÍDUO DE SORVETE

Data de aceite: 01/06/2020

Vitória Cristina Santiago Alves

Universidade Federal de Pernambuco

vikeju92@gmail.com

Emanuella Maria da Conceição

Universidade Federal de Pernambuco

Sarah Signe do Nascimento

Universidade Federal de Pernambuco

Thales Henrique Barbosa de Oliveira

Universidade Federal de Pernambuco

Luana Maria Cavalcanti Teixeira

Universidade Federal de Pernambuco

Hugo Marques Galindo

Universidade Federal de Pernambuco

Renata Aczza Alves Cândido

Faculdade Pernambucana de Saúde - FPS

Norma Buarque de Gusmão

Universidade Federal de Pernambuco

como substrato. Os resultados mostraram que a atividade enzimática de controle (azeite) foi de 0,45U / mL, seguida de atividade enzimática específica de 0,2U / mg de proteína. Por outro lado, ao utilizar concentrações crescentes de resíduos de sorvete, observou-se atividade enzimática e atividade enzimática específica, respectivamente de 0,30U / mL e 0,019U / mg, quando 1%, 0,33U / mL e 0,027U / mg de proteína quando 3% e 0,55U / mL e 0,6U / mg de proteína quando 5%. Com esses resultados, é possível inferir que o desperdício de sorvete é um importante substituto do azeite na produção de lipase pela linhagem *M. ruber*.

PALAVRAS-CHAVE: enzimas; biotecnologia; resíduos agroindustriais

ABSTRACT: Organic wastes have a considerable representation in the solid wastes generated in Brazil, these wastes can be used as an alternative energy source for the growth of fungi in the production of hydrolytic enzymes such as lipases. These enzymes have several biotechnological applications. Thus, this work evaluated the production of lipase from *Monascus ruber* strain using ice cream waste as inductor substrate. The results showed that enzymatic activity of control (olive oil) was 0.45U / mL, followed by specific enzymatic activity of

RESUMO: Os resíduos orgânicos têm uma representação considerável nos resíduos sólidos gerados no Brasil, podendo ser utilizados como fonte alternativa de energia para o crescimento de fungos na produção de enzimas hidrolíticas, como lipases. Essas enzimas têm várias aplicações biotecnológicas. Assim, este trabalho avaliou a produção de lipase da linhagem *Monascus ruber* utilizando resíduos de sorvete

0.2U / mg of protein. In contrast, when using increasing concentrations of ice cream waste was observed enzymatic activity and specific enzymatic activity, respectively of 0.30U / mL and 0.019U / mg, when 1%, 0.33U / mL and 0.027U / mg protein, when 3% and 0.55U / mL and 0.6U / mg protein when 5%. With these results it is possible to infer that ice cream waste comprises an important replacer to olive oil in lipase production by *M. ruber* strain.

KEYWORDS: Enzymes; biotechnology; agro-industrial waste.

1 | INTRODUÇÃO

Os resíduos orgânicos têm uma grande representatividade nos resíduos sólidos gerados no Brasil e são oriundos majoritariamente da área urbana, tendo a indústria alimentícia uma grande contribuição no depósito destes no meio ambiente (ABRELPE, 2016). Estudos comprovam que resíduos alimentícios podem ser utilizados como fonte energética alternativa para crescimento de fungos na produção de enzimas hidrolíticas (MAHADIK et al., 2002; GOMBERT et al., 1999; RODRIGUEZ et al., 2006). Os fungos são importantes produtores de enzimas hidrolíticas de interesse industrial tais como a lipase. Essas enzimas podem ter diversas aplicações biotecnológicas, sendo frequentemente utilizadas na indústria alimentícia, no tratamento de efluentes oleosos, entre outras (CARVALHO et al., 2015; COLLA, et al., 2012; RIBEIRO et al., 2011). Desta forma, este trabalho teve por objetivo avaliar a produção de lipase a partir da cepa de *Monascus ruber* utilizando o resíduo de sorvete como nutriente.

2 | METODOLOGIA

O fungo foi inoculado em placa de Petri contendo o meio de cultura Ágar Extrato de Malte e mantido a 30°C por 72 horas, para a obtenção dos blocos de gelose com o crescimento microbiano. Após esse período 5 blocos (Ø9mm) da colônia fúngica foram transferidos para frascos de Erlenmeyer (250mL) contendo resíduo de sorvete nas concentrações de 1, 3 e 5% em 50mL água destilada esterilizada. Os frascos foram incubados a 30°C por 96 horas em condição estática. O controle positivo foi realizado nas mesmas condições acima, substituindo o resíduo do sorvete por 1% de óleo de oliva extravirgem. Depois do período de incubação, o caldo fermentado foi separado do micélio por centrifugação 16.380G por 7 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação enzimática e o micélio descartado. Para a detecção da atividade lipolítica foi utilizado o método descrito por Winkler e Stukman (1979), modificado por Lima et al (2004), e para a quantificação proteica foi utilizado o método de Bradford (1976). A leitura foi realizada por espectrofotometria a 410nm e 595nm respectivamente.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que o teste controle com o óleo de oliva mais *M. ruber* apresentou atividade enzimática específica de 0,45U/mL e 0,02U/mg de proteína. Nos ensaios com resíduo de sorvete a 1% foram de 0,30U/mL e 0,019U/mg de proteína; com 3% foram de 0,33U/mL e 0,027U/mg de proteína e com 5% foi de 0,55U/mL e 0,06U/mg de proteína, respectivamente.

4 | CONCLUSÃO

O presente estudo evidenciou que *Monascus ruber* que já foi isolado do resíduo de sorvete, foi capaz de produzir lipase utilizando o resíduo como fonte de energia. O fungo por ter sido isolado deste meio que possui uma grande quantidade de gordura, naturalmente espera-se que tenha um aparato enzimático adaptado. A maior concentração do resíduo obteve-se maior atividade lipolítica, sendo possível substituir o óleo de oliva.

APOIO

CAPES e FACEPE - órgãos de fomento concedentes de bolsa dos participantes; e ao LAMAI/UFPE onde os experimentos foram realizados.

REFERÊNCIAS

- ABRELPE Panorama dos Resíduos Sólidos no Brasil 2016. Abrelpe, 2016. Disponível em:http://www.abrelpe.org.br/panorama_apresentacao.cfm. Acesso em: 16 de março 2019.
- CARVALHO, L. F. F.; CASTIGLIONE, G. L., 2015. Aplicação de lipase microbiana no tratamento de resíduos oleosos. Blucher Chemical Engineering Proceeding, v. 1, n. 2, p. 2354-2361.
- COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V., 2012. Aplicações e produção de lipases microbianas. Revista CIATEC-UPF, v. 4, n. 2, p. 1-14.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. Enzyme and Microbial Technology, New York, v. 39, p. 235-251, 2006.
- RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G., 2011. Production and use de lipases in bioenergy: a review from thefeedstocks to biodiesel production Enzyme Research, v. 2011, p. 1-16.
- WINKLER, U. K.; STUCKMAN, M., 1979. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. Journal of Bacteriology, v. 138, n. 3, p. 663-670.

CAPÍTULO 6

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Pleurotus eryngii* (DPUA 1816) A PARTIR DA BATATA-DOCE CASCA ROXA

Data de aceite: 01/06/2020

Data de submissão: 26/03/2020

Cleudiane Pereira de Andrade

Universidade do Estado do Amazonas - Escola de Ciências da Saúde;
Manaus – Amazonas
<http://lattes.cnpq.br/3338331552633844>

Aldiane Passos de Oliveira

Universidade do Estado do Amazonas - Escola de Ciências da Saúde;
Manaus – Amazonas
<http://lattes.cnpq.br/9892633751308789>

Luana Araújo Martins

Universidade do Estado do Amazonas - Escola Normal Superior;
Manaus – Amazonas
<http://lattes.cnpq.br/9449089366947059>

Rafael Lopes e Oliveira

Universidade do Estado do Amazonas - Escola Superior de Tecnologia;
Manaus – Amazonas
<http://lattes.cnpq.br/4950481491863642>

Larissa de Souza Kirsch

Universidade do Estado do Amazonas - Escola de Ciências da Saúde;
Manaus – Amazonas
<http://lattes.cnpq.br/6547152812685055>

RESUMO: Os cogumelos são potenciais recursos em processos biotecnológicos, dentre eles, *Pleurotus eryngii* destaca-se principalmente como enriquecedor de alimentos, bem como, comprovadas atividades biológicas atribuídas a seus compostos bioativos. Atualmente há um constante desenvolvimento de pesquisas direcionadas ao conhecimento das melhores condições de cultivo, crescimento e rendimento destas espécies. Deste modo, o objetivo desta pesquisa foi avaliar *P. eryngii* quanto à produção de biomassa em meio contendo batata-doce casca roxa como fonte natural de carbono. *P. eryngii* foi reativado em ágar-batata-dextrose (BDA) com 0,5% de extrato de levedura (YE) e incubado a 25 °C na ausência de luz por 10 dias. Para o primeiro cultivo submerso utilizou-se de meios de cultura preparados à base da infusão de 200g/L de batata-doce e glicose (20 g/L), e a biomassa recuperada a cada 5 dias. No segundo cultivo, realizou-se um planejamento fatorial de 2³ com 4 pontos centrais, sendo os fatores analisados a concentração da glicose, extrato de levedura e peptona, todos à base da infusão de 200g/L de batata-doce casca roxa. Em cada meio de cultura inoculou-se discos miceliais de *P. eryngii* e incubados em agitador orbital a 150rpm, 25°C na ausência de luz por 15 dias. Os resultados obtidos apontam

que após planejamento fatorial a produção de biomassa (24,78g/L) no ensaio 3 duplicou quando comparado ao primeiro experimento (12,02g/L), em 15 dias. As fontes complexas de nitrogênio que foram adicionadas ao meio de cultura favoreceram um aumento de rendimento, sugerindo uma influência positiva no crescimento do fungo. Além disso, o uso da batata doce var. casca roxa pode ser considerada uma fonte de carbono natural alternativa para a produção de biomassa de *P. eryngii*.

PALAVRAS-CHAVE: Cogumelo; Cultivo submerso; Fontes nutricionais

EVALUATION OF BIOMASS PRODUCTION OF THE *PLEUROTUS ERYNGII* (DPUA 1816) FROM SWEET-POTATO PURPLE PEEL

ABSTRACT: Mushrooms are potential resources in biotechnological processes, among them, *Pleurotus eryngii* stands out mainly as a food enricher, as well as, proven biological activities attributed to its bioactive compounds. Currently, there is a constant development of research to understand the best conditions for cultivation, growth and yield of these species. Thus, the objective of this research was to evaluate the biomass production of *P. eryngii* in medium containing sweet potato purple peel as a natural source of carbon. *P. eryngii* was reactivated on potato-dextrose agar (PDA) with 0.5% yeast extract (YE) and incubated at 25°C in the absence of light for 10 days. The first submerged culture media was prepared with the infusion of 200g/L of the sweet potato and glucose (20 g/L) and the biomass recovered every five days. In the second submerged culture, a factorial design of 2³ with 4 central points was utilized to evaluate the glucose, yeast extract and peptone concentration, all based on the infusion of 200g/L of sweet potato purple peel. Mycelial discs of *P. eryngii* were inoculated into each culture medium and incubated in an orbital shaker at 150rpm, 25 °C in the absence of light for 15 days. The results obtained shown that after factorial design, the biomass production (24.78g/L) in trial 3 doubled when compared to the first experiment (12.02g/L), in 15 days. The complex sources of nitrogen that were added to the culture medium favored an increase in yield, suggesting a positive influence on the growth of the fungus. In addition, the use of sweet potato var. purple peel can be considered an alternative natural carbon source for biomass *P. eryngii* production.

KEYWORDS: Mushroom; Submerged cultivation; Nutritional sources

1 | INTRODUÇÃO

Existem diversas espécies de cogumelos potencialmente comestíveis, porém o número diminui consideravelmente quando apontadas as espécies exploradas comercialmente no mundo (SOCCOL et al., 2017), um grande contratempo, visto que estes macrofungos são apreciados desde a idade antiga por povos orientais, utilizados principalmente como especiarias nobres em pratos culinários (SÁNCHEZ et al, 2010).

Além disso, o consumo de cogumelos comestíveis está se difundindo mais, pois pesquisas científicas apontam para suas atrativas características nutricionais e sensoriais (SALES-CAMPOS et al., 2011), bem como inúmeras propriedades medicinais oriundas de seus metabólitos, que fazem deles alternativas terapêuticas e funcionais, úteis na prevenção e tratamento de muitas doenças (ZHIMING et al., 2016; ZHANG et al., 2019).

Por essas qualidades *Pleurotus* spp. são importantes fungos comestíveis cultivados comercialmente, com uma produção estimada em cerca de 6.460,000,000 toneladas, ocupando o segundo lugar em produção em nível mundial (ROYSE et al., 2017). Fungos deste gênero possuem metabolismo singular que assimilam uma grande variedade de substratos disponíveis, embora, sejam mais encontrados em climas tropicais e subtropicais. Uma das características mais interessantes é o fato deles serem cultivados artificialmente (TORRES et al., 2013). Incluído neste gênero, encontra-se *Pleurotus eryngii*, conhecido popularmente como cogumelo-do-cardo, ou cogumelo-rei, originalmente consumido na Europa, mas atualmente amplamente distribuído pelo mundo (MA et al, 2018). O aumento do consumo é decorrente do maior prazo de validade, sabor e odor agradáveis e de altíssima qualidade gastronômica, considerado superior à outras espécies do gênero (ZOU et al., 2018; IQBAL et al., 2018),

Desta forma, sugere-se que o macrofungo possa ser cultivado em meio líquido, uma das técnicas mais usadas e práticas para obtenção do micélio fúngico (MOKOCHINSKI et al., 2015) e biomoléculas que apresentam propriedades específicas de interesse biotecnológico e, consequentemente, de grande valor agregado, tais como os antibióticos, enzimas, vitaminas, ergosterol, dentre outros (ROSADO et al., 2003; HRISTOZOVA, 2005). Tal bioprocesso garante também um melhor controle dos parâmetros físico-químicos do cultivo, a recuperação de metabólitos extracelulares e a determinação de biomassa são facilitadas, sendo realizadas por filtração simples ou centrifugação para a remoção das células (PAPASPYRIDI et al., 2012).

Durante este bioprocesso, as técnicas de planejamento de experimentos podem ser utilizadas como estudo inicial para posterior cultivo em larga escala, tornando-se importante verificar a influência de um ou mais fatores sobre este bioprocesso. Este tipo de projeto experimental contribui com redução do tempo de otimização, melhoria, e diminuição de custos, além de confiabilidade. Além disso, ao entender que o crescimento fúngico depende da presença de elementos nutritivos presentes no meio de cultura, uma melhor especificação das condições de cultivo dos requerimentos nutricionais, utilizando espécies vegetais, economicamente viáveis, como substrato de cultivo traz uma significativa contribuição ao desenvolvimento de processos que proporcionem um maior rendimento em biomassa e até em bioproductos. Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência de diferentes concentrações nutricionais na produção de biomassa micelial do cogumelo comestível *Pleurotus eryngii* (DPUA 1816) cultivados à base de batata-doce casca roxa por cultivo submerso.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

Macrofungo e reativação da cultura

Uma linhagem de *P. eryngii* (DPUA 1816) preservada em óleo mineral foi reativada em placas de Petri com ágar batata dextrose (BDA) suplementado com extrato de levedura a 0,5% (YE), previamente esterilizado a 121°C por 15 minutos. As placas foram mantidas em BOD a 25 °C na ausência de luz por 10 dias (KIRSCH et al., 2011) e a cada 90 dias foram repicados, incubados a 25 °C até que o micélio colonizasse toda a placa, e, em seguida, armazenados a 4 °C em geladeira (RUFINO et al., 2011).

Produção de biomassa micelial de *Pleurotus eryngii* (DPUA 1816)

A produção de biomassa de *P. eryngii* foi verificada por cultivo submerso em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL de meio de cultura com formulação específica, a saber: infusão de 200g/L de batata-doce da casca roxa [*Ipomea batatas* (L.). Lam], 20g/L de glicose, com pH inicial aferido em 6,0. A partir das culturas mantidas em BDA+YE por 10 dias foram retirados três fragmentos de micélio ($\varnothing = 1\text{cm}$) e adicionados aos meios de cultura, previamente esterilizados a 121 °C por 15 minutos. Foi utilizado como controle o meio POL, composto por 40g/L de glicose, 1g/L de peptona, 2g/L de extrato de levedura, 1g/L de K_2HPO_4 , 0,2g/L de MgSO_4 , e 0,2g/L de $(\text{NH})_4\text{SO}_4$ (ROSADO et al., 2003). O cultivo submerso foi conduzido em shaker, durante 15 dias a 25 °C, sob agitação constante de 150 rpm, sendo retirados frascos em triplicada a cada cinco dias em delineamento inteiramente casualizados, a fim de verificar o período de maior produção micelial (KIRSCH et al., 2011).

Com a finalidade de avaliar a influência de outras fontes nutricionais, bem como diferentes concentrações destas na produção de biomassa fúngica, foi realizado um novo cultivo submerso variando a concentração de glicose (fonte de carbono), extrato de levedura e peptona (fontes de nitrogênio) do meio de cultura. Desta forma foi realizado com planejamento fatorial 2^3 completo com 4 pontos centrais, correspondendo a 12 experimentos (BARROS NETO et al., 2010) sendo conduzidos em shaker com delineamento casualizados nas mesmas condições do primeiro cultivo submerso. Os níveis das variáveis analisadas estão detalhados na Tabela 1.

Fatores	Níveis		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
Extrato de levedura (g/L)	1	2	3
Glicose (g/L)	10	20	30
Peptona (g/L)	0,5	1	1,5

Tabela 1. Níveis dos fatores para avaliação da produção de biomassa de *Pleurotus eryngii* (DPUA 1816).

(-), (0) e (+) indicam os níveis dos fatores como inferior, central e superior, respectivamente

Após quinze dias de cultivo foram retirados os frascos para quantificação da biomassa micelial de *P. eryngii*, separada por filtração a vácuo em papel de filtro (Whatman No.1) de peso conhecido, lavada com água destilada esterilizada e desidratada em 60 °C em estufa até peso constante (KIRSCH et al., 2016). Em seguida, o pH do líquido sobrenadante de cada experimento foi aferido com auxílio de pHâmetro de bancada da Marca Quimis, devidamente calibrado.

Todos os resultados foram analisados através de análise de variância (ANOVA) ao nível de 95% de significância. Os gráficos e análises estatísticas foram realizados utilizando-se o software “Statistica 8.0” (Statsoft, Inc., 2008, USA).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de adaptação fúngica pode demorar ou não a depender da espécie, com isso os resultados referentes ao primeiro cultivo submerso a partir da infusão de batata-doce da casca roxa (BDCR) adicionado apenas de glicose (20 g/L) apontam a produção de biomassa micelial em todos os dias avaliados, sendo que no 5º dia de cultivo a biomassa atingiu 1,95 g/L, 5,74 g/L no 10º dia e 12,02 g/L em 15 dias, mostrando um crescimento micelial de mais que 63% em 10 dias de cultivo e 52% no último dia avaliado, sugerindo maior capacidade metabólica em 10 dias (Tabela 2). Valores diferentes destes foram encontrados por Bellettini (2014), ao estudar a produção micelial por fermentação submersa do cogumelo *P. djamor* em meios à base de fração líquida do palmito de pupunha (*Bactris gasipaes*) numa concentração de 80%, obtendo uma biomassa micelial de 1,66g/L em 14 dias de cultivo, onde devido as propriedades nutricionais do palmito era esperado uma quantidade de biomassa muito maior.

Substrato	Produção de biomassa (g/L)		
	5 dias	10 dias	15 dias
POL (Controle)	2.2 ^c	6.69 ^b	11.02 ^a
Batata-doce (casca roxa)	1.95 ^c	5.74 ^b	12.02 ^a

Tabela 2: Produção de biomassa micelial de *Pleurotus eryngii* (DPUA 1816) a partir da infusão da batata-doce da casca roxa (200 g/L) e glicose (20 g/L).

Médias que não compartilham a mesma letra são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey.

Entretanto, quando comparado com o meio de cultura controle, os resultados encontrados neste trabalho não apresentaram diferenças significativas entre si, em todos os dias testados. Nos trabalhos de Rosado e colaboradores (2003) onde foi avaliada em cultivo submerso a produção de biomassa de duas linhagens brasileiras de *Pleurotus* (*P. ostreatoroseus* Sing. e *P. ostreatus* var. *florida*) em meio POL, os resultados foram superiores aos do presente trabalho, pois em apenas nove dias de incubação *P. ostreatus* var. *florida* apresentou maior biomassa (22,8 g/L) quando comparada a *P. ostreatoroseus* (16,8 g/L), resultados que já eram esperados, pois espécies diferentes tem requerimentos nutricionais diferentes. Outros estudos sugerem que a adaptação do microrganismo pode demorar mais que um único cultivo.

Contudo, quando analisados quanto a quantidade de itens empregados em cada meio de cultura, observa-se que no meio de cultura proposto nesta pesquisa não há a presença das fontes sintéticas inseridas no meio POL, tais como Fosfato dipotássico (K_2HPO_4), Sulfato de magnésio ($MgSO_4$), e Sulfato de amônio ($(NH_4)_2S_2O_4$), tornando o meio proposto uma alternativa mais econômica, menos elaborada e de fácil manuseio.

Os 12 ensaios do planejamento fatorial para a produção de biomassa micelial de *P. eryngii* (DPUA 1816) estão mostrados na Tabela 3; e na Figura 1 encontra-se os valores dos efeitos estimados relativos à produção de biomassa.

Ensaio	Extrato de Levedura (g/L)	Glicose (g/L)	Peptona (g/L)	Biomassa Micelial (g/L)	pH Final
1	1	10,0	0,5	16,11	5,88
2	1	10,0	1,5	16,73	5,62
3	1	30,0	0,5	24,78	4,96
4	1	30,0	1,5	15,10	5,13
5	3	10,0	0,5	23,98	5,58
6	3	10,0	1,5	14,78	5,88
7	3	30,0	0,5	11,08	5,63
8	3	30,0	1,5	13,10	5,86
9	2	20,0	1	12,62	4,72
10	2	20,0	1	12,65	5,32
11	2	20,0	1	13,50	5,57
12	2	20,0	1	11,34	5,56

Tabela 3: Planejamento fatorial 2³ com 4 pontos centrais preparados a partir da infusão da batata-doce da casca roxa.

Os dados da Tabela 3 demonstraram que a produção de biomassa do cogumelo estudado apresentou variação de 11,08 g/L a 24,78 g/L (ensaios 7 e 3) (valores mínimos e máximos, respectivamente). Quando comparado ao primeiro experimento, este segundo aponta que a adição de fontes complexas de nitrogênio (extrato de levedura e peptona) ao meio de cultura proporcionou um aumento de mais que 100% de rendimento micelial no ensaio 3, indicando a influência positiva das mesmas no crescimento fúngico.

As fontes de nitrogênio disponíveis no meio de cultura, tem como principal função favorecer o crescimento fúngico, e apesar de algumas fontes complexas de nitrogênio sejam responsáveis por acidificar o meio de cultura, as utilizadas neste trabalho (peptona e extrato de levedura) não alteraram drasticamente os índices de pH, com exceção do ensaio 3 e 9, cujo pH final foi de 4,96 e 4,72, respectivamente, uma variação de no máximo 1,2, que não foi suficiente para inibir o crescimento fúngico, visto que o ensaio 3 foi o mais relevante em produção de biomassa micelial. Os dados deste trabalho são contrários aos de Ozdal (2018), que afirma que quanto maior a concentração de extrato de levedura, maior a produção de biomassa micelial.

No gráfico de Pareto as variáveis e suas interações estão representadas por siglas e números no eixo vertical, conforme legenda. O comprimento da barra azul são as comparações de variáveis, e a linha vertical em vermelho é a referência dos efeitos estatisticamente significativos, o que implica dizer que barras que não ultrapassam a linha vertical são efeitos não significativos com um nível de 95% de confiança. É exatamente o que acontece na Figura 1, visto que apesar da primeira barra (2 e 3 – interação entre glicose e peptona) serem os efeitos mais próximos da linha vermelha, não são considerados significativos, compreendendo a necessidade de outros testes com estas mesmas variáveis utilizando concentrações diferentes. Dessa forma, verifica-se que a relação das variáveis glicose e peptona não atingirem o nível de significância e influenciam de maneira negativa para a produção de biomassa. Este resultado pode ser visualizado no diagrama de Pareto.

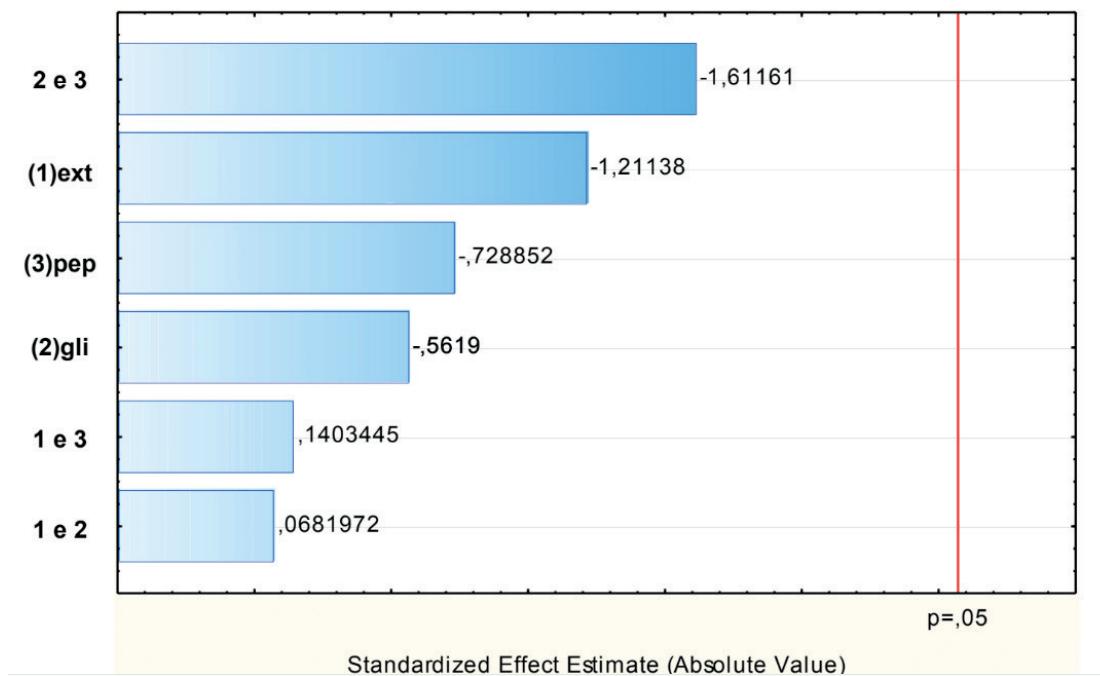


Figura 1. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis extrato de levedura (1), glicose (2) e peptona (3) no crescimento de *Pleurotus eryngii* (DPUA 1535).

Contudo, é possível observar também que quando estes três fatores testados são analisados separadamente apresentam comportamentos diferentes e podem aumentar a produção de biomassa, pois a segunda comparação mais promissora inclui o extrato de levedura, seguido por peptona e glicose, respectivamente, todos analisados separadamente.

Tais informações são importantes para entender que os substratos devem proporcionar nutrientes e condições apropriadas para o crescimento micelial, por isso é conveniente que sejam incentivadas futuras pesquisas com adição de nutrientes ao meio que favoreça o crescimento fúngico e aumente a produção micelial, sem elevar o custo. Deste modo a batata-doce é uma raiz tuberosa que quando comparada com outras estruturas vegetais amiláceas, possui maior teor de matéria seca, carboidratos, lipídios, cálcio e fibras que a batata, mais carboidratos e lipídios que o Inhame e mais proteína que a mandioca (EMBRAPA, 2008), por isso pode servir como fonte natural de nutrientes que podem ser requeridas por espécies fúngicas. Luz et al. (2012) afirma que para o uso de diferentes tipos de substratos por fungos depende diretamente de sua capacidade de secretar enzimas, principalmente enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação destes substratos.

Outro dado que pode ser analisado é o método de superfície de resposta, técnica estatística utilizada na modelação e análise de problemas, cuja resposta é otimizada e sofre influência por vários fatores. A resposta é otimizada por meio da relação entre as variáveis dependentes e independentes, que pode ser linear, quadrática, cúbica, exponencial, entre outras (LIMA e LIMA, 2014). Um ajuste quadrático, ou polinomial de 2º grau, significa que o modelo de ajuste dos dados experimentais não é uma reta (linear), e sim uma curva.

Esses resultados do diagrama (Figura 2) demonstram que há uma fraca influência linear das variáveis de estudo, ou seja, a tendência não linear significa que ao aumentar qualquer parâmetro não necessariamente aumentará a produção de biomassa de maneira significativa e de modo proporcional.

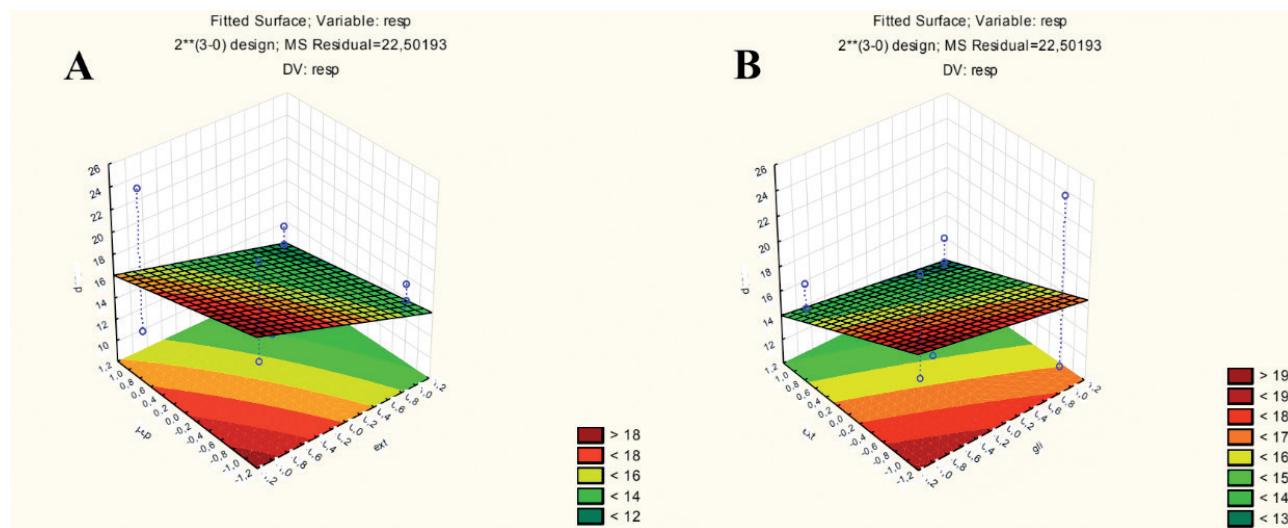


Figura 2. Gráfico de superfície de resposta demostrando a relação entre as variáveis extrato de levedura x peptona (A), glicose x extrato de levedura (B).

Além disso, o crescimento micelial em meio líquido pode ser uma alternativa viável para obter compostos bioativos, devido ao mais curto tempo de incubação, e o possível aumento do rendimento de biomassa em comparação com a produção de basidiomas (CARDOSO et al., 2017).

Outras pesquisas já foram publicadas para produção de biomassa micelial de espécies do gênero *Pleurotus*, utilizando diferentes fontes naturais como substrato, a exemplo de Ferdinandi e Rosado (2008) que verificou três diferentes tratamentos com extrato aquoso de *Ginkgo biloba* (GB) em meio BD (batata-dextrose) para melhor produção de biomassa micelial de *P. ostreatus* em 14 dias de cultivo, adquirindo até 142 g/L de biomassa micelial. Mumpuni et al. (2017) cultivou a espécie *P. ostreatus* utilizando como recurso natural o extrato de semente de milho, extrato de malte, extrato de farelo de arroz, e notaram médias superiores de biomassa micelial em 11,71 g/L, 7,76 g/L e 6,70 g/L, respectivamente, diferente desta pesquisa, Mumpuni et al. (2017) precisou de 28 dias para alcançar tais médias.

4 | CONCLUSÃO

Os resultados indicaram que a batata doce var. casca roxa pode ser considerada uma fonte de carbono natural alternativa para a produção de biomassa de *P. eryngii* (DPUA 1816). O macrofungo cresce em meio com fontes complexas de nitrogênio e carbono,

sendo a condição que favoreceu a maior produção de biomassa 0,5 g/L de peptona e 1g/L de levedura, 30g/L de glicose e apesar do gráfico de Pareto mostrar maior interação entre as variáveis extrato de levedura e peptona, são necessários novos ensaios considerando outras concentrações destas mesmas variáveis, a fim de aumentar o crescimento fúngico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao apoio financeiro concedido pela FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas, Manaus Brasil).

REFERÊNCIAS

- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 414 p.
- CARDOSO, R. V. C.; FERNANDES, Â.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; CALHELHA, R. C.; BARROS, L.; MARTINS, A., et al. Development of nutraceutical formulations based on the mycelium of *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus*. **Food & Function**, 8(6), 2155–2164. 2017.
- EMBRAPA. Hortaliças. Sistemas de Produção, v.6, ISSN 1678-880X Versão Eletrônica. Jun./2008. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/hortalicas/batata-doce/composicao>>. Acesso em 01 de janeiro de 2020.
- IQBAL, W; ASMA, M. M; AYYUB, C. M; KHAN, N. A; SAMIN, G; KHATANA, M. Optimization of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*) production against cotton waste and fenugreek straw. **Pakistan. Journal of Phytopathology**., Vol. 31 (02) 149-154. 2018.
- KIRSCH, L. S.; MACEDO, A. J. P.; TEIXEIRA, M. F. S. Production of mycelial biomass by the Amazonian edible mushroom *Pleurotus albidus*. **Brazilian Journal of Microbiology (Online)**, v. 47, p. 658-664, 2016.
- KIRSCH, L.S., PINTO, A. C., PORTO, T. S., TEIXEIRA, M. F. 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**, v. 13, n. 2, 2011.
- LUZ, J. M; NUNES, M. D; PAES, S. A; TORRES, D. P; SILVA C. S. M; KASUYA, M. C. Lignocellulolytic enzyme production of *Pleurotus ostreatus* growth in agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**. 43, 1508-1515. 2012.
- MA, G.; KIMATU, B. M.; ZHAO, L.; YANG, W.; PEI, F.; HU, Q. Impacts of Dietary *Pleurotus eryngii* Polysaccharide on Nutrient Digestion, Metabolism, and Immune Response of the Small Intestine and Colon- An iTRAQ-Based Proteomic Analysis. **Proteomics** 2018, 18, e1700443.
- MOKOCHINSKI, J. B. et al. Biomass and Sterol Production from Vegetal Substrate Fermentation Using *Agaricus brasiliensis*. **Journal of Food Quality**, 2015.
- MUMPUNI, A; EKOWATI, N; PURNOMOWATI, P; & PURWATI, E. S. Growth and Protein Content Establishment of *Pleurotus ostreatus* on Liquid and Solid Medium. **Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education**, v. 9, n. 3, p. 572-578, 2017.
- OZDAL, M. Sıvı kültürde *Lepista Nuda* tarafından miselyalı biyokütle ve ekzopolisakkarit üretimi için karbon ve azot kaynaklarının belirlenmesi. **Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi**, 6(5): 581-585, 2018.
- PAPASPYRIDI, L. M.; ALIGIANNIS, N.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; SKALTSOUNIS, A.

L.; FOKIALAKIS, N. Submerged Fermentation of the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus* in a Batch Stirred Tank Bioreactor as a Promising Alternative for the Effective Production of Bioactive Metabolites. **Molecules**, 17 (3), 2714-2724. 2012.

ROSADO, S.; GERMANO, E. R.; CARBONERO, S. M.; COSTA, M.; IACOMINI, C.; KEMMELMEIER. Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. and *Pleurotus ostreatus* "florida" (Jack.: Fr) Kummer. **Journal of Basic Microbiology**. 43, 51–59. 2003.

ROYSE, D. J.; BAARS, J.; TAN, Q. Current overview of mushroom production in the world. In: Zied, D.C., A. Pardo-Giménez (eds.), Edible and medicinal mushrooms: Technology and applications. **John Wiley and Sons-Blackwell**, Nueva York. Pp. 5-13. 2017.

RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A.; RODRIGUES, L.R.M.; TEIXEIRA, J.A.C.; CAMPOS-TAKAKI, G.M., Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 84, p. 1-5, 2011.

SALES-CAMPOS, C.; CARVALHO, C. S. M.; DE; AGUIAR, L. V. B.; ANDRADE, M. C. N. Cinética micelial dos fungos comestíveis *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes* em resíduos lignocelulósicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, p. 141-145, 2011.

SÁNCHEZ, C. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 85, 1321-1337. 2010.

SOCCOL, C. R.; VÍTOLA, F. M. D.; RUBEL, R.; FALBO, M. K.; LETTI, L. A. J.; BELLETTINI, M.; SOCCOL, V. T. Cogumelos uma fonte promissora de compostos ativos para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos e nutracêuticos. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**, cap. 9, v.4, p. 315-360, 2017.

TORRES, O. A.; MEZA, J. R. Y.; TORRES, R. J. P.; RIVAS, J. M. V. Cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* (jacq. EX fr.) Kumm empleando pulpa de café como substrato. **Revista Pakamuros** 1 (1)38-43; 2013.

ZHANG, B.; LI, Y.; ZHANG, F.; LINHARDT, R. J.; ZENG, G.; & ZHANG, A. Extraction, structure and bioactivities of the polysaccharides from *Pleurotus eryngii*: A Review. **International Journal of Biological Macromolecules**. 2019. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.144.

ZHIMING, FU; LIU Y; ZHANG, Q. A Potent Pharmacological Mushroom: *Pleurotus eryngii*. **Fungal Genomics and Biology**, 6: 139. 2016. doi: 10.4172/2165-8056.1000139.

ZOU, Y.; DU, F.; ZHANG, H.; HU, Q. Evaluation of the Korshinsk Peashrub (*Caragana korshinsk Kom.*) As a substrate for the cultivation of *Pleurotus eryngii*. **Waste and Biomass valorization**: Online, p. 1-7. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12649-018-0301-2>>. Acesso em 12 de novembro de 2018.

CAPÍTULO 7

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA SUSCEPTIBILIDADE DE *CANDIDA ALBICANS* AO FLUCONAZOL UTILIZANDO DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Data de aceite: 01/06/2020

Edinaira Sulany Oliveira de Sousa

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
naira_sulanny@hotmail.com

Silviane Pinheiro

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
pinheiro21sb@hotmail.com

João Vicente Braga de Sousa

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
(INPA)

Ana Cláudia Alves Cortez

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
(INPA)

Yeast Nitrogen Base (YNB) e de Sabouraud dextrose, contendo peptona de soja e peptona bacteriológica, frente a *C. albicans* (ATCC 60193). A técnica de microdiluição foi realizada de acordo com a norma M27-A3 do CLSI. *C. albicans* foi testada conjuntamente nos quatro meios de cultura e em duplicata. Para esse experimento todos os meios foram tamponados com ácido3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS) e ajustados ao pH de 7,0 com NaOH. As CIMs obtidas pelo método alternativo foram consideradas equivalentes ao método referência quando ambas apresentaram exatamente o mesmo valor ou diferença de apenas uma diluição. Para fins de comparação, leituras espectrofotométricas em placa foram realizadas conjuntamente com as leituras visuais no tempo 0, 24 e 48 horas. Ainda, a curva de crescimento de *C. albicans* no tempo 0, 24 e 48 horas nos quatro meios de cultura foi determinada. Independente do meio utilizado, no tempo de 24 horas de incubação, a leitura visual da CIM foi de difícil observação. Já o tempo de 48 horas teve concordância com o meio padrão da norma (RPMI-1640) e foi fácil visualizar a CIM. Este resultado corrobora com a indicação da norma M27-A3 que recomenda que para as espécies de *Candida*, a leitura final seja após 48 horas (CLSI, 2008). A dificuldade

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de leveduras só foi possível graças ao desenvolvimento de métodos de referência padrão desenvolvido pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Entretanto, há necessidade de revisão. O estudo teve como objetivo comparar os resultados da CIM do fluconazol obtida com o uso do meio RPMI-1640 (meio padrão), com os resultados obtidos com o uso do meio

da leitura em 24 horas, foi minimizada quando a CIM foi lida em espectrofotômetro, obtendo-se uma leitura mais objetiva. Segundo Kaya et al. (2012), quando se usa procedimentos cinéticos, a CIM das drogas antifúngicas podem ser determinadas em qualquer ponto desejado do período de incubação, não necessariamente tendo que esperar o período de 48 horas para a leitura final. Quanto ao crescimento da levedura nos 4 meios, o meio Sabouraud dextrose contendo peptona bacteriológica, quando comparado aos demais, não favoreceu o crescimento da levedura. Os dados obtidos neste trabalho estimulam mais estudos que investiguem a possibilidade do uso de meios de culturas alternativos e financeiramente econômicos no teste de determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica.

PALAVRAS-CHAVE: Levedura, Microdiluição e Susceptibilidade

The determination of yeast Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was only possible just because to the development of standard reference methods established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). However, there is a need for revision. The study aimed to compare the results of the MIC of fluconazole obtained using the RPMI-1640 medium (standard medium), with the results obtained using the Yeast Nitrogen Base (YNB) and Sabouraud Dextrose medium, containing soy peptone and bacteriological peptone, against *Candida albicans* (ATCC 60193). The microdilution technique was performed according to CLSI standard M27-A3. *C. albicans* was tested in the four culture mediums and in duplicate. For this experiment, all mediums were buffered with 3- (N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) and adjusted to pH 7.0 with sodium hydroxide (NaOH). The MICs obtained by the alternative method were considered equivalent to the reference method when both presented exactly the same value or difference of just one dilution. For comparison purposes, plate spectrophotometric readings were taken together with visual readings at time 0, 24 and 48 hours. In addition, the growth curve of *C. albicans* at time 0, 24 and 48 hours in the four culture mediums was determined. Regardless of the medium used, within 24 hours of incubation, visual reading of the MIC was difficult to observe. However, the time of 48 hours was in accordance with the standard means of the standard (RPMI-1640) and it was easy to visualize the MIC. This result corroborates with the indication of the M27-A3 standard that recommends that for *Candida* species, the final reading should be after 48 hours (CLSI, 2008). The difficulty of reading in 24 hours was minimized when the MIC was read on a spectrophotometer, obtaining a more objective reading. According to Kaya et al. (2012), when using kinetic procedures, the MIC of antifungal drugs can be determined at any desired point in the incubation period, not necessarily having to wait 48 hours for the final reading. As for the growth of yeast in the four culture mediums, the Sabouraud dextrose medium containing bacteriological peptone, when compared to the others, did not favored the growth of the yeast. The data obtained in this work stimulate further studies that investigate the possibility of using alternative and financially economical cultures in the test to determine the sensitivity of yeasts to antifungal therapy.

KEYWORDS: Yeast, Microdilution and Susceptibility

CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Candida* ISOLADAS DA MUCOSA ORAL DE PACIENTES PRÉ E PÓS-CIRURGIA PARA IMPLANTE DENTÁRIO

Data de aceite: 01/06/2020

Eulélia Antônio de Barros

Universidade Paulista – UNIP

Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/6854318693911721>

Vivianny Aparecida Queiroz Freitas

Universidade Federal de Goiás – UFG

Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/7773724647022741>

Andressa Santana Santos

Universidade Federal de Goiás – UFG

Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/0060781584567319>

Carolina Rodrigues Costa

Universidade Federal de Goiás – UFG

Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/2503738140054176>

Antonio Márcio Teodoro Cordeiro Silva

Pontifícia Católica de Goiás – PUC-GO

Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/4256300529988960>

Milton Camplesi Junior

Universidade Paulista – UNIP

Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/6744110022218600>

Fábio Silvestre Ataides

Universidade Paulista – UNIP

Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/9523959031041843>

RESUMO: Este estudo teve por objetivo caracterizar espécies de *Candida* isolados de mucosa oral de pacientes odontológicos antes e após cirurgia para implantes dentários quanto aos fatores de virulência e perfil de suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos. Foram coletadas 21 amostras, utilizando a técnica do bochecho com salina, que posteriormente foram transportadas para o laboratório do IPTSP-UFG, onde foram realizados os testes de identificação fenotípica, atividade enzimática de proteinase, fosfolipase e hemolisina, bem como suscetibilidade *in vitro* para itraconazol e fluconazol. Foram obtidos 23 isolados com identificação de 5 espécies do gênero *Candida*: *C. albicans* (n=9), *C. parapsilosis* (n=9), *C. tropicalis* (n=3), *C. glabrata* (n=1) e *C. guillermondii* (n=1). Foi verificada produção enzimática em 65,2% (n=15) dos isolados, sendo que 19% apresentaram alta atividade em pelo menos uma das enzimas pesquisadas. Foi observada resistência aos antifúngicos em 52,1% (n=12) dos isolados, onde seis *C. albicans* apresentaram resistência para fluconazol e/ou itraconazol, enquanto que três *C. tropicalis* foram resistentes aos mesmos antifúngicos. Entre as espécies identificadas, isolados

de *C. parapsilosis* foram mais suscetíveis tanto para itraconazol como para fluconazol. A resistência *in vitro* aos antifúngicos relacionado com atividade enzimática pelos isolados, pode ser associado à patogenicidade de *Candida* spp., demonstrando que estes fatores podem elucidar a patogênese das infecções superficiais orais, que podem ser foco primário de acometimento invasivo com pior prognóstico.

PALAVRAS-CHAVE: *Candida* spp., Atividade Enzimática, Resistência Fúngica.

CHARACTERIZATION OF *Candida* SPECIES ISOLATED FROM THE ORAL MUCOSA OF PRE AND POST-SURGERY PATIENTS FOR DENTAL IMPLANTS

ABSTRACT: This study aimed to characterize *Candida* species isolated from oral mucosa of dental patients before and after dental implant surgery regarding virulence factors and in vitro susceptibility profile to antifungals. Twenty-one samples were collected using the mouthwash technique, which were later transported to the IPTSP-UFG laboratory, where the phenotypic identification, enzymatic activity of proteinase, phospholipase and hemolysin were performed, as well as in vitro susceptibility to itraconazole and fluconazole. 23 (twenty-three) isolates were obtained with identification of 5 species of genus *Candida*: *C. albicans* ($n = 9$), *C. parapsilosis* ($n = 9$), *C. tropicalis* ($n = 3$), *C. glabrata* ($n = 1$) and *C. guillermondii* ($n = 1$). Enzyme production was verified in 65.2% ($n = 15$) of the isolates, and 19% showed high activity in at least one of the researched enzymes. Antifungal resistance was observed in 52.1% ($n = 12$) of the isolates, where six *C. albicans* showed resistance to fluconazole and/or itraconazole, while three *C. tropicalis* were resistant to the same antifungals. Among the identified species, *C. parapsilosis* isolates were more susceptible to both itraconazole and fluconazole. *In vitro* resistance to antifungals related to enzymatic activity by isolates may be associated with the pathogenicity of *Candida* spp., demonstrating that these factors may elucidate the pathogenesis of oral superficial infections, which may be the primary focus of invasive involvement with poor prognosis.

KEYWORDS: *Candida* spp.; Enzyme Activity; Fungal Resistance.

1 | INTRODUÇÃO

A microbiota bucal é composta de diversos microrganismos, dentre estes, leveduras do gênero *Candida* cujo equilíbrio da relação microrganismo/hospedeiro é fator preponderante para determinar uma condição salutar ou patológica. A alteração deste equilíbrio pode causar infecções oportunistas agudas ou crônicas, como candidíase oral, doença periodontal e perimplantite (CAMPO, 2018). Apesar de comumente restrita, as infecções orais por *Candida* spp. podem determinar capacidade de disseminação hematogênica levando a complicações infecciosas severas e, em muitos casos, fatais (SIQUEIRA et al., 2014).

Mais de 150 espécies compreendem o gênero *Candida*, as mais frequentemente

isoladas e de maior interesse clínico são *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guillermondii* e *C. krusei*. (CORRÊA et al., 2018). O grau de patogenicidade destas leveduras é influenciado pelas condições imunológicas associado com fatores de virulência e baixa suscetibilidade aos antifúngicos dos isolados de *Candida* (GOULART et al., 2018). Assim, as propriedades de virulência como, capacidade de adesão, formação de tubo germinativo, variabilidade fenotípica, produção de exoenzimas como, fosfogliceratase, proteinase, hemolisina, DNase e produção de toxinas, são importantes fatores de virulência que algumas espécies apresentam com intensidade diferente durante a patogênese da infecção fúngica (BEZERRA et al., 2015).

Pacientes em UTI (Unidade de Terapia Intensiva), que fazem uso de imunossupressores ou portadores do vírus HIV tornam-se mais suscetíveis ao desenvolvimento de infecções fúngicas por *Candida* spp. localizadas com risco potencializado de evoluírem para uma infecção sistêmica (SIQUEIRA et al., 2014). Além disso, o uso prolongado de antibióticos também favorece alteração da microbiota oral podendo ter como consequência o desenvolvimento de infecções oportunísticas por estes microrganismos (GOULART et al., 2018). A capacidade de formação de biofilme produzido por algumas espécies de *Candida* permite aderência e colonização em diversos tipos de dispositivos médicos implantados no organismo que são associados ao aumento destas infecções, tais como válvulas cardíacas, cateteres, marca-passos, próteses articulares (DABIRI et al., 2018), *Candida* spp. também foram isolados em implantes dentários acometidos por perimplantite, infecção associada a deterioração de sítios perimplantares que pode incidir na perda do implante (RODRIGUES et al., 2014). A colonização destes materiais favorece a invasão de células de tecidos adjacentes e sua consequente disseminação na corrente sanguínea (DABIRI et al., 2018).

A dificuldade em obter eficácia no tratamento de infecções orais decorrentes do gênero *Candida* tem sido um dos fatores mais preocupantes. Visto que, algumas espécies têm apresentado resistência, intrínseca e/ou adquirida, à terapia antifúngica com azois (GOULART et al., 2018). Dada a relevância do tema, este trabalho teve como objetivo caracterizar espécies de *Candida* isolados de mucosa oral de pacientes odontológicos antes e após cirurgia para colocação de implantes dentários quanto aos fatores de virulência e perfil de suscetibilidade *in vitro*.

2 | METODOLOGIA

Coleta e Isolamento das Amostras

Foram coletadas 21 amostras de pacientes odontológicos submetidos a cirurgia para implante dentário, sendo que 12 adquiridas antes do procedimento cirúrgico e nove após a realização do mesmo. As coletas foram realizadas por meio de bochecho com 10ml de

solução salina estéril por um minuto.

Após a coleta, as amostras foram encaminhadas ao laboratório de micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG), e cultivadas em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD, Difco® Laboratories, EUA) acrescido de cloranfenicol, incubadas por 48 horas à temperatura ambiente. Após o crescimento das colônias estas foram contadas e realizadas análises de suas características macroscópicas e microscópicas.

Testes de Identificação das Espécies de *Candida*

Exame macroscópico – características das colônias em CHOMagar Candida®

Após o crescimento primário das colônias de *Candida* spp. em ágar Sabouraud dextrose, amostras das colônias foram semeadas em CHOMagar *Candida*® e incubadas por 72 horas em temperatura ambiente, posteriormente foi realizado exame macroscópico através da observação da coloração das colônias isoladas (KURTZMAN et al., 2011).

Exame Microscópico - produção de clamidoconídio

As leveduras de *Candida* spp. foram primeiramente crescidas em ágar Sabouraud dextrose e, em seguida, semeadas no meio Ágar Cornmeal® (Sigma-Aldrich) suplementado com 1% de tween 80, incubadas por 3 a 4 dias à temperatura ambiente. Após o período de incubação as colônias foram examinadas por microscopia óptica para observação de clamidoconídios terminais ou intercalares (KURTZMAN et al., 2011).

Assimilação de carboidratos (Auxanograma)

Uma suspensão de fungo contendo aproximadamente 1×10^6 células foi preparada e distribuída em placas de petri, em seguida verteu-se sobre estas 20 mL de meio Yeast Nitrogen Base (YNB-BDTM Difco®) em uma temperatura de aproximadamente 45°C. Depois da solidificação, foram adicionados ao meio pequenas porções de diferentes carboidratos (glicose, sacarose, lactose, galactose, rafinose, xilose, celobiose, trealose e maltose). As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e a assimilação do carboidrato observada a partir do aparecimento de halo de crescimento na área correspondente à cada fonte de carbono (KURTZMAN et al., 2011).

Atividade Enzimática

Proteinase

A avaliação da atividade de proteinase foi realizada utilizando o meio base composto de 18 gramas de ágar (Difco® Laboratories, EUA) dissolvido em 950 mL de água destilada e autoclavado a 120 °C por 15 minutos. Após o resfriamento do meio base a

50°C adicionou-se 11,7 gramas de Yeast Carbon Base (YCB, Difco® Laboratories, EUA), 2 gramas de albumina bovina fração V (Sigma Chemical), 2,5 mL de Protovit (Roche®), dissolvidos em 50 mL de água destilada e esterilizado em membrana millipore de 0,22 µm. No meio distribuído em placas de petri foi inoculado a levedura, sendo que as placas foram incubadas a 37°C por quatro dias. Os resultados da atividade enzimática de proteinase, fosfolipase e hemolisina foram avaliados segundo o método de (PRICE et al., 1982), pelo cálculo da zona de precipitação (Pz) classificada de acordo com os valores em: Pz 0,7 a 0,99 (baixa atividade), Pz 0,4 a 0,69 (atividade moderada) e Pz 0,10 a 0,39 (alta atividade) (CORRÊA et al., 2018).

Fosfolipase

Em placas de petri foi distribuído Ágar Sabouraud Dextrose (ASD, Difco® Laboratories, EUA), contendo 0,11 g CaCl₂, 11,7 g NaCl e água destilada quantidade suficiente para 250 mL o qual foi homogeneizado, autoclavado e acrescido de 10% de emulsão de ovo. Posteriormente, foi realizada a inoculação direta das leveduras com incubação a 37°C durante quatro dias. A leitura da atividade enzimática foi realizada de acordo com o descrito para proteinase (CORRÊA et al., 2018).

Hemolisina

Realizado em ASD suplementado com 3% de glicose e 7% de sangue de carneiro desfibrinado (Newprov, Brasil), preparado e distribuído em placas de petri. Posteriormente foram inoculadas leveduras retiradas de colônias com crescimento prévio de 18 horas, e incubadas pelo período de 24 horas (WAN et al., 2015; TANG et al., 2017).

Teste de suscetibilidade *in vitro*

A avaliação da suscetibilidade das espécies isoladas aos antifúngicos, fluconazol (Pfizer®, Pfizer, Madrid, Spain) e itraconazol (Janssen-Pharmaceuticals®, Estados Unidos) foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, segundo os documentos M27-A3 (CLSI, 2008) e M27-S4 (CLSI, 2012) propostos pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standard Institute*).

Preparação do inóculo

A suspensão do fungo foi preparada a partir de leveduras subcultivadas em ASD, por 24-48 horas a 37°C, com ajuste de concentração do inóculo em espectrofotômetro a 85% (+/- 2) de transmitância no comprimento de onda de 530 nm e diluída em RPMI 1640, á 1:50 e em seguida 1:20, de tal modo que se obteve uma concentração final de 1 a 5 x 10³ UFC/mL.

Procedimento do teste

Os antifúngicos, fluconazol e itraconazol foram dissolvidos em dimetilssulfóxido

(DMSO) e em seguida diluídos em caldo RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium®*). Em uma placa de microtitulação de 96 orifícios de fundo chato foram distribuídos 100 µL do meio RPMI, a partir da segunda até à 10ª coluna. Em seguida foram distribuídos 200 µL dos antifúngicos nos orifícios da primeira coluna da placa e realizada diluição seriadas. Em seguida 100 µL do inóculo foram adicionados em cada orifício, de forma que as concentrações dos antifúngicos estivessem diluídas ao dobro.

A leitura do teste de suscetibilidade foi realizada após 24 horas de incubação a 37°C, com adição de 16 µL de resazurina a 0,02% em cada poço. A concentração inibitória mínima foi determinada como aquela com 50% de inibição comparada ao controle do inoculo. Os valores de suscetibilidade e resistência (breakpoints) foram analisados de acordo com os documentos M27-A3(CLSI, 2008) e M27-S4 (CLSI, 2012). Para assegurar a qualidade do teste, uma cepa padrão *C. parapsilosis*, ATCC 22019, foi utilizada como controle em todos os testes.

3 | RESULTADOS

Foram coletadas 21 amostras do total de 12 pacientes, sendo 11 mulheres e um homem, com idade variando entre 24 e 76 anos que se submeteram a cirurgia para colocação de implantes dentários no período compreendido entre 10/09/2018 a 13/12/18. Das amostras coletadas 100% apresentaram cultura positiva para leveduras no isolamento primário em Ágar Sabouraud o que permitiu realizar a contagem de UFC (unidade formadora de colônias) das amostras clínicas coletadas (Tabela 2).

Das 21 amostras cultivadas obteve-se 23 isolados que foram submetidos a testes de identificação onde foram correlacionadas as características macroscópicas das colônias cultivadas em CHROM Agar Candida®, de assimilação de carboidratos (auxanograma) e características morfológicas inerentes a cada espécie observadas em microscópio óptico após cultivo em Ágar Cornmeal®. Foram identificadas cinco espécies, sendo: *C. albicans* 39,1% (n=9), *C. parapsilosis* 39,1% (n=9), *C. tropicalis* 13,2% (n=3), *C. guilliermondii* (n=1) e *C. glabrata* (n=1) (Tabela 2).

Amostra	Data/ Coleta	UFC /mL	Espécie	Atividade Enzimática (Pz*)		
				Fosfolipase	Proteinase	Hemolisina
P01-A1	10/09/18	30	<i>C. albicans</i>	0,72	0,43	----
P01-A2	27/11/18	60	<i>C. guilliermondii</i>	----	----	----
P02-A1-A	20/09/18	2380	<i>C. albicans</i>	----	0,5	----
P02-A1-B	20/09/18	420	<i>C. tropicalis</i>	0,67	0,27	0,81
P02-A2	09/10/18	210	<i>C. albicans</i>	0,44	----	----
P03-A1	02/10/18	20	<i>C. parapsilosis</i>	----	----	0,35
P03-A2	16/10/18	40	<i>C. glabrata</i>	----	----	0,37

P04-A1	09/10/18	40	C. albicans	----	----	----
P04-A2	19/11/18	30	C. parapsilosis	----	----	----
P05-A1	09/10/18	30	C. albicans	----	0,44	----
P06-A1	29/10/18	430	C. tropicalis	0,70	0,4	----
P06-A2	12/11/18	1010	C. albicans	----	----	----
P07-A1	29/10/18	50	C. parapsilosis	----	----	----
P07-A2	23/11/18	160	C. parapsilosis	----	----	----
P08-A1	08/11/18	300	C. tropicalis	0,79	0,4	----
P09-A1	08/11/18	20	C. parapsilosis	----	0,57	----
P09-A2	26/11/18	1520	C. albicans	0,73	0,5	----
P10-A1	12/11/18	470	C. albicans	----	----	----
P10-A2	19/11/18	10	C. albicans	0,55	----	----
P11-A1	21/11/18	90	C. parapsilosis	0,55	----	----
P12-A1	30/11/18	50	C. parapsilosis	----	----	----
P12-A2-A	13/12/18	90	C. parapsilosis	----	0,36	----
P12-A2-B	13/12/18	74	C. parapsilosis	----	----	0,76

Tabela 2 – Quantificação de UFCs, identificação das espécies de *Candida*, produção e atividade enzimática. * Pz 0,7 a 0,99 (baixa atividade), Pz 0,4 a 0,69 (atividade moderada) e Pz 0,10 a 0,39 (alta atividade).

Os testes de produção de enzimática mostraram que 65,2% (n=15) das amostras apresentaram atividade enzimática, sendo que, 40% foram produzidas pela espécie *C. albicans*, 33,3% por *C. parapsilosis* e 20% produzidas por *C. tropicalis* e 6,7% por *C. glabrata* (Gráfico 1). Das enzimas produzidas pelas espécies, houve predominância de proteinase 60% (n=9), seguida de 53,3% de fosfolipase e 23,7% produziram hemolisina. Cinco amostras (33,3%) produziram proteinase e fosfolipase, e, apenas uma (6,7%) apresentou produção conjunta das três enzimas. Com relação classificação da atividade enzimática, segundo cálculo da Pz, das 21 enzimas produzidas, 19% (n=4) apresentaram atividade alta, 52,4% (n=11) moderada e 28,6% (n=6) baixa (Gráfico 2).

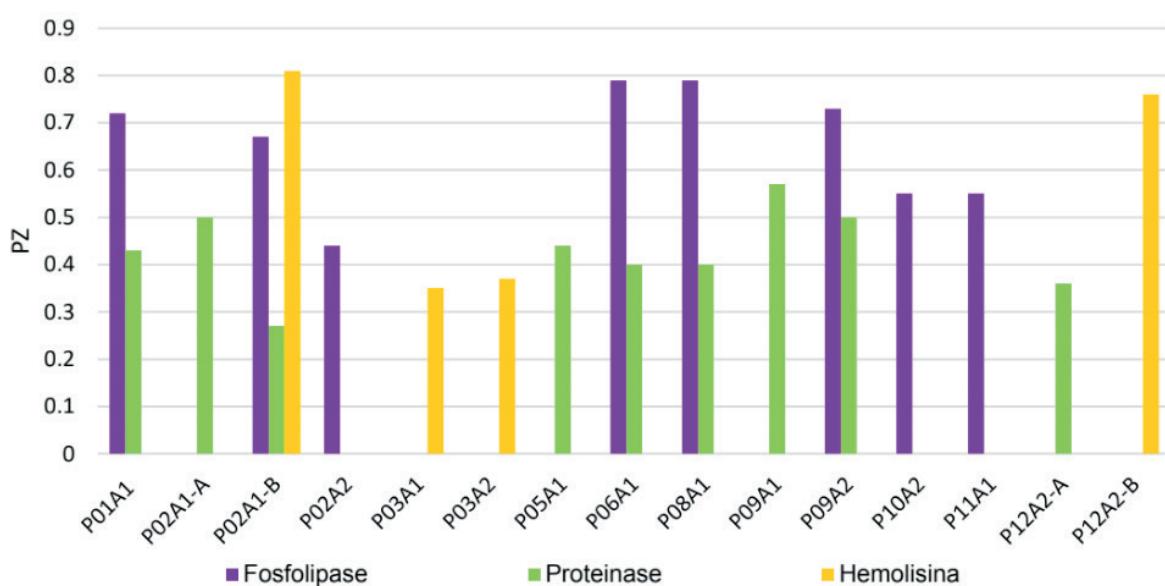


Gráfico 1: Atividade enzimática de acordo com cada isolado de *Candida* identificado.

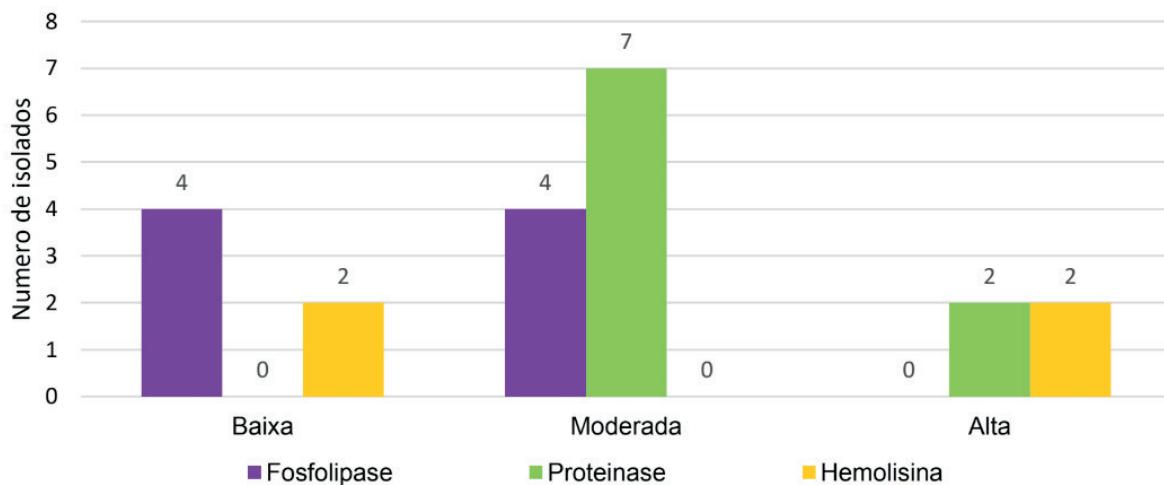


Gráfico 2: Classificação da viaração da atividade enzimática, segundo cálculo da Pz.

Os resultados dos testes de suscetibilidade realizados mostraram que 52,1% (n=12) isolados apresentaram resistência, destas 50% pertenciam eram *C. albicans* (n=6), 25% *C. tropicalis* (n=3), 16,7% *C. parapsilosis* (n=2) e 8,3% *C. glabrata* (n=1) (Tabela 3). Quanto ao índice de resistência relacionado ao tipo de antifúngico, 100% (n=12) apresentaram resistência ao fluconazol e 83,3% (n=10) a itraconazol. Observou-se também que, 77,8% (n=7) dos isolados de *C. parapsilosis* apresentaram sensibilidade para itraconazol e fluconazol, enquanto 100% (n=3) das amostras de *C. tropicalis* apresentaram resistência aos mesmo antifúngicos. Entre as leveduras identificadas como *C. albicans*, 66,7% (n=6) apresentaram resistência ao fluconazol, 44,4% (n=4) a itraconazol e 33,3% (n=3) a ambos. Em 100% das amostras que apresentaram resistência houve produção enzimática, onde 83,3% (n=10) produziram proteinase, 58,3% (n=7) fosfolipase e 33,4% (n=4) hemolisina.

Amostra	Espécie	CIM			
		Itraconazol	Classificação	Fluconazol	Classificação
P01-A1	<i>C. albicans</i>	16	R	64	R
P01-A2	<i>C. guilliermondii</i>	0,062	S	0,25	S
P02A1-A	<i>C. albicans</i>	16	R	32	R
P02-A1-B	<i>C. tropicalis</i>	16	R	64	R
P02-A2	<i>C. albicans</i>	0,062	SDD	64	R
P03-A1	<i>C. parapsilosis</i>	16	R	64	R
P03-A2	<i>C. glabrata</i>	16	R	64	R
P04-A1	<i>C. albicans</i>	0,062	SDD	0,5	S
P04-A2	<i>C. parapsilosis</i>	0,125	S	0,5	S
P05-A1	<i>C. albicans</i>	2	S	64	R
P06-A1	<i>C. tropicalis</i>	16	R	64	R
P06-A2	<i>C. albicans</i>	0,25	SDD	0,5	S

P07-A1	<i>C. parapsilosis</i>	0,062	S	1	S
P07-A2	<i>C. parapsilosis</i>	0,062	S	0,25	S
P08-A1	<i>C. tropicalis</i>	16	R	64	R
P09-A1	<i>C. parapsilosis</i>	0,125	S	0,25	S
P09-A2	<i>C. albicans</i>	16	R	64	R
P10-A1	<i>C. albicans</i>	2	R	2	S
P10-A2	<i>C. albicans</i>	0,031	S	32	R
P11-A1	<i>C. parapsilosis</i>	0,062	S	0,5	S
P12-A1	<i>C. parapsilosis</i>	0,062	S	0,5	S
P12-A2-A	<i>C. parapsilosis</i>	2	S	2	S
P12-A2-B	<i>C. parapsilosis</i>	16	R	64	R

Tabela 3 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) para Itraconazol e Fluconazol. S – Sensível
Sensível Dose Dependente R - Resistente SDD –

4 | DISCUSSÃO

Dos isolados bucais, 60% corresponde a *C. albicans*, cuja alta incidência correlaciona-se ao fato desta levedura fazer parte da microbiota humana (PEIXOTO et al., 2014). Entretanto, vem se observando aumento da incidência oral de isolados de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. guillermondii* (SIQUEIRA et al., 2014).

As infecções oportunistas causadas por leveduras do gênero *Candida* pode ocorrer nas formas mucocutânea, cutânea e sistêmica. Na candidíase mucocutânea, o acometimento oral é a manifestação clínica mais relatada, sendo que a forma pseudomembranosa é mais frequente e está com relação ação de *C. albicans* (PEIXOTO et al., 2014). É frequente o acometimento de candidíase oral em pacientes hospitalizados nas UTIs, sendo que, as espécies de *Candida* mais isoladas na cavidade oral destes pacientes pertencem a *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* (SIQUEIRA et al., 2014).

A virulência e resistência de *Candida* spp. estão associadas a capacidade que algumas espécies possuem de produzir enzimas hidrolíticas como fosfolipase, proteinase e hemolisina. Estas enzimas facilitam a adesão e penetração tecidual (ANDREOLA et al., 2016). A fosfolipase hidrolisa a membrana fosfolipídica propiciando a invasão celular, enquanto a proteinase promove degradação de estruturas proteicas das células defesa do organismo (MENEZES et al., 2016).

Por sua vez, a atividade enzimática da hemolisina lisa os eritrócitos fornecendo o ferro necessário para manter a viabilidade da levedura e consequente proliferação no organismo (BRANCO et al., 2012). Entretanto, a patogenicidade da *C. albicans* possui maior relação com a condição imunológica do hospedeiro do que com os fatores de virulência associados a espécie(CANABARRO et al., 2009; CORRÊA et al., 2018).

As infecções fúngicas sistêmicas estão relacionadas ao tratamento de doenças cuja complexidade demanda maior tempo de internação hospitalar e se configuram em infecções com alta taxa de mortalidade e com custo elevado para o sistema de saúde.

pública. Apesar da importância deste quadro, a identificação precisa das espécies de *Candida*, bem como seu perfil de suscetibilidade ainda são inadequados, não fornecendo informações exatas de forma a auxiliar no tratamento de pacientes acometidos por estas infecções (CASTANHEIRA et al., 2016).

A resistência a antifúngicos pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca está associada a mutações genéticas, dentre os genes alterados, o *ERG11*, *TAC1* e *MRR1*, estão relacionados a resistência de *C. albicans*, ao fluconazol (BERKOW; LOCKHART, 2017). A resistência adquirida ocorre, principalmente, pela exposição sucessiva e/ou contínua a medicamentos como ocorre nas terapias antimicrobiana ou de profilaxia fungica, que promovem a resistência através da seleção de microorganismos capazes de se adaptarem à ação dessas substâncias (MORACE et al., 2014).

Fatores de virulência também possuem relação com a resistência intrínseca, a produção de biofilme reduz a ação da maioria dos antifúngicos, que não conseguem penetrar na matriz exopolimérica produzida pelo biofilme (PERLIN et al., 2017). Cepas resistentes de *Candida* spp. apresentam maior produção de enzimas hidrolíticas como fosfolipase, proteinase, hemolisina com atividade enzimática que varia entre alta e moderada (ANDREOLA et al., 2016; ELLEPOLA et al., 2016; MENEZES et al., 2016; DABIRI et al., 2018), entretanto, a interação entre a produção destas enzimas com algumas substâncias antifúngicas ainda não foi elucidada (UYGUN-CAN et al., 2016).

A suscetibilidade aos antifúngicos é variável entre as diversas espécies de *Candida*, a resistência intrínseca à antifúngicos presente em algumas espécies, aliada a capacidade de outras em desenvolverem resistência adquirida tem se tornado uma das grandes dificuldades de manejo de infecções por *Candida* spp. Outro fator de grande preocupação é a ocorrência de resistência cruzada destas leveduras a múltiplos agentes antifúngicos da classe dos azois, cuja ocorrência já foi demonstrada para *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (SANGUINETTI et al., 2015).

5 | CONCLUSÃO

A baixa suscetibilidade aos antifúngicos associado com a capacidade da atividade de enzimas extracelulares, demonstraram a existência de uma estreita relação entre estes fatores nos processos patogênicos por *Candida* spp.

O crescente aumento na incidência de infecções sistêmicas de alta comorbidade e mortalidade por espécies de *Candida*, aliado ao aumento da resistência evidencia a necessidade de métodos diagnósticos mais precisos que englobem identificação das espécies e perfil de suscetibilidade, de forma a embasar com mais eficácia o tratamento destas infecções e obter melhor prognóstico para o paciente.

REFERÊNCIAS

- ANDREOLA, P.; DEMATHÉ, A.; GALAFASSI, D.; et al. Estudo comparativo entre a produção de fosfolipases extracelulares e proteinases do gênero *Candida* isoladas a partir de infecções de cavidade oral. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 45, n. 4, p. 219–26, 2016.
- BERKOW, E. L.; LOCKHART, S. R. Fluconazole resistance in *Candida* species : a current perspective. **Dovepress**, v. 10, p. 237–45, 2017.
- BEZERRA, É.; RICETO, D. M.; PAULA, R. DE; et al. Enzymatic and hemolytic activity in different *Candida* species. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 32, n. 2, p. 79–82, 2015.
- BRANCO, P. V. G. C.; ANJOS, D. C. V. DOS; NASCIMENTOS, F. B. DO; VALE, I. N. F. Prevalência e produção de exoenzimas de pacientes com Aids e indivíduos hígidos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, n. 4, p. 427–41, 2012.
- CAMPO, M. J. A. Características do microbioma bucal humano. **Journals Dentistry Public Healt**, v. 9, n. 2, p. 42–52, 2018.
- CANABARRO, A.; MARQUES, D. V. G.; COELHO, J. C.; LAZERA, M.; WANKE, B. Yeasts in chronic periodontitis: literature review. **Revista Clínica Pesquisa Odontológica**, v. 5, n. 2, p. 135–9, 2009.
- CASTANHEIRA, M.; MESSEY, S. A.; RHOMBERG, P. R.; PFALLER, M. A. Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates: Results of the SENTRY Antifungal Surveillance Program (2013). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 85, n. 2, p. 200–4, 2016.
- CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard**. CLSI document M27-A3. 2008.
- CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeasts**. CLSI document M27-S4. 2012.
- CORRÊA, T. C. F.; FÁBIO RAPHAEL MOREIRA CÁUPER, G. H. D.; CÁUPER, L. L. DE B.; COSTA, S. DE S.; DINI, V. S. Q. Isolamento e caracterização de cepas de *Candida* sp . em pacientes do município de Iranduba-AM e sua susceptibilidade ao extrato de Psidium guajava Linn. **Scientia Amazonia**, v. 7, n. 2, p. 1–11, 2018.
- DABIRI, S.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Comparative analysis of proteinase , phospholipase , hydrophobicity and biofilm forming ability in *Candida* species isolated from clinical specimens. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 28, n. 3, p. 437–42, 2018.
- ELLEPOLA, A. N. B.; SAMARANAYAKE, L. P.; KHAN, Z. U. Extracellular phospholipase production of oral *Candida albicans* isolates from smokers , diabetics , asthmatics , denture wearers and healthy individuals following brief exposure to polyene , echinocandin and azole antimycotics. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 911–16, 2016.
- GOULART, L. S.; SOUZA, W. W. R. DE; VIEIRA, C. A.; et al. Colonização oral por espécies de *Candida* em pacientes HIV positivo: estudo de associação e suscetibilidade antifúngica. **Einstein, São Paulo**, v. 16, n. 3, p. 1–6, 2018.
- KURTZMAN, C. P.; CAI, J. W.; BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. **The Yeasts**. 5th ed. 2011.
- MENEZES, E. A.; BARBOSA, A. C. L.; CUNHA, M. DA C. DOS S. O.; MENDES, L. G.; CUNHA, F. A. Suscetibilidade a antifúngicos e fatores de virulência de *Candida* spp . isoladas em Russas , Ceará. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 48, n. 1, p. 33–8, 2016.
- MORACE, G.; PERDONI, F.; BORGHI, E. Resistance Antifungal drug resistance in *Candida* species. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 2, n. 4, p. 254–9, 2014.

PEIXOTO, J. V.; ROCHA, M. G.; NASCIMENTO, R. T. L.; MOREIRA, V. V.; KASHIWABARA, T. G. B. Candidíase - uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 8, n. 2, p. 75–82, 2014.

PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance : prevalence , mechanisms , and management. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. e383–e92, 2017. Elsevier Ltd.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate methods for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 20, p. 7–14, 1982.

RODRIGUES, F.; SMANIO, J. A.; SMANIO NETO, H. Antibioticoterapia no tratamento da peri-implantite. **ImplantNews**, v. 11, n. 2, p. 203–10, 2014.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLÖRL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, p. 2–13, 2015.

SIQUEIRA, J. DA S. S.; BATISTA, S. A.; JÚNIOR, A. S.; et al. Candidíase oral em pacientes internados em UTI. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 71, n. 2, p. 176–9, 2014.

TANG, W. G.; KAMONVORADEJ, N.; CHOMCHAT, C.; et al. Prevalence and virulence factors of *Candida* spp. associated with blow flies. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 5, p. 428–31, 2017.

UYGUN-CAN, B.; KADIR, T.; GUMRU, B. Effect of oral antiseptic agents on phospholipase and proteinase enzymes of *Candida albicans*. **Archives of Oral Biology**, v. 62, p. 20–7, 2016.

WAN, L.; LUO, G.; LU, H.; et al. Changes in the hemolytic activity of *Candida* species by common electrolytes. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2015.

CRESCIMENTO DE CRYPTOCOCCUS GATTII EM MEIO DE CULTURA FEITO A PARTIR DE SERRAPILHEIRA DO SOLO DA FLORESTA AMAZÔNICA

Data de aceite: 01/06/2020

Silviane Bezerra Pinheiro

Universidade Federal do Amazonas

pinheiro21sb@gmail.com

Edinaira Sulany Oliveira de Souza

Universidade Federal do Amazonas

Joao Vicente Braga de Souza

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

As leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* possuem distribuição global apresentando oito genótipos principais. A infecção por esse complexo é grave causando 180.000 mortes anualmente e sequelas irreversíveis. No Amazonas, estudos revelam isolamentos ambientais de *C. neoformans* (VNI) a partir de excretas de aves e de *C. gattii* (VGII) associado a material em decomposição, poeira domiciliar, água e solo. Devido essa associação do *C. gattii* com o solo e material em decomposição, nosso trabalho almeja produzir um meio de cultura utilizando a serrapilheira (camada de folhas e galhos) do solo amazônico. A serrapilheira foi coletada da superfície do solo de uma área de floresta localizada no Instituto Nacional de Pesquisas

da Amazônia. Em seguida o material foi esterilizado a 120 °C por 15 minutos e colocada para secar a 150 °C por duas horas, triturado e peneirado. Foram feitos dois tipos de meio de cultura. O primeiro com 100 g de serrapilheira, 20 g de ágar, 250 mg de antibiótico para 1000 mL de água destilada. O segundo com a mesma constituição, mas suplementado com 20 g de glicose e foi feito o controle com apenas Agar e água destilada. Foi inoculado nos respectivos meios de cultura em duplicata 0,1 mL da suspensão fúngica dos quatro genótipos de cepas de referência, WM 179 (VGI), WM 178 (VGII), WM 161 (VGIII), WM 779 (VGIV), foi para crescer em estufa a temperatura de 25 °C. O crescimento foi observado a cada 24 horas por sete dias. Não houve crescimento de leveduras no controle (agar e água), mas em ambos os meios de cultura houve crescimento de *C. gattii*. No meio com serrapilheira as colônias tiverem crescimento menor e apresentaram cor marrom brilhante. No entanto, no meio contendo serrapilheira suplementado com glicose as colônias cresceram com diâmetro maior, coloração marrom e com textura creme brilhante. Mediante esses resultados observamos que a composição do meio de cultura pode alterar a morfologia das células fúngicas. O meio de cultura utilizando a

serrapilheira suplementado com glicose tem potencial para o cultivo de *Cryptococcus*, pois a serrapilheira fornece N, K, Ca e compostos fenólicos e a glicose as cadeias carbônicas essenciais para a produção das biomoléculas. Além disso, esse meio oferece menor custo, fácil produção e pode ser utilizado para crescimento tanto leveduras quanto fungos filamentosos.

PALAVRAS-CHAVE: Amazônia; Criptococose; Meio de cultivo

ABSTRACT: The yeasts of the *Cryptococcus neoformans* / *Cryptococcus gattii* complex have a global distribution with eight main genotypes. Infection with this complex is serious, causing 180,000 deaths annually and irreversible sequelae. In Amazonas, studies reveal environmental isolations of *C. neoformans* (VNI) from bird excreta and *C. gattii* (VGII) associated with decomposing material, household dust, water and soil. Due to this association of *C. gattii* with the decomposing soil and material, our work aims to produce a culture medium using the litter (layer of leaves and branches) of the Amazonian soil. The litter was collected from the soil surface of a forest area located at the National Institute of Amazonian Research. Then, the material was sterilized at 120 ° C for 15 minutes and placed to dry at 150 ° C for two hours, crushed and sieved. Two types of culture medium were made. The first with 100 g of litter, 20 g of agar, 250 mg of antibiotic to 1000 mL of distilled water. The second with the same constitution, but supplemented with 20 g of glucose and the control was made with only agar and distilled water. In duplicate, 0.1 mL of the fungal suspension of the four genotypes of reference strains, WM 179 (VGI), WM 178 (VGII), WM 161 (VGIII) and WM 779 (VGIV), were inoculated in the respective culture media and grown in an oven at 25 ° C. Growth was observed every 24 hours for seven days. There was no growth of yeasts in the control (agar and water), but in both culture mediums there was growth of *C. gattii*. In the medium with litter, the colonies had less growth and showed a bright brown color. However, in the medium containing litter supplemented with glucose, the colonies grew with a larger diameter, brown color and with a bright cream texture. Through these results, we observed that the composition of the culture medium can alter the morphology of fungal cells. The culture medium using the litter supplemented with glucose has potential for the cultivation of *Cryptococcus*, since the litter provides N, K, Ca and phenolic compounds and glucose is the essential carbon chains for the production of biomolecules. In addition, this medium offers lower cost, easy production and can be used for growth of both yeasts and filamentous fungi.

KEYWORDS: Amazon, Cryptococciosis, Culture medium

APOIO

Fundação de Amparo a Pesquisa no Amazonas

ESTUDO SOBRE A DIVERSIDADE DE FUNGOS ZOOSPÓRICOS QUE OCORRERAM NO LAGO DO PURAQUEQUARA, MANAUS, AMAZONAS

Data de aceite: 01/06/2020

Jean Ludger Barthelemy

Universidade Federal do Amazonas

barthelemy.bibi@yahoo.fr

Maria Ivone Lopes Da Silva

Universidade Federal do Amazonas

marivone@ufam.edu.br

RESUMO: Os organismos zoospóricos são formados por fungos e pseudofungos, se caracterizam por apresentar flagelos em seus esporos reprodutivos. Esses organismos estão enquadrados em três reinos: Fungi, Chromista e Protista. Afim de aumentar o conhecimento sobre a diversidade de organismos zoospóricos na região Amazônica, foram coletadas alíquotas de água e do solo das margens, ao longo do lago, no mês de junho de 2017 e no mês de outubro de 2017. As amostras coletadas foram processadas no laboratório conforme método, de iscagem múltipla, preconizado por Milanez & Beneke (1968). A identificação dos fungos zoospóricos foi realizada através da observação de características microscópicas das estruturas desenvolvidas nos fragmentos das iscas. Foram identificados 24 táxons de fungos aquáticos, distribuídos em 14 gêneros: *Catenophlyctis*

do filo *Blastocladiomycota*; *Chytromyces*, *Cladochytrium*, *Diplophlyctis*, *Gonapodya*, *Karlingia*, *Nowakowskia*, *Podochytrium* e *Rhyzophydiun* do filo *Chytridiomycota*. O gênero que mais ocorreu foi *Rhyzophydiun*. A espécie *Rhyzophydiun sphaerotheca*, foi a mais abundante, aparecendo em todas as amostras coletadas e a espécie *Rhyzophydiun stipitatum* foi a mais rara. Para o filo Oomycota foram identificados os gêneros: *Achlya*, *Aphanomyces*, *Dictiuchus*, *Leptolegniella* e *Pythiogeton*. Sendo, a espécie mais frequente foi: *Achlya prolifera*, com sete ocorrências entre água e solo, e a espécie menos frequente foi *Aphanomyces helicoides*. Os resultados demonstram que a diversidade de fungos zoospóricos pode ser ainda mais elevada no lago Puraquequara, justificando a continuidade dos levantamentos na região para ampliar os conhecimentos sobre a sistemática e ecologia dos mesmos.

PALAVRAS-CHAVE: diversidade, Amazônia, zoospóricos, água, solo

ABSTRACT: Zoosporic organisms are formed by fungi and pseudofungi, they are characterized by having flagella on their reproductive spores. These organisms are framed in three kingdoms: Fungi, Chromist and Protist. In order to increase knowledge about the diversity of zoosporic

organisms in the Amazon region, aliquots of water and soil were collected from the banks, at various points, along the Puraquequara lake, in the months of June 2017 and October 2017. The collected samples were processed in the laboratory according to the multiple bait method, recommended by Milanez & Beneke (1968). The identification of zoosporic fungi was carried out through the observation of microscopic characteristics of the reproductive structures developed in the fragments of the cellulosic, chitinous and keratinous substrates (baits). 24 taxa of aquatic organisms were identified, distributed in 14 genres. In the Fungi kingdom, the Catenophlyctis of the phylum Blastocladiomycota were identified; *Chytriomyces*, *Cladochytrium*, *Diplophlyctis*, *Gonapodya*, *Karlingia*, *Nowakowskella*, *Podochytrium* and *Rhyzophydiuum* of the phylum Chytridiomycota. The genus that most occurred was *Rhizophydiuum*, with the species *Rhyzophydiuum sphaerotheca*, being the most abundant, appearing in all samples collected and *Rhyzophydiuum stipitatum* the rarest. Some species such as: *Catenophlyctis variabilis*, *Nowakowskella elegans* and *Cladochytrium replicatum* were found in water and soil samples. For the phylum Oomycota belonging to the Chromist Kingdom, the genera: *Achlya*, *Aphanomyces*, *Dictiuchus*, *Leptolegniella* and *Pythiogeton* were identified. The most frequent species was: *Achlya proliferoides*, with seven occurrences between water and soil, and the rarest was *Aphanomyces helicoides*. Most of the detected species were found in the two compartments but *Leptolegniella keratinophyla* was isolated alone from the soil of the first collection. The results demonstrate that the diversity of zoosporic fungi may be even higher in the Puraquequara Lake, justifying the continuity of surveys in the region to increase knowledge about their systematics and ecology.

KEYWORDS: Zoospores, Amazon, Diversity, soil, water

1 | INTRODUÇÃO

Os fungos são definidos como microrganismos eucariontes, aclorofilados, heterótrofos, que se alimentam por absorção e que possuem parede celular constituída por quitina e β-glucano. Podem ser unicelulares e/ou multicelulares, microscópicos e/ou macroscópicos. Possuem reprodução assexuada e/ou sexuada (Kirk et al., 2008). Dentro desse grupo diversificado se destacam os fungos zoospóricos.

Os fungos zoospóricos se referem aos organismos que apresentam flagelos em suas estruturas produtivas. São heterotróficos e são amplamente distribuídos nos mais diversos ecossistemas aquáticos e terrestres. São encontrados geralmente como sapróbios, parasitas e também existem algumas espécies que fazem associações mutualistas com outros organismos (Alexopoulos et al., 1996 ; Moreira & Schoenlein-Crusius, 2010).

Apresentam grande importância tanto nos ecossistemas aquáticos quanto nos terrestres. Além disso, são conhecidos por serem os consumidores primários na cadeia alimentar. (Alexopoulos et al., 1996).

As principais representantes dos fungos zoospóricos pertencem aos filos Oomycota (reino Chromista) e Chytridiomycota (reino Fungi). (Kirk et al., 2008).

O filo Chytridiomycota inclui organismos heterotróficos com paredes quitinosas, que se alimentam por absorção. Possui 706 espécies distribuídas em duas classes, Chytridiomycetes e Monoblepharidomycetes e oito ordens: Chytridiales, Cladophytiales, Lobulares, Lomycetales, Polychytales, Rhizophlyctis, Rhizophydiales, Spizellomycetales e Monoblepharidales. Blastocladiomycota, filo criado a partir de Blastocladiiales, possui apenas uma classe, Blastocladiomycetes e possui 179 espécies (Kirk et al., 2008).

O Filo Oomycota possui apenas uma classe, Oomycetes, 12 ordens, e 808 espécies (Gomes & Pires-Zottarelli, 2006). Possuem zoósporo biflagelado, com flagelos desiguais, sendo um liso e um franjado (Moreira & Schoenlein-Crusius, 2010).

Embora vários estudos tenham sido realizados no Brasil sobre esses organismos, o conhecimento da diversidade do grupo no país é ainda baixo. Essa situação é evidente na região amazônica, pois a maioria dos ambientes, ainda não foram pesquisados. Alguns estudos foram iniciados na década de 40, com a intenção de aprofundar os conhecimentos a cerca de qual seria a variedade de espécies de organismos zoospóricos seriam presentes na região. Entretanto ainda são poucos os trabalhos que apontam como foco principal essa situação em áreas de preservação ou não, se comparados com a extensão de recursos hídricos existentes na Amazônia. (Silva, 2002; Utumi, 2010, Silva e Ferreira, 2012, Ferreira, 2013 e Paiva, 2013).

Nesse sentido, esse trabalho tem como objetivo levantar a diversidade de organismos zoospóricos em diferentes pontos ao longo do lago do Puraquequara, Manaus, Amazonas.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Descrição da área de estudo

A área de estudo localiza-se no bairro de Puraquequara (S 03° 03' 06.95" e W 59° 52' 31.38"), Zona Leste da cidade de Manaus, Estado do Amazonas. Este bairro existe há aproximadamente 100 anos e surgiu na primeira metade do século XX, fundado por 23 famílias ribeirinhas que se instalaram às margens do rio Amazonas. A primeira Vila da Comunidade do Puraquequara formou-se às margens do rio. Após o declínio da Época Áurea da Borracha, em 1918, várias famílias de ribeirinhos instalaram-se no local, em áreas alagadas, dando origem a uma comunidade flutuante (SILVA, 2010).

2.2 Locais de coleta

As coletas foram feitas no lago Puraquequara, existente no bairro Puraquequara, no mês de junho 2017 e no mês de outubro 2017. Na primeira coleta, foram selecionados 4 pontos ao longo do lago e na segunda coleta, 5 pontos. Durante a primeira coleta, o lago estava em período de cheia, refletindo no volume de água do lago, e durante a segunda, o lago estava em período de seca.

Em cada ponto foram coletadas alíquotas de água (em torno de 100 ml em vidros

previamente esterilizados e etiquetados) e o solo das margens em sacos plásticos novos e etiquetados (300g). Após a coleta o material foi encaminhado para o laboratório de fungos Aquáticos, instituto de Ciências Biológicas-ICB da Universidade Federal do Amazonas-UFAM, para serem processados.



Figuras 1: Alguns pontos de coleta amostrados nas áreas selecionadas, lago Puraquequara, nos meses de junho/2017 e outubro/2017

2.3 Isolamento dos fungos aquáticos de água e solo

A preparação das amostras coletadas de água e solo foi executada de acordo com os modelos preconizados por Sparrow (1960) e Scott (1961) in Milanez & Beneke (1968) que consiste na iscagem múltipla com substratos citados a seguir: duas metades de sementes previamente esterilizadas de sorgo (*Sorghum sp*), duas unidades ecdise de cobra, exoesqueleto de camarão, palha de milho, celofane, cebola, além de fragmentos de cabelo loiro de criança e também grãos de pólen.

As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por aproximadamente 7 a 15 dias. Após o desenvolvimento das colônias, em torno dos substratos (iscas), essas foram analisadas em microscópico óptico para identificação dos organismos desenvolvidos e em seguida re-inoculadas nas placas de Petri com novos substratos mergulhados em água destilada.

2.4 Identificação e preservação dos fungos isolados

A identificação dos fungos aquáticos foi realizada através da observação de características microscópicas das colônias desenvolvidas em fragmentos das iscas, montados sobre lâmina e lamínula, utilizando água destilada, comparando com bibliografia especializada: Johnson (1956), Sparrow (1960), Scott (1961), Seymour (1970), Karling (1977), Rocha (2002), Silva (2002), Pires – Zottarelli (2007), etc. Após identificação, os fungos dependendo do grupo taxonômico foram preservados em água destilada estéril ou montados em lâminas com corante azul de algodão para posterior fotografia e armazenados em caixas no laminário do Laboratório de Fungos Aquáticos para futuros

estudos.

2.5 Determinação dos fatores Ambientais

2.5.1 Temperatura

Para determinação da temperatura do solo e da água foram utilizados termômetros, no momento da coleta.

2.5.2 pH

O pH das amostras de água foi determinado no momento da coleta por meio de pHmetro manual.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 18 amostras analisadas, sendo 9 de água e 9 do solo, foram identificados 24 táxons, 18 ocorrentes em água e 20 em solo. Diversos autores citam a preferência desses organismos por ambientes terrestres próximos a corpos d'água, devido maior quantidade de matéria orgânica para decomposição. Silva (2002), Utumi (2010), Porto (2010), em trabalhos realizados anteriormente para a região Amazônica também citam maior frequência para ambientes terrestres.

Dessas amostras foram identificados 18 táxons em nível específico e 6 somente a nível de gêneros, sendo uma espécie pertencente ao filo Blastocladiomycota, 14 espécies dentro de 10 gêneros, filo Chytridiomycota, ambos pertencentes ao Reino Fungi (Tabela 1) e 9 espécies dentro de 5 gêneros pertencentes ao filo Oomycota, Reino Chromista (Tabela 2).

3.1 Discussão sobre as espécies identificadas pertencentes aos Filos Blastocladiomycota e Chytridiomycota

Conforme mostrado na tabela 1, foi identificado um gênero para o filo Blastocladiomycota, sendo ele *Catenophlyctis* e 8 gêneros pertencentes ao filo Chytridiomycota, sendo eles: *Chytriomyces*, *Cladochytrium*, *Diplophlyctes*, *Gonapodya*, *Karlingia*, *Nowakowskella*, *Podochytrium* e *Rhyzophydiuum*. Ordem Chytridiales foi a mais representativa com 5 táxons e Monoblepharidales a menos, com dois táxons.

Os táxons identificados são considerados cosmopolitas e já foram identificados anteriormente para o estado do Amazonas. Dentre os táxons isolados, a espécie *Rhyzophydiuum sphaerotheca* foi a mais abundante, aparecendo em todos as amostragens e em seguida a espécie *Catenophlyctis variabilis*, aparecendo em 8 amostragens. Silva (2002) também cita a predominância de *Catenophlyctis variabilis* em ecossistemas

aquáticos nos igarapés da UFAM, porém a abundância das espécies *Chytromyces spinosus* e *Rhizophidium elyense* citadas por Silva (2002) não se repetiram nas amostras da área de coleta. No trabalho de Porto (2010) também foi observada uma abundância da espécie *Rhyzophydiump sphaerotheca* e *Catenophlyctis variabilis*. Dentre os táxons isolados a espécie *Rhizophydiump stipitatum* foi a menos frequente, aparecendo apenas em uma amostra de água.

Reino Fungi				
Táxons/ Meses de coleta			jun/17	out/17
Filo Blastocladiomycota	Ordem Blastocladiales	<i>Catenophlyctis variabilis</i>	A-S	A-S
Filo Chytridiomycota	Ordem Chytridiales	<i>Chytromyces hyalinus</i>	S	A-S
		<i>Chytromyces spinosus</i>		S
		<i>Diplophlyctis sarcotooides</i>		A
		<i>Karlingia granulata</i>	A-S	S
		<i>Karlingia rosea</i>	S	
	Ordem Cladochytriales	<i>Cladochytrium replicatum</i>	A	S
		<i>Nowakowskella elegans</i>	A-S	A-S
		<i>Podochytrium sp.</i>		A
		<i>Polychitruim aggregatum</i>	A-S	S
	Ordem Monoblepharidales	<i>Gonapodya prolifera</i>		S
	Ordem Rhizophidiales	<i>Rhyzophydiump elyense</i>	S	A-S
		<i>Rhyzophydiump sphaerotheca</i>	A-S	A-S
		<i>Rhyzophydiump stipitatum</i>		A
		<i>Rhyzophydiump sp.</i>		A

Tabela 1. Táxons observados nos nove diferentes pontos de coleta de água e solo no lago Puraquequara, pertencentes ao Reino **Fungi**, em junho e outubro/ 2017.

A = água, S = solo

Reino Chromista				
Táxons/Meses de coleta			Jun/17	Out/17
Filo Oomycota	Ordem Leptomytales	<i>Aphanomyces helicoides</i>		S
		<i>Aphanomyces irregulare</i>	A-S	S
		<i>Aphanomyces sp.</i>		A-S
		<i>Leptolegniella keratinophyla</i>	S	
	Ordem Pythiales	<i>Pythiogeton ramosum</i>	A-S	A-S
		<i>Pythiogeton sp.</i>	A	A-S
	Ordem Saprolegniales	<i>Achlya prolifera</i>	A-S	
		<i>Achlya sp.</i>	A	A-S
		<i>Dictiuchus sp.</i>	A	

Tabela 2: Táxons observados nos nove diferentes pontos de coleta de água e solo no lago Puraquequara pertencentes ao Reino **Chromista**, em junho e outubro/ 2017.

A = água, S = solo

Os táxons identificados são considerados cosmopolitas e já foram identificados

anteriormente para o estado do Amazonas. Dentre os táxons isolados, a espécie *Rhyzophydium sphaerotheca* foi a mais abundante, aparecendo em todos as amostragens e em seguida a espécie *Catenophlyctis variabilis*, aparecendo em 8 amostragens. Silva (2002) também cita a predominância de *Catenophlyctis variabilis* em ecossistemas aquáticos nos igarapés da UFAM, porém a abundância das espécies *Chytromyces spinosus* e *Rhizophidium elyense* citadas por Silva (2002) não se repetiram nas amostras da área de coleta. No trabalho de Porto (2010) também foi observada uma abundância da espécie *Rhyzophydium sphaerotheca* e *Catenophlyctis variabilis*. Dentre os táxons isolados a espécie *Rhizophydium stipitatum* foi a menos frequente, aparecendo apenas em uma amostra de água.

Na segunda coleta foi observada uma maior diversidade de organismos zoospóricos do que na primeira. As espécies: *Chytromyces spinosus*, *Diplophlyctis sarcoptoides*, *Gonapodya prolifera* e *Rhyzophydium stipitatum*. foram observadas somente na segunda coleta.

3.2 Descrição e ilustração das espécies identificadas pertencentes aos filos Blastocladiomycota e Chytridiomycota

Reino FUNGI

Filo BLASTOCLADIOMYCOTA

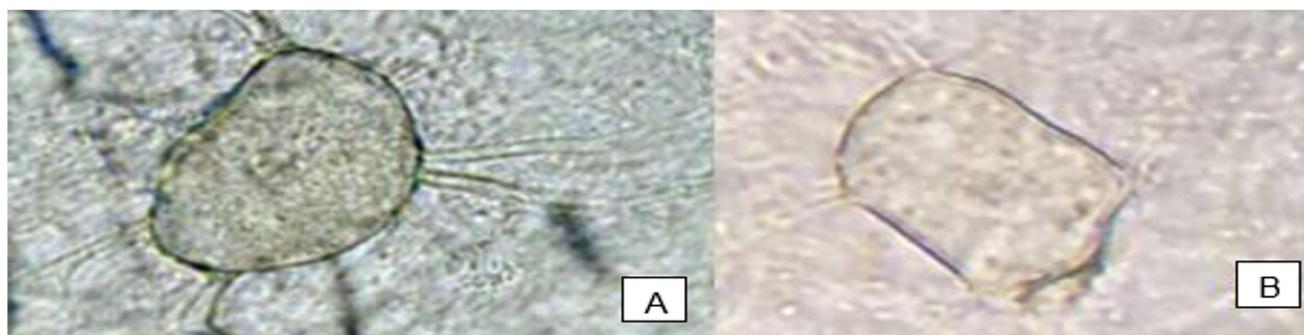
Ordem BLASTOCLADIALES

Catenophlyctis variabilis (Karling) Karling, American Journal of Botany 52: 134. 1965. Basiônimo: *Phlyctorhiza variabilis* Karling, American Journal of Botany 34: 27. 1947. Figura 03.

Ocorre em: Amazonas, Piauí, Pernambuco, Minas Gerais, São Paulo (Silva, 2002, Schoenlein-Crusius et al., 2006, Milanez et al., 2007, Pires-Zottarelli & Gomes, 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli, 2010, Utumi, 2010, Jesus et al. 2013, Porto, 2015).

Material examinado: BRASIL. Amazonas: lago Puraquequara (S 03° 03' 06.95" e W 59° 52' 31.38"), em todos os pontos de coleta, em amostras de água e solo. Sapróbio em ecdisse de cobra, concordando com as citações de Karling (1945).

Descrição da espécie: Talo eucárpico, monocêntrico ou policêntrico e intramatrical no início de seu desenvolvimento. Zoosporângios geralmente irregulares, inoperculados de tamanhos e formas muito variáveis, principal característica da espécie, com um a três tubos para liberação de zoósporos (Nascimento & Pires-Zottarelli 2012, Jerônimo et al. 2015)



A) Aspecto geral do zoosporângio.

Fonte: Pires-Zottarelli 2007.

B) Zoosporângio.

Fonte: Ludger

Figura 03: *Catenophlyctis variabilis* Karling.

Reino FUNGI

Filo CHYTRIDIOMYCOTA

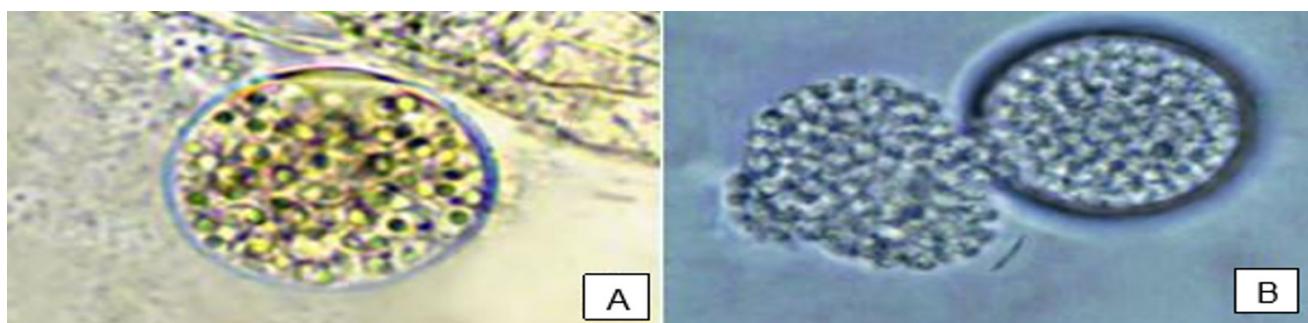
Ordem CHYTRIDIALES

Chytromyces hyalinus Karling, Am. J. Bot. 32: 363. 1945. Figura 04.

Ocorre em: Amazonas, Piauí, Minas Gerais, São Paulo (Utumi, 2010, Jerônimo et al., 2015, Porto, 2015).

Material examinado: BRASIL. Amazonas: Lago puraquequara ($S\ 03^{\circ}\ 03' 06.95''$ e $W\ 59^{\circ}\ 52' 31.38''$), no ponto 4, em amostras de água e solo. Saprobio em exoesqueleto de camarão, concordando com Karling (1945), papel celofane e epiderme de cebola, concordando com Sparrow Jr (1960) e ecdisse de cobra.

Descrição da espécie: Possui talo eucárpico, monocêntrico, extra e/ou intramatrical; Zoosporângios operculados, hialinos, esféricos, ovais, apofisados ou não; Parede lisa; Liberação dos zoósporos por meio de opérculo localizado apical/subapicalmente nos zoosporângios. Zoósporos encistados, com uma gotícula lipídica hialina, característica da espécie (Nascimento & Pires-Zottarelli, 2007, Jerônimo et al. 2015)



A) Zoosporângio.

Fonte: Nascimento & PiresZottarelli 2012)

B) Zoosporângio liberando zoósporos.

Fonte: Pires-Zottarelli 2007

Figura 04: *Chytromyces hyalinus*

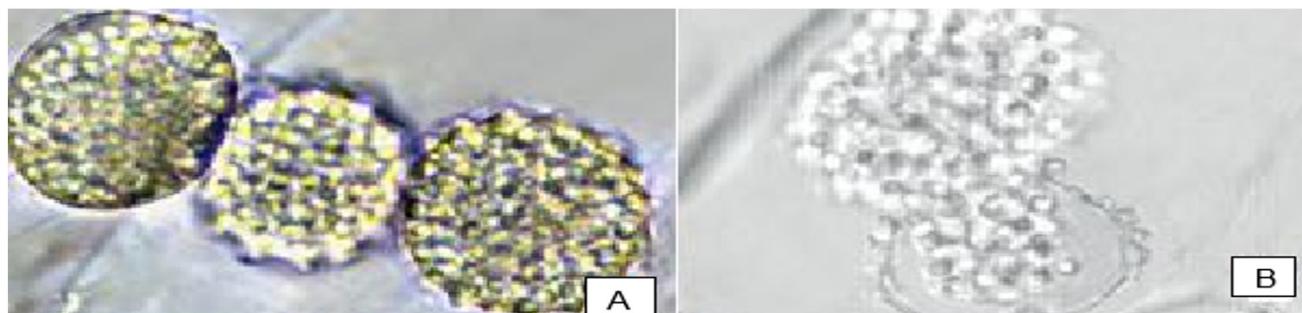
Chytromyces spinosus Fay, Mycologia 39: 152. 1947. Figura 05.

Ocorre em: Amazonas, Piauí, São Paulo (Silva, 2002, Rocha, 2002, Pires-Zottarelli

& Gomes 2007, Porto, 2015)

Material examinado: BRASIL. Amazonas: lago Puraquequara (S 03° 03' 06.95" e W 59° 52' 31.38"), nos pontos 1 e 2, em amostras de solo. Sapróbio em papel celofane, palha de milho e epiderme de cebola. Espécie encontrada apenas em substratos celulósicos, concordando com Fay (1947) e Pires-Zottarelli (2007).

Descrição da espécie: Talo eucárpico, monocêntrico, extra-intramatriarcal. Zoosporângios hialinos, operculados, obpiriformes, alguns esféricos, ornamentados com espinhos agudos simples, não bifurcados, principal característica da espécie. Zoósporos esféricos ou subesféricos com única gotícula lipídica (Nascimento & Pires-Zottarelli 2009).



A) Zoosporângios

Fonte: Nascimento & PiresZottarelli 2012.

B) Zoosporângio liberando zoósporos.

Fonte: Nascimento & PiresZottarelli 2007

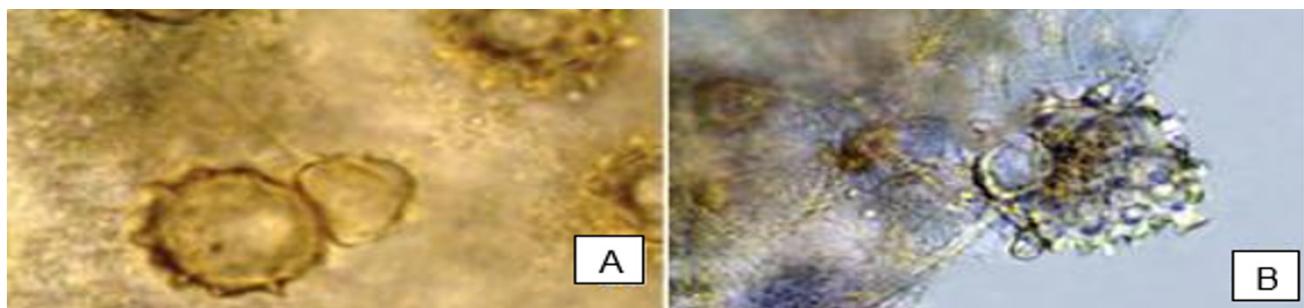
Figura 05: *Chytromyces spinosus*.

Diplophlyctis sarcotooides (H. E. Petersen) Dogma Jr., Nova Hedwigia 25: 122. 1974. Basiônimo: *Asterophlyctis sarcotooides* H. E. Petersen, J. Bot. 17: 218. 1903. Figura 06.

Ocorre em: Amazonas, Minas Gerais, Piauí, Rondônia, São Paulo (Schoenleinrusius et al., 2006, Pires-Zottarelli & Gomes 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli, 2009, Utumi, 2010, Jesus et al., 2013, Porto, 2015).

Material examinado: BRASIL. Amazonas: lago Puraquequara (S 03° 03' 06.95" e W 59° 52' 31.38"), nos pontos 1 e 5, em amostras de água e solo. Sapróbio em epiderme de cebola e exoesqueleto de camarão, concordando com Dogma Jr. (1974).

Descrição da espécie: Talo eucárpico, monocêntrico, intramatrical. Zoosporângios inoperculados e apofisados, com ornamentação tuberculadas, espinhosas ou papiladas, características da espécie. Zoósporos com uma gotícula lipídica, liberados em massa por um tubo de descarga (Nascimento & Pires-Zottarelli 2009).



A) Zoosporângio com apófise.
Fonte: Nascimento & Pires-Zottarelli 2007.

B) Zoosporângio apofisado.
Fonte: Nascimento & Pires-Zottarelli 2012

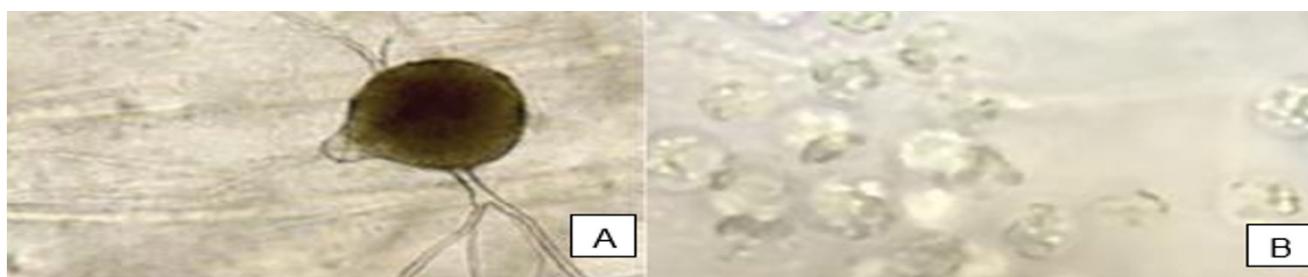
Figura 06: *Diplophlyctis sarcotooides* Dogma Jr.

Karlingia granulata Karling, Mycologia 39: 57.1947. Basiônimo: *Karlingiomycetes granulatus* (Karling) Sparrow, Aquatic Phycomycetes, 2nd ed., 563. 1960. Figura 07.

Ocorre em: Amazonas, Mato Grosso, São Paulo (Karling 1947, Silva, 2002, Utumi, 2010, Jerônimo et al., 2015, Porto 2015).

Material examinado: BRASIL. Amazonas: lago Puraquequara (S 03° 03' 06.95" e W 59° 52' 31.38"), nos pontos 2,3 e 4 em amostras de água e solo. Sapróbio em epiderme de cebola e palha de milho, concordando com Rocha & Pires-Zottarelli (2002). Nascimento & Pires-Zottarelli (2012) sugerem que a espécie tem preferência por substratos celulósicos, porém, a mesma foi observada em iscas ecdise de cobra, exoesqueleto de camarão.

Descrição da espécie: Talo eucárpico, monocêntrico, extra/intramatrical. Zoosporângios lisos e hialinos, exoperculados e endoperculados, esféricos, subesféricos e ovais, sua parede pode enrugar após liberação de zoósporos. Zoósporos esféricos com numerosas gotículas lipídicas hialinas (Jerônimo et al. 2015).



A) Zoosporângio operculado
Fonte: Nascimento & Pires-Zottarelli (2007).

B) Zoósporos.
Fonte: Ludger

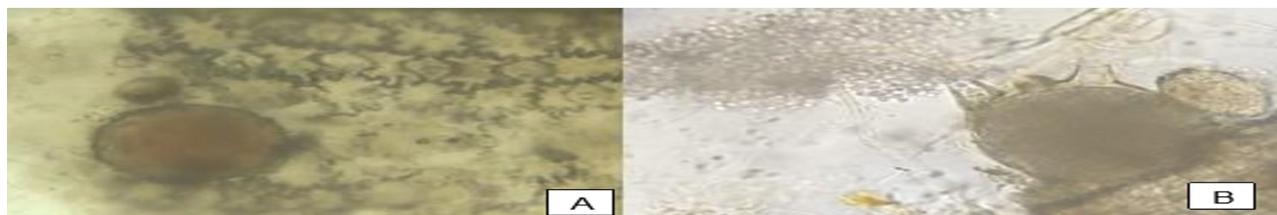
Figura 07: *Karlingia granulata* Karling.

Karlingia rosea (de Bary & Woronin) Johanson, Am. J. Bot. 31:399. 1944. Basônomo: *Rhizophlyctis rosea* (De Bary & Woronin) A. Fish, Rabenhorst's Kryptogamen-Fl. 1: 122. 1891. Figura 08.

Ocorre em: Acre, Amazonas, Piauí, Maranhão, Rondônia, Goiás, Mato Grosso do Sul, Paraíba, Alagoas, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul (Karling, 1944, Joffily, 1947, Rocha & Pires-Zottarelli, 2002, Silva, 2002, Utumi, 2010, Nascimento & Pires-Zottarelli, 2012, Jerônimo et al., 2015, Porto 2015)

Material examinado: BRASIL. Amazonas: Lago Puraquequara (S 03° 03' 06.95" e W 59° 52' 31.38") nos pontos 1,2,3 e 4, em amostras de solo. Sapróbio em palha de milho e papel celofane, concordando com Rocha & Pires-Zottarelli 2002, Nascimento & Pires-Zottarelli (2012), Pires-Zottarelli & Gomes 2007, mostrando assim uma preferência da espécie por substratos celulósicos.

Descrição da espécie: Talo eucárpico, monocêntrico, extra-intramtrical. Zoosporângios exoperculados, esféricos, parede espessa, conteúdo róseo alaranjado, com três tubos para liberação de zoósporos. Zoósporos esféricos (ROCHA et al. 2002)



A) Zoosporângio em palha de milho.

Fonte: Bianca Porto.

B) Zoosporângio liberando zoósporos.

Fonte: Ludger

Figura 08: *Karlingia rosea* Karling.

Reino FUNGI

Filo CHYTRIDIOMYCOTA

Ordem CLADOCHYTRIALES

Cladocytrium replicatum Karling, American Journal of Botany 18: 538. 1931.

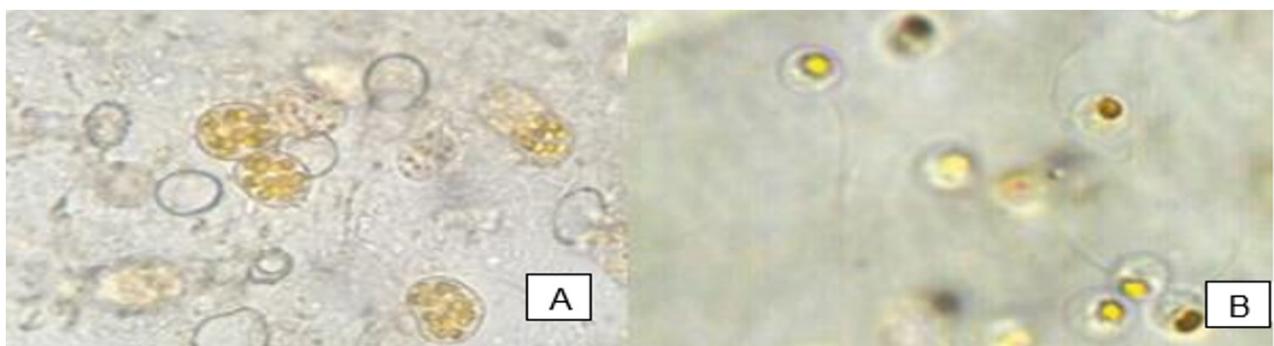
Figura 09.

Ocorre em: Amazonas, Piauí, Ceará, Pernambuco, Acre, Rondônia, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo (Schoenlein-Crusius et al. 2006, Pires-Zottarelli & Gomes 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli, 2009, 2012, Ferreira, 2014, Jesus et al., 2013, Porto, 2015)

Material examinado: lago Puraqueraquera (S 03° 03' 06.95" e W 59° 52' 31.38"), nos pontos 3 e 4 em amostras de água e solo. Sapróbio em palha de milho e epiderme de cebola, concordando com Rocha & Pires-Zottarelli (2002), Pires-Zottarelli & Gomes (2007), Nascimento & Pires-Zottarelli (2012), Jerônimo et al. 2015. Sugerindo assim uma preferência da espécie por substratos celulósicos.

Descrição da espécie: Talo eucárpico, policêntrico, intramatrical. Zoosporângios lisos, inoperculados, não apofisados, normalmente terminais, esféricos e ovaiss, produzindo um

único tubo de liberação. Zoósporos com uma única gotícula lipídica dourada, característica da espécie (Jerônimo et al. 2015 e Nascimento & Pires-Zottarelli, 2012).



A) Zoosporângios com zoósporos.

Fonte: Ludger.

B) Zoósporos

Fonte: Pires-Zottarelli (2007)

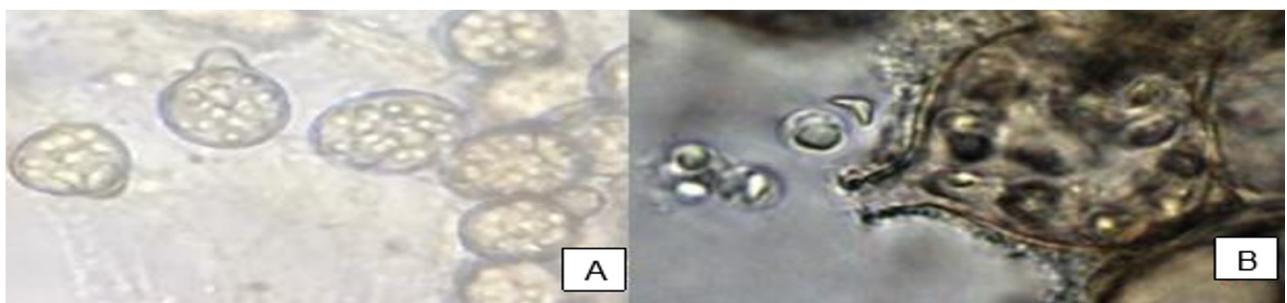
Figura 09: *Cladophytrium replicatum* Karling.

Nowakowskia elegans (Nowak.) Schroeter, Engler and Prantl, Naturlichen Pflanzenfam. 1: 82. 1892/1893. Basônimo: *Cladophytrium elegans* Nowak, pro parte, in Cohn, Beitr. Biol. Pflanzen 2: 95. 1876. Figura 10.

Ocorre em: Amazonas, Piauí, Paraíba, Pernambuco, Rondônia, São Paulo (Rocha & Pires-Zottarelli 2002, Pires-Zottarelli & Gomez 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli, 2012, Porto, 2015).

Material examinado: BRASIL. Amazonas: lago Puraquequara ($S\ 03^{\circ}\ 03' 06.95''$ e $W\ 59^{\circ}\ 52' 31.38''$), nos pontos 1 e 5, em amostras de água e solo. Sapróbio em palha de milho, ecdise de cobra e papel celofane, concordando com Rocha & Pires-Zottarelli (2012), Pires-Zottarelli & Gomes (2007), Nascimento & Pires-Zottarelli (2012). Sugerindo assim, uma preferência da espécie por substratos celulósicos.

Descrição da espécie: Talo eucárpico, policêntrico, extra-intramatrical. Zoosporângios operculados, hialinos, apofisados ou não, esféricos ou piriformes. Zoósporos incistados com uma gotícula lipídica conspícua (Rocha & Pires-Zottarelli 2002, Nascimento & Pires-Zottarelli 2009).



. A) Zoosporângios.

Fonte: Bianca Porto.

B) Zoosporângio liberando zoósporos.

Fonte: Pires-Zottarelli (2007).

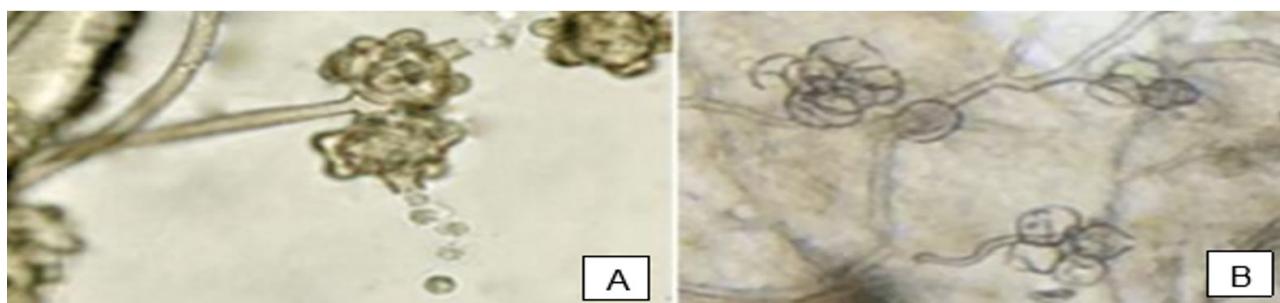
Figura 10: *Nowakowskia elegans* Schroeter

***Polchytrium aggregatum* Ajello, Mycologia 34: 442. 1942. Figura 11**

Ocorre em: Amazonas, Piauí, São Paulo (Karling, 1943, Silva, 2002, Schoenlein-Crusius et al., 2006, Pires-Zottarelli & Gomes 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli, 2012, Jerônimo et al., 2015, Porto, 2015)

Material examinado: BRASIL. Amazonas: lago Puraquequara (S 03° 03' 06.95" e W 59° 52' 31.38") nos pontos 2,3 e 4, em amostras de água e solo. Sapróbio em exoesqueleto de camarão, ecdise de cobra, concordando com Nascimento & Pires-Zottarelli (2012), Pires-Zottarelli & Gomes (2007), Jerônimo et al. (2015). Apesar de ser mais comum em substratos quitinosos, a espécie também colonizou substratos celulósicos, como palha de milho e epiderme de cebola.

Descrição da espécie: Talo policêntrico, com rizomicélio extensivo, ramificados, hialino, tornando-se marrom-amarelados na maturidade. Zoosporângios inoperculados e prolíferos, terminais ou intercalares, formando agregados em um rizomicélio ramificado. Zoósporos esféricos com numerosas gotículas lipídicas (Pires-Zottarelli 2002 & Gomes 2007, Jerônimo et al. 2015).



A) Zoosporângio liberando zoósporos.

Fonte: Pires-Zottarelli (2007).

B) Zoosporângios vazios.

Fonte: Ludger

Figura 11: *Polchytrium aggregatum* Ajello.

Reino FUNGI

Filo CHYTRIDIOMYCOTA

Ordem MONOBLEPHARIDALES

***Gonapodya prolifera* (Cornu) A. Fisch. Rabenhorst Kryptogamenflora 1: 382. 1892.**

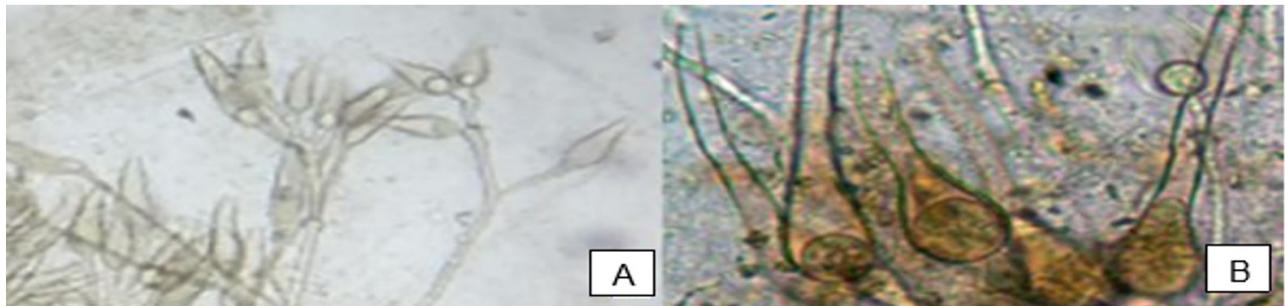
Basiônimo: Monoblepharis prolifera Cornu, Bulletin de la Société Botanique de France 24: 226. 1877. Figura 12.

Ocorre em: Amazonas, Minas Gerais, Piauí, São Paulo (Silva, 2002, Pires-Zottarelli & Gomes, 2007, Utumi, 2010, Nascimento & Pires-Zottarelli, 2012, Jerônimo et al., 2015, Porto, 2015)

Material examinado: BRASIL. Amazonas: lago Puraquequara (S 03° 03' 06.95" e

W 59° 52' 31.38''), nos pontos 2,3 e 5, em amostras de solo. Sapróbio em semente de *Sorghum sp.*, concordando com Pires-Zottarelli (2012).

Descrição da espécie: Micélio com hifas regulares formando pseudo-septos, dividindo-as em segmentos clavados. Zoosporângios obclavados, com proliferações internas, base inflada, porção distal alongada e afunilada. Zoósporos ovais, alguns esféricos (Karling, 1977, Pires-Zottarelli & Gomes, 2007 e Jerônimo et al. 2015).



A) Zoosporângios.

Fonte: Ludger

B) Zoosporângios.

Fonte: Jerônimo et al (2015).

Figura 12: *Gonapodya prolifera* Fish.

Reino FUNGI

Filo CHYTRIDIOMYCOTA

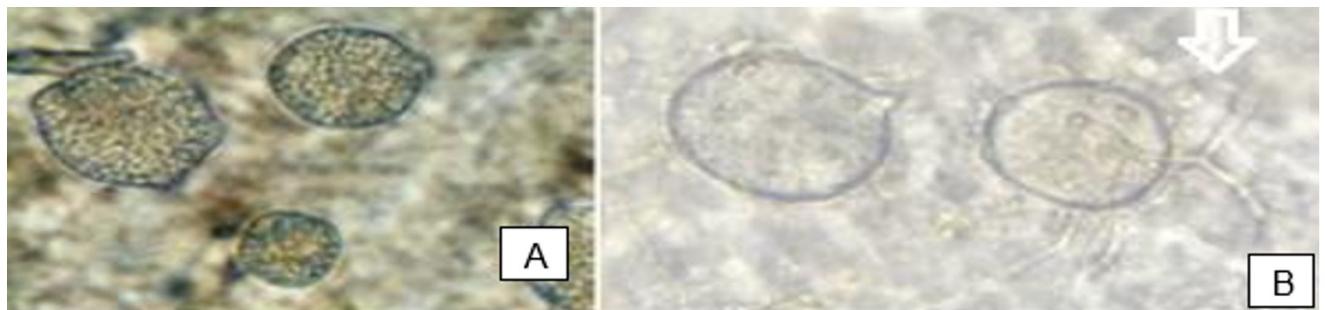
Ordem RHIZOPHYDIALES

Rhizophydiumpelyense Sparrow, Transactions of the British Mycological Society 40: 525. 1957. Figura 13.

Ocorre em: Amazonas, Piauí, São Paulo (Silva, 2002, Pires-Zottarelli & Gomes, 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli, 2008, Nascimento & Pires-Zottarelli, 2008, Utumi, 2010, Jerônimo et al., 2015, Porto, 2015)

Material examinado: BRASIL. Amazonas: lago Puraquequara (S 03° 03' 06.95'' e W 59° 52' 31.38'') nos pontos 1,2,3 e 4, em amostra de água e solo. Sapróbio em ecdise de cobra, corroborando com Nascimento & Pires-Zottarelli (2009), Nascimento & Pires-Zottarelli (2012), Jerônimo et al. (2015).

Descrição da espécie: Talo eucárpico, monocêntrico, extra-intramatrical. Zoosporângios sésseis, hialinos, esféricos, angulares ou poliédricos, formado entre 2 a 5 papilas para liberação dos zoósporos. Zoósporos esféricos, com uma única gotícula lipídica hialina (Jerônimo et al. 2015).



A) Zoosporângios em ecdise de cobra.

Fonte: Pires-Zottarelli & Gomes (2007).

B) Rizóide.

Fonte: Ludger

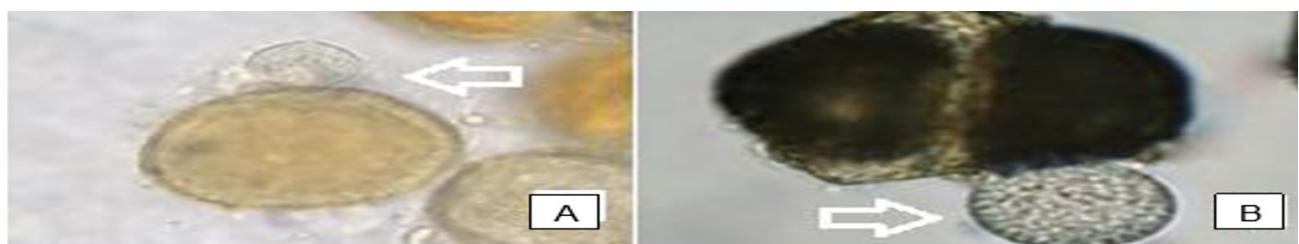
Figura 13: *Rhizophydium elyense* Sparrow.

Rhizophydium sphaerotheca Zopf, Abhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft zu Halle 17: 92.1887. Figura 14.

Ocorre em: Amazonas, Pernambuco, Piauí, Rondônia, São Paulo (Ferreira, 2014, Jerônimo et al., 2015, Porto, 2015).

Material examinado: Brasil. Amazonas: lago Puraquequara ($S\ 03^{\circ}\ 03' \ 06.95''$ e $W\ 59^{\circ}\ 52' \ 31.38''$), em todos os pontos de coleta, amostras de água e solo. Sapróbio em grãos de pólen, concordando com Pires-Zottarelli & Gomes (2007). Espécie frequentemente aparece em grãos de pólen.

Descrição da espécie: Talo eucárpico, monocêntrico, extra-intramatrical. Sistema rizoidal curto, delicado, levemente dilatado e ramificado. Zoosporângios esféricos, lisos, hialinos, inoperculados, com 2 a 3 papilas de liberação dos zoósporos. Zoósporos encistados com um único glóbulo lipídico hialino (Pires-Zottarelli & Gomes 2007).



A) Zoosporângios em grãos de pólen.

Fonte: Ludger.

B) Zoosporângios em grãos de pólen.

Fonte: Pires-Zottarelli & Gomes (2007)

Figura 14: *Rhizophydium sphaerotheca* Zopf

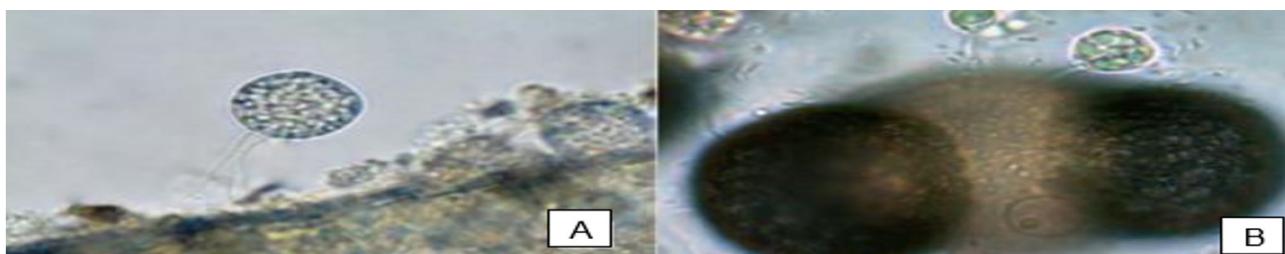
Rhizophydium stipitatum Sparrow, Transactions of the British Mycological Society 40: 527. 1957. Figura 15.

Ocorre em: Amazonas, Pernambuco, Piauí, Rondônia, São Paulo (Silva, 2002, Rocha, 2006, Pires-Zottarelli & Gomes 2007, Nascimento & Pires-Zottarelli 2012, Porto,

2015)

Material examinado: BRASIL. Amazonas: lago Puraquequara (S 03° 03' 06.95" e W 59° 52' 31.38"), no ponto, em amostra de agua. Sapróbio em grãos de pólen, concordando com Pires-Zottarelli & Gomes (2007), Nascimento & Pires-Zottarelli (2012).

Descrição da espécie: Talo eucárpico, monocêntrico, extra-intramatrical. Sistema rizoidal pedunculado, extramatrical, saindo da base do zoosporângio. Zoosporângios lisos, hialinos, esféricos. Zoósporos encistados, com uma única gotícula lipídica



A) Zoosporângio.

Fonte: Pires-Zottarelli & Gomes (2007).

B) Zoosporângio em grão de pólen.

Fonte: Jerônimo et al (2015).

Figura 15: *Rhizophydiump stipitatum* Sparrow.

3.3 Discussão sobre as espécies identificadas pertencentes ao filo Oomycota

Conforme mostrado na tabela 2, foram identificados 9 táxons, sendo 5 em nível específico e 4 a nível de gênero, distribuídos em 3 ordens, Leptomitales, Pythiales e Saprolegniales. Leptomitales, foi representada por 2 gêneros e 4 espécies, sendo elas: *Aphanomyces helicoides*, *Aphanomyces irregulare*, *Aphanomyces* sp. e *Leptolegniella keratinophila*. Saprolegniales teve 2 gêneros e 3 espécies, sendo eles: *Achylya profifera*, *Achylya* sp., *Dichitiucus* sp. Pythiales foi representado por apenas um gênero e 2 espécies: *Pythiogeton ramosum* e *Pythiogeton* sp..

O gênero *Dictyuchus* foi identificado apenas em amostra de água. Os gêneros *Aphanomyces* e *Achylya* foram os mais abundantes aparecendo em todo período amostrado. Esse resultado corroborou com o resultado de Porto (2010) que no seu trabalho foi visto uma alta abundância dos gêneros *Aphanomyces* e *Achylya*.

A espécie *Achylya prolifera* foi a espécie com maior abundância, ocorrendo em todas as coletas. A espécie *Aphanomyces helicoides* foi a espécie menos representativa, sendo identificada apenas na segunda coleta em uma amostra do solo.

Não houve uma grande diferença na diversidade de táxons identificados entre a primeira (chuvisca) e a segunda coleta (seca). Sendo, na primeira coleta foram identificados 7 táxons e na segunda 6 táxons.

3.4 Descrição e ilustração das espécies pertencentes ao Reino Chromista, Filo Oomycota

Reino CHROMISTA

Filo OOMYCOTA

Ordem LEPTOMITALES

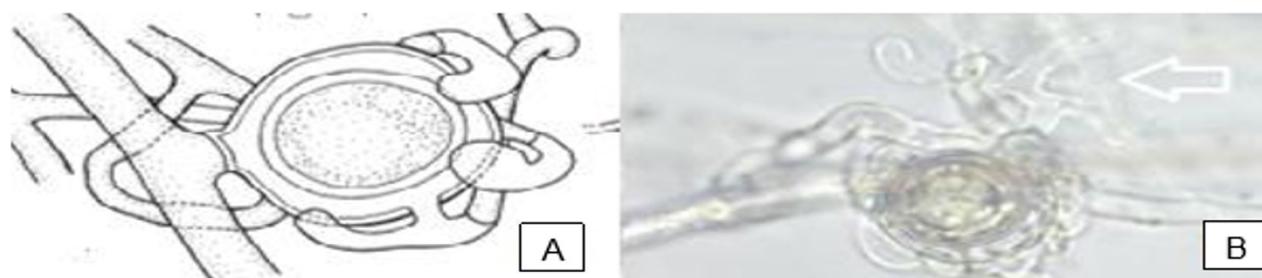
Aphanomyces helicoides von Minden, Kryptogamenfl. Mark Brandenburg 5: 559.

1915. Figura 16

Ocorre em: Amazonas, Piauí, São Paulo (Silva 2002, Rocha 2002, Pires-Zottarelli & Rocha, 2007).

Material examinado: BRASIL. Amazonas: lago Puraquequara (S 03° 03' 06.95" e W 59° 52' 31.38"), no ponto 2, em amostras de solo. Saprobio em ecdise de cobra, concordando com Pires-Zottareli & Rocha (2007) e palha de milho.

Descrição da espécie: Zoosporângios cilíndricos, longos. Zoósporos dispostos em uma única fileira dentro dos zoosporângios. Zoósporos encistados. Oogônios castanho-amarelados, esféricos, parede lisa. Anterídios díclinos e monóclinos, envolvendo o pedúnculo oogonial e oogônios, células anteridiais clavadas, atracação lateral. Oósporos castanho-amarelados, 1 por oogônio, subcênicos, esféricos. Alguns estudos citam *Aphanomyces helicoides* como basônimo de *Aphanomyces laevis* Bary, porém precisa-se de mais estudos para poder confirmar tal fato (Pires-Zottarelli & Rocha, 2007). Espécie citada pela primeira vez no Brasil por Silva (2002).



A) Desenho esquemático Oogônio lateral com oosporo e anterídios diclinos.

Fonte: Pires-Zottarelli & Rocha (2007).

B) Rizóides.

Fonte: Ludger

Figura 16: *Aphanomyces helicoides* von Minden.

Aphanomyces irregularis Scott, A monograph of the Genus *Aphanomyces*, Va. Agr. Exp. Sta, Tech. Bul. 151:47-48. 1961. Figura 17.

Material examinado: BRASIL. Amazonas: lago Puraquequara (S 03° 03' 06.95" e W 59° 52' 31.38"), nos pontos 1,2,3 e 4, em amostra de água e solo, substrato exoesqueleto de camarão.

Ocorre em: Amazonas, São Paulo (Paiva, dados não publicados, Pires-Zottarelli &

Rocha, 2007, Utumi, 2010, Porto 2015).

Descrição da espécie: Zoosporângios longos. Zoósporos encistado. Oogônios esféricos, laterais, ocasionalmente intercalares e terminais, parede oogonial irregular, papilas esparsas algumas vezes presentes. Anterídios presentes; ramos anteridiais monoclinos. Células anteridiais tubulares, simples, com atracação lateral. Oosporos excêntricos, esféricos (Pires-Zottarelli & Rocha, 2007). Espécie citada pela primeira vez no Amazonas por Paiva & Silva (2013).

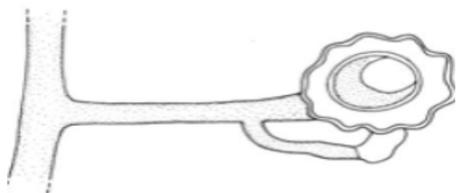


Figura 17: *Aphanomyces irregularis* Scott. Desenho esquemático: Oogônio lateral, oosporo excêntrico. Fonte: Pires-Zottarelli & Rocha (2007)

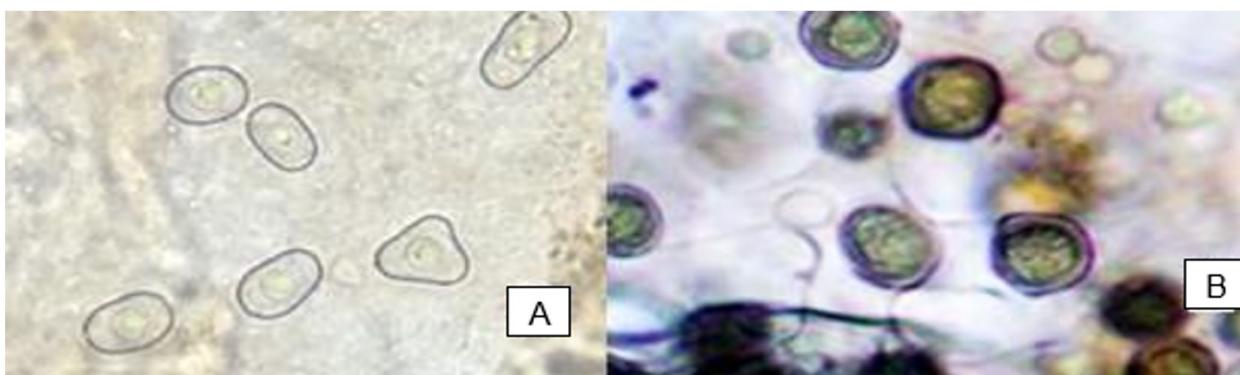
***Leptolegniella keratinophila* Huneycutt, J. Elisha Mitchell Sci. Soc. 68: 110. 1952.**

Figura 18.

Ocorre em: Amazonas, Pernambuco, Piauí, São Paulo (Rocha & Pires-Zottarelli 2002; Gomes & Pires-Zottarelli 2006, Gomes & Pires-Zottarelli 2008, Utumi, 2010, Porto, 2015).

Material examinado: BRASIL. Amazonas: lago Puraquequara ($S\ 03^{\circ}\ 03' 06.95''$ e $W\ 59^{\circ}\ 52' 31.38''$), nos pontos 1 e 2, em amostras de solo, semente de Sorghum sp

Descrição da espécie: Talo extensivo, ramificado, intramatrical. Esporos de resistência formados dentro de hifas irregulares, ramificadas, característica da espécie. Esporos ovais ou esféricos. Zoosporângios ramificados, indiferenciados do micélio vegetativo. Zoósporos emergindo incompletamente formados, diplanéticos (Rocha & Pires-Zottarelli 2002; Gomes & Pires-Zottarelli 2006, Gomes & Pires-Zottarelli 2008)



A) Zoosporângios.

Fonte: Ludger.

B) Esporos de resistência.

Fonte: Nascimento & Pires-Zottarelli (2012).

Figura 18: *Leptolegniella keratinophila* Huneycutt.

Reino CHROMISTA

Filo OOMYCOTA

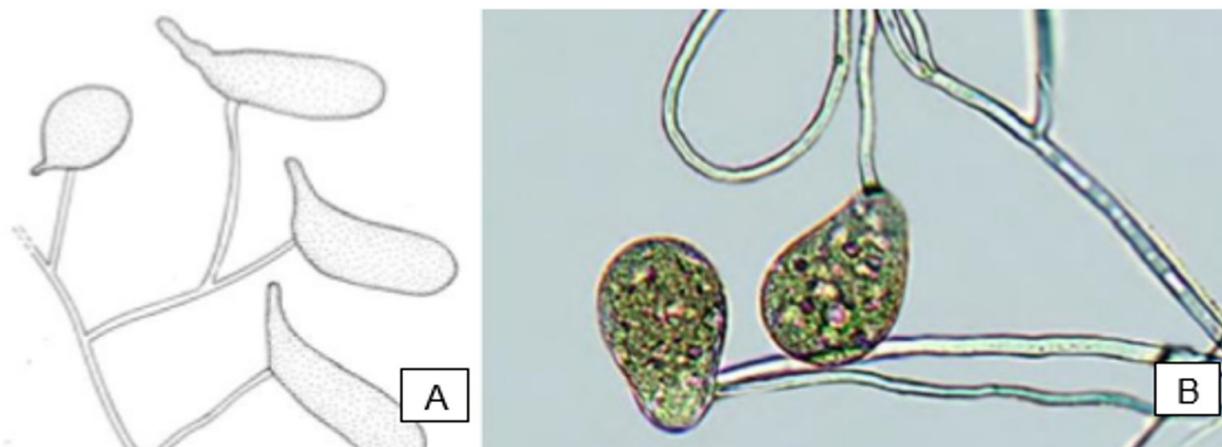
Ordem PYTHIALES

Pythiogeton ramosum Minden, Falck, Mykol. Unters. Berichte 1: 243. 1916. Figura 19.

Ocorre em: Amazonas, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo (Silva, 2002, Utumi, 2010, Nascimento & Pires-Zottarelli, 2012, Porto, 2015). Figura 24

Material examinado: BRASIL, Amazonas: lago Puraquequara (S 03° 03' 06.95" e W 59° 52' 31.38"), nos pontos 2,3 e 4, em amostras de água e solo. Sapróbio em palha de milho e semente de *Sorghum sp*, concordando com Gomes & Pires-Zottarelli (2008), Nascimento & Pires-Zottarelli (2012), indicando possivelmente a preferência da espécie por substratos celulósicos.

Descrição da espécie: Zoosporângios esféricos, piriformes, terminais, ovais ou irregulares. Zoósporos encistados. Ausência de reprodução sexuada (Rocha & Pires-Zottarelli 2002, Gomes & Pires-Zotteralli 2008, Nascimento & Pires-Zottarelli 2012).



A) Desenho esquemático zoosporângio.

Fonte: Rocha & Pires-Zottarelli (2002).

B) Zoosporângio.

Fonte: Nascimento & Pires-Zottarelli (2012).

Figura 19: *Pythiogeton ramosum* Minden.

Reino CHROMISTA

Filo OOMYCOTA

Ordem SAPROLEGNIALES

Achlya prolifera Nees, Nova Acta Acad. Leop. Carol., 11: 514. 1823. Figura 20.

Ocorre em: Amazonas, Minas Gerais, São Paulo (Silva, 2002, Gomes & Pires-Zottarelli, 2008, Porto, 2015).

Material examinado: BRASIL. Amazonas: lago Puraquequara (S 03° 03' 06.95" e W 59° 52' 31.38"), nos pontos 1, 2, 3 e 4, em amostras de água e solo, semente de *Sorghum*

sp.

Descrição da espécie: Zoosporângios fusiformes. Liberação dos zoósporos aclióide. Zoósporos encistados. Oogônios laterais, esféricos, ou parede oogonal lisa, pedúnculo simples. Anterídios díclinos envolvendo pedúnculo e oogônio. Oósporos excêntricos, esféricos, preenchendo o oogônio (Gomes & Pires-Zottarelli 2007)



Figura 20: *Achyala prolifera*. Anterídio díclinos enrolados no oogônio.

Fonte: Gomes & Pires-Zottarelli (2008).

3.5 Preferência dos táxons identificados por tipo de substrato (iscas).

A importância dos substratos celulósicos, queratinosos e quitinosos para o crescimento dos organismos zoospóricos foi demonstrada por Sparrow (1960) e Barr (2001). Sparrow forneceu uma lista com os substratos que esses organismos utilizavam como meio de cultura (Jerônimo et al. 2015).

Os substratos mais utilizados como iscas evidenciam que a maioria dos organismos zoospóricos utilizou os substratos celulósicos, seguido por quitinosos e por último queratinosos. Entre os substratos celulósicos, a palha de milho demonstrou ser a mais evidente, com 21,96% das colonizações e epiderme de cebola, foi o substrato com menos colonizações (1,73%).

4 | CONCLUSÕES

Os resultados obtidos deste trabalho ampliam os dados sobre a diversidade de fungos zoospóricos para a região amazônica, porém não houve identificação de nenhuma espécie que não tenha sido encontrado em outros lugares.

Entre os representes do filo Chytridiomycota, a espécie mais frequente foi *Rhyzophydium sphaerotheca* e a menos foi *Rhyzophydium stipitatum*.

No filo Oomycota, a espécie com maior ocorrência foi *Achlya prolifera* e a espécie com menor ocorrência foi *Aphanomyces helicoides*.

A diversidade de fungos zoospóricos nesse trabalho preliminar indicou a presença

de fungos zoospóricos, porém pode ser ainda elevada, em virtude de poucas coletas, justificando a continuidade dos levantamentos na região para ampliar os conhecimentos sobre a sistemática e ecologia dos mesmos.

5 | REFERÊNCIAS

- Alexopoulos, C. J.; Mims, C. W.; Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. 4th. Ed. New York: John Wiley, Sons, Inc. 869p.
- Bärlocher, F. 1992. *Research on aquatic hyphomycetes : historical background and overview*. In :Bärlocher, F. (ed.) *The ecology of aquatic Hyphomycetes*. Berlin : Springer-Verlag, p. 1-15.
- Barr, D.J.S. 1990. *Phylum Chytridiomycota*. In *Handbook of Protocista* (Margulis, L., Corliss, J.O., Melkonian, M. & Chapman, D.J., eds.). Boston: Jones and Bartlett Publishers. p. 454-466.
- Barr, D.J.S. 1992. *Evolution and kingdoms of organisms from the perspective of a mycologist*. **Mycologia** 84:111.
- Barr, D.J.S. 2001. *Chytridiomycota*. In *The Mycota - Systematics and Evolution* (McLaughlin, D.J., McLaughlin, E.G. & Lemke, P. A., eds.). v. 7, Part A, p. 11-93.
- Beneke, E. S.; R, L. 1962. *Aquatic Phycomycetes isolated in the State of Minas Gerais*. São Paulo and Paraná. **Rickia**. São Paulo, v. 1, p. 181-193.
- Cavalcante, M. S. 2000. *Fungos isolados da água e do solo das margens dos açudes da Prata e do Meio, na Reserva Florestal de Dois Irmãos, Recife-PE*. São Paulo (SP). Tese (doutorado). Instituto de Biociências-Universidade de São Paulo, São Paulo. 316p.
- Carnaval, A. C. O. Q., Toledo, L.F., L.F., Haddad, C.F.B & Britto, F. B. 2005. *Chytrid fungus infects high-altitude stream-dwelling Hylodes magalhaesi (Leptodactylidae) in the Brazilian Atlantic rainforest*. Froglog 70:3.
- Dix, N. J. & Webster, J. 1995. *Fungal Ecology*. Cambridge: Chapman & Hall.
- Dudka, I. A. 1974. *Fungi of freshwater biocenoses*. Mikologiya Fitopatologiya, v. 8, n.5, p. 444-449.
- Dudka, I.O.; Koval, E. Z. 1994. *Micromycetes of Kremenchuch reservoir*. Ukrayins'kyi Botanichnyi Zhumal, v.51, n. 4, p. 53-57.
- Ferreira, S. A. J.(2013) *Fungos zoospóricos identificados a partir de coletas em lagos existentes na ilha de Parintins, Amazonas*, Monografia-Universidade Federal do Amazonas 1-34p.
- Gessner, M.o & Chauvet, E. 1993. *Ergosterol-to-biomass conversion factory for aquatic Hyphomycetes*. Applied Environmental Microbiology, 59: 502-507p.
- Gomes, A.L. & Pires-Zottarelli, C.L.A. 2006. *Diversidade de Oomycota da Reserva Biológica de Paranapiacaba, Santo André, SP*: primeiras citações para o Brasil. **Revista Brasil. Bot.**, V.29, n.4, p. 569-577.
- Hawksworth, D.L. Kirk, P.M., Sutton, B.C. & Pegler, D.M. 1995. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 8th ed. International Mycological Institute, Egham.
- Jesus, A. L., Marano, A.V., Schoenlein-Crusius, I.H. & Pires-Zottarelli, C.L.A. 2013. *Diversidade de organismos zoospóricos heterotróficos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga*. **Hoehnea** 40: p. 167-180.

Jerônimo, G. H., Jesus, A.L., Manano, A.V., James, T.Y., Souza, J.I., Rocha, S.C.O., Pires-Zottarelli, C.L.A. 2015. *Diversidade de Blastocladiomycota Chytridiomycota do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia, SP, Brasil.* p. 135-163.

Johnson, J. S. 1956. *The Genus Achlya: morphology and taxonomy*. Ann. Arbor: University of Michigan Press. 180p.

Jooffily, I. M. 1947. *Alguns Ficomictos aquáticos e terrícolas do Brasil*. **Boletim da Sociedade de Agronomia**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 95-113.

Karling, J. S. 1944a. Brazilian Chytrids. I. *Species of Nowakowskella*. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v.71, n.4, p. 374-389.

Karling, J. S. 1944b. Brazilian Chytrids. II. *New species of Rhizidium*. **American Journal of Botany**, v. 31, p. 254-261.

Karling, J. S. 1944c. Brazilian Chytrids. III. *Nephrochytrium amazonensis*. **Mycologia**. New York, V. 36, p. 350-367.

Karling, J. S. 1944d. Brazilian Chytrids. IV. Species of *Rozella*. **Mycologia**, v. 36, p. 638-647 .

Karling, J. S. 1945a. Brazilian Chytrids. VI. *Rhophalophlyctis and Chytridiomyces, two new chitinophyllic operculate genera*. **American Journal of Botany**, v. 32, n.7, p. 362-369.

Karling, J. S. 1946a. Brazilian Chytrids. VIII. *Additional parasites of Rotifers and Nematodes*, **Lloydia**, v. 9, n. 1, p. 1-12.

Karling, J. S. 1947. Brazilian Chytrids. X. *New species with sunken opercula*. **Mycologia**, New York, v. 39, p. 56-70.

Karling, J. S. 1964. Indian chytrids. IV. *Nowakowskella multispora* sp. nov. and other polycentric species. **Sydowia** 17:314-319.

Kirk, P .M., Cannon, P.F., Minter, J.C. & Stalpers, J.A. 2008. Dictionary of the Fungi. 10th ed. Wallingford: CAB International.

Milanez, A. I; Beneke, E. S. 1968. *New records of aquatic Phycomyces from Michigan*. *Papers os the Michigan Academy of sciences Arts and Letters*. Ann.arbor. v. 53, p. 11-22.

Milanez, A. I. Fungi, In: hurlbert, S. H; Rodrigues, G.; Santos, N. D. 1980. *Aquatic biota of Tropical South America – Part 2*. San Diego: State University. 614p.

Milanez, A. I; Pires-Zottarelli C. L. A; Gomes A. L. 2007. *Brazilian Zoosporic Fungi*. São Paulo. 113p.

Moura, A. T. N. 1996. *Estrutura e Dinâmica da comunidade fitoplantonica numa lagoa eutrófica, São Paulo, Brasil, a curtos intervalos de tempo: Comparação entre épocas de chuva e seca*. Rio Claro: Instituto de Biociências da UNESP, (Dissertação-Mestrado em Biologia Vegetal). 172p.

Nascimento, C. D. A. 2007. *Diversidade de Chytridiomycota do parque estadual da Cantareira, estado de São Paulo, Brasil*. Dissertação (Mestrado) Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo. p. 1-59.

Nascimento, C. D. A. 2010. *Avaliação da diversidade de organismos zoospóricos da Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi Guaçu, Estado de São Paulo, Brasil*. Tese (Doutorado) Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo. p. 1-164.

Nascimento, C. A. & Pires-Zottarelli, C. L. 2012. Diversidade de fungos zoospóricos da Reserva Biológica de

Mogi Guaçu, Estado de São Paulo, Brasil. Rodriguésia 63(3): p. 587-611.

Paiva, I. A. F. (2013) *Diversidade de Fungos Zoospóricos Identificados a partir de coletas em bancos de macrófitas desenvolvidas em lagos existentes na ilha de Parintins, Amazonas*, PIBIC, 1- 28p.

Pereira, A. A.; Rocha, J. R. S. 2008. *Pythium* (pythiaceae): três novos registros para o Brasil. **Acta Botanica Malacitana**, 1-4, p. 3.

Pires-Zottarelli, C. L. A.; Gomes, A. L. 2007. *Contribuição para o conhecimento de Chytridiomycota da “Reserva Biológica da Paranapiacaba”, Santo André, SP, Brasil*. **Biota Neotropica**, v. 7, n. p.3.

Pires-Zottarelli, C. L. A.; Milanez, A. I. 1993. *Fungos zoospóricos da Represa do Lobo (“Broa”). Novas citações para o Brasil*. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 16, n.2, p. 205-220.

Pires-Zottarelli, C. L. A.; Rocha, M. 2007. *Novas citações de Chytridiomycota e Oomycota para o Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI)*. **Acta Botanica Brasilia**. São Paulo. v. 21, n. 1, p. 125-136.

Porto, M. B. B. 2015. *Diversidade de organismos zoospóricos em um fragmento florestal urbano de Manaus, AM, Brasil*. Monografia de conclusão de curso. 50p.

Rocha, J. R. S., Milanez, A. I. Pirez-Zottarelli, C. L. A. 2001. *O gênero Pythium (Oomycota) em área decerrado no parque Nacional de Sete Cidades, Piauí, Brasil*. **Hoehnea**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 209-230.

Rocha, J. R. S. 2002. *Fungos zoospóricos em área de cerrado no Parque Nacional de Sete Cidades, Piauí, Brasil*. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo.

Scot, W. W 1961. *A revision of the Genus Aphanomyces*. **Tecncial Bulletin virginia Agricultural Experiment Station**. Blacksburg, v. 15, p. 1-95.

Seymour, R. L. 1970. *The Genus Saprolegnia*. Pittsburgh: University of Pittsburgh. 124p.

Sparrow Jr, F. K. 1960. *Aquatic Phycomycets*. 2 ed. University of Michigan Press, Ann Arbor.

Silva, A. L. 2010. *Puraquequara uma Herança Ameaçada*. Conselho Municipal de Política Cultural. Manaus Cult. Manaus - Edições Muiraquitã, p. 15-70.

Silva, M. I. L. 2002. *Micobiota de água e de solo das margens de igarapés na área de mata do Campus da Universidade federal do Amazonas*. São Paulo, tese (doutorado) – Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica, 175p.

Silva, M. I. L. e Oliveira, A. T. 2012. Diversidade de fungos zoospóricos em corpos de água localizados no município de Barcelos, médio Rio Negro, Amazonas. Brasil. Cap.2, p. 19 - 29. Livro: *Biodiversidade Amazônica: caracterização, ecologia e conservação*. Ed. EDUA, Manaus, 2012. 370p.

Utumi, E. Y. K. 2010. *Identificação de fungos zoospóricos em igarapés localizados no Campus da Universidade federal do Amazonas*. Monografia de conclusão de curso.UFAM. 42p

CAPÍTULO 11

FATORES DE VIRULÊNCIA DE LEVEDURAS DO GÊNERO *CANDIDA* EM CAVIDADE BUCAL E PRÓTESES DENTÁRIAS DE IDOSOS DE UMA UNIDADE BÁSICA DE SAÚDE – TEFÉ – AM

Data de aceite: 01/06/2020

Data de submissão: 05/03/2020

Ellen Roberta Lima Bessa

Instituto Leônidas e Maria Deane - ILMD / Fiocruz
Amazônia
Manaus – AM

Instituto de Ciência e Tecnologia - ICT / UNESP -
Universidade Estadual Paulista
São José dos Campos – SP

<http://lattes.cnpq.br/0527204088870896>

Daniela Marinho da Silva

Instituto Leônidas e Maria Deane - ILMD/Fiocruz
Amazônia
Manaus – AM

<http://lattes.cnpq.br/4021121596441587>

Giselle Diniz Guimarães da Silva

Instituto Leônidas e Maria Deane - ILMD/Fiocruz
Amazônia
<http://lattes.cnpq.br/1326728302231138>

Fernando José Herkrath

Instituto Leônidas e Maria Deane - ILMD/Fiocruz
Amazônia
<http://lattes.cnpq.br/6520056577460946>

Ormezinda Celeste Cristo Fernandes

Instituto Leônidas e Maria Deane - ILMD/Fiocruz
Amazônia
<http://lattes.cnpq.br/6470486935659372>

RESUMO:Este estudo teve como objetivo avaliar os fatores de virulência como crescimento a 37°C, produção de urease e fosfolipase de leveduras do gênero *Candida* na mucosa palatal e na prótese dentária de idosos de uma Unidade Básica de Saúde em Tefé-AM. Os idosos avaliados apresentaram faixa etária de 65 a 74 anos, a coleta de dados foi realizada através de exames clínicos orais e coleta de material biológico da mucosa palatal e da prótese dentária, com *swab's* estéreis e foram semeadas em placas contendo meio seletivo *CHROMagar™ Candida*. No teste da urease, os isolados foram semeados em meio Agar Christensen, e na fosfolipase foi utilizado método em placa com gema de ovo descrito por Price, Wilkinson e Gentry. A produção foi classificada como: muito forte ($Pz \leq 0,69$), forte (Pz entre 0,70–0,79), média (Pz entre 0,80–0,89) ou fraca (Pz entre 0,90–0,99). Dos 67 pacientes avaliados, foram selecionadas 42 amostras. A análise de dados foi descritiva, por meio de frequências absolutas e relativas. Os resultados evidenciaram que das 18 amostras oriundas de Prótese dentária, (13) 72,2% foram de *Candida albicans* e (5) 27,7% *Candida spp.*, todas cresceram a 37°C e foram negativas para o teste da Urease, (3) 11,1% das amostras foram positivas para fosfolipase com produção

média, as quais, todas eram *C. albicans*. Das 24 amostras coletadas da boca, 50% das amostras eram *Candida albicans* e 50% *Candida spp.*, todas cresceram a 37°C, apenas (1) 4,16% produziu urease sendo *Candida spp.*; 20,8% (5) produziram fosfolipase, das quais (1) *C. albicans* classificada como forte, (2) *C. spp.* média, (1) *C. spp.* muito forte, (1) *C. spp.* fraca. Os resultados sugerem maior virulência de espécies que colonizam a boca e apesar de *Candida albicans* ser a mais comumente associada à doença, outras espécies merecem atenção pelo potencial de virulência observado.

PALAVRAS-CHAVE: candidíase oral; idosos; fatores de virulência.

YEAST VIRULENCE FACTORS OF THE GENDER *CANDIDA* IN ORAL CAVITY AND DENTAL PROSTHESES OF ELDERLY PEOPLE FROM A BASIC HEALTH UNIT – TEFÉ – AM

ABSTRACT: This study aimed to evaluate virulence factors such as growth at 37°C, production of urease and phospholipase from yeasts of the genus *Candida* on the palatal mucosa and dental prosthesis of the elderly in a Basic Health Unit in Tefé-AM. The elderly considered 65 to 74 years old as a data collection performed through oral exams and collection of biological material from the palatal mucosa and dental prosthesis, with sterile cotton swabs and seeded in plates used by the CHROMagar TM *Candida* medium. No urease tests, the selected ones were sown in the middle of Christensen Agar, and a phospholipase was used in the egg yolk plate method described by Price, Wilkinson and Gentry. The production was used as: very strong ($Pz \leq 0.69$), strong (Pz between 0.70–0.79), medium (Pz between 0.80–0.89) or weak (Pz between 0.90–0.99). Of the 67 selected patients, 42 items were selected. A data analysis was descriptive, using absolute and related frequencies. The results evidenced by the 18 oral samples of dental prosthesis, (13) 72.2% were from *Candida albicans* and (5) 27.7% from *Candida spp.*, All grew at 37°C and were negative for the Urease test, (3)) 11.1% of the samples were positive for phospholipase with medium production, like which, all were *C. albicans*. Of the 24 samples collected in the mouth, 50% were considered *Candida albicans* and 50% *Candida spp.*, All grew at 37°C, only (1) 4.16% produced urease and *Candida spp.*; 20.8% (5) produce phospholipase, of which (1) *C. albicans* use as a strong, (2) *C. spp.* medium, (1) *C. spp.* very strong, (1) *C. spp.* weak. The results suggest greater virulence of species that colonize the mouth and, despite *Candida albicans*, are the most common ones associated with the disease, other species deserve attention for the observed virulence potential.

KEYWORDS: oral candidiasis; elderly; virulence factors.

INTRODUÇÃO

A *Candida albicans* é a levedura que mais acomete a cavidade oral, podendo causar infecção. Porém diversos fatores podem estar associados ao aparecimento da candidíase

ou candidose, que podem estar relacionados com a higiene e saúde dos indivíduos, mas também com a patogenicidade destes microrganismos. (MARINHO et al., 2019). Aproximadamente 65% das espécies de *Candida spp.* são incapazes de crescer a uma temperatura de 37° C, isto impede que estes sejam patógenos bem-sucedidos ou menos comensais de humanos (ZOMORODIAN et al., 2016).

A habilidade de *Candida spp.* causar infecção oral depende, além dos fatores relacionados ao hospedeiro, tais como imunossupressão, alterações no microambiente oral e da expressão de diferentes fatores de virulência, que são estratégias específicas para se aderir, colonizar, causar infecção e superar as defesas imunológicas de hospedeiros susceptíveis. As principais contribuições para a patogenicidade deste fungo é sua capacidade de polimorfismo, a habilidade de formação de biofilme, produção de tubo germinativo, termotolerância, aderência às células epiteliais, produção de enzimas extracelulares e toxinas (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013; PEREIRA et al., 2016).

Nos idosos, além das condições imunológicas, o uso de dispositivos protéticos e condições de má higiene predispõem o ambiente bucal a infecções por fungos do gênero *Candida* (SATO et al., 2019). Frente a grande variedade de espécies desta levedura, torna-se imprescindível conhecer os fatores de virulências expressos por estas pois isto é fundamental para o tratamento bem-sucedido de pacientes com essas infecções.

OBJETIVO

Então esse estudo teve como objetivo avaliar os fatores de virulência no que tange ao crescimento a 37°C, produção de urease e fosfolipase de leveduras do gênero *Candida* na mucosa palatal e na prótese dentária de idosos de uma unidade básica de Tefé-AM.

METODOLOGIA

As amostras foram coletadas durante a realização de uma dissertação de mestrado denominado Condições de saúde bucal da população idosa em uma comunidade rural do Amazonas. Este atendeu a todas as peculiaridades éticas previstas pela resolução 466/2012, onde foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá - IDSM (protocolo nº 94742518.4.0000.8117).

Este foi realizados em idosos de faixa etária de 65 a 74 anos cadastrados em uma Unidade Básica de Saúde localizada em Tefé – AM, onde através de visitas domiciliares onde foram realizados exames clínicos orais e coleta de material biológico da mucosa palatal e da prótese dentária, e assim obtidos 42 isolados de *Candida* identificados pelo meio seletivo CHROMagar *Candida*® (BioMerieux, França), sendo através desse a possível identificação cromogênica das espécies de leveduras do gênero *Candida*.

A patogenicidade dos isolados foi avaliada pelo crescimento a 37°C e pela produção de urease e fosfolipase. No teste da urease, os isolados foram previamente reativados e semeados em meio Ágar Christensen (1946) – Ágar ureia, sendo incubados a 37°C e observados por durante sete dias. A presença de uma mudança na coloração do meio para vermelho-fucsina indicava produção de urease.

Para o teste da fosfolipase foi utilizado método em placa com gema de ovo descrito por Price, Wilkinson e Gentry (1982) modificado, sendo o inoculo

das leveduras realizado em triplicata e as placas incubadas a 37°C por sete dias. Os resultados foram avaliados pelo valor da zona de precipitação (Pz), caracterizada como a média dos diâmetros avaliados (colônia/halo+colônia). A produção foi classificada como: muito forte ($Pz \leq 0,69$), forte (Pz entre 0,70–0,79), média (Pz entre 0,80–0,89) ou fraca (Pz entre 0,90–0,99). A análise de dados foi descritiva, por meio de frequências absolutas e relativas.

RESULTADOS

Os 42 isolados de *Candida* observados, 18 deles eram oriundos das próteses dentárias, houve prevalência de 72,2% (13) da espécie albicans e 27,7% (5) eram *Candida spp.* Como fator de virulência, todas as amostras cresceram a 37°C, porém foram negativas para o teste da Urease. Enquanto que 11,1% (3) das amostras foram positivas para fosfolipase e apresentaram produção média, sendo todas *C. albicans*.

As 24 amostras coletadas da boca, 50% delas eram *Candida albicans* e 50% *Candida spp.* Contudo, todas apresentaram crescimento a 37°C e apenas 1 amostra de *Candida spp.* (4,16%) foi produtora de urease. Os 20,8% (5) dos isolados foram produtores de fosfolipase, sendo 4,16% (1) de *C. albicans* classificada como forte, enquanto que 4,16% (1) de *Candida spp.* apresentou produção muito forte de fosfolipase, assim como 8,3% (2) de *Candida spp.* foram classificadas como média e 4,16% (1) de *Candida spp.* como fraca.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados sugeriram maior virulência de espécies que colonizam a boca e apesar de *Candida albicans* ser a mais comumente associada à doença, outras espécies merecem atenção pelo potencial de virulência observado. Assim as espécies *Candida não-albicans* também demonstram superior patogenicidade, multirresistência aos antifúngicos e alto potencial de virulência (SINGH et al., 2018; BOAN; GARDAM, 2019; KO et al., 2019). Estudos como este a nível domiciliar são raros, pois a maioria aborda a candidíase a nível ambulatorial ou hospitalar e trabalham com amostras das mesmas. Este é importante para contribuição na tomada de decisão quanto às medidas terapêuticas e profiláticas no

controle desta infecção, para serem alvos de novas terapias contra esses patógenos em ascensão em regiões como a Amazônia Brasileira.

REFERÊNCIAS

- BOAN, P.; GARDAM, D. Epidemiology and antifungal susceptibility patterns of candidemia from a tertiary centre in Western Australia. **Journal of Chemotherapy**. 2019 May;31(3):137-140.
- CHRISTENSEN, W.B. Urea Decomposition as a Means of Differentiating *Proteus* and *Paracolon* Cultures from Each Other and from *Salmonella* and *Shigella* Types 1. **Journal of Bacteriology**. 52(4):461–6; 1946.
- KO, J. H.; JUNG, D. S.; LEE, J. Y.; KIM, H. A.; RYU, S. Y.; JUNG, S. I.; JOO, E. J.; CHEON, S.; KIM, Y. S.; KIM, S. W.; CHO, S. Y.; KANG, C. I.; CHUNG, D. R.; LEE, N. Y.; PECK, K. R. Changing epidemiology of non-albicans candidemia in Korea. **Journal of the Infection and Chemotherapy**. 2019; 25 (5): 388-391.
- PEREIRA, C. A.; DOMINGUES, N.; ARAÚJO, M. I. D. S. A.; JUNQUEIRA, J. C.; BACK-BRITO, G. N.; JORGE, A. O. C. Production of virulence factors in *Candida* strains isolated from patients with denture stomatitis and control individuals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 2016; 85(1): 66–72.
- PRICE, M. F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**. 20(1):7–14; 1982.
- SATO, T.; KISHI, M.; SUDA, M.; SAKATA, K.; SHIMODA, H.; MIURA, H.; OGAWA, A.; KOBAYASHI, S. Prevalence of *Candida albicans* and non-albicans on the tongue dorsa of elderly people living in a post-disaster area: a cross-sectional survey. **BMC Oral Health**. 2017; 17 (1): 51.
- SILVA, D. M. et al. Fatores de virulência de espécies de *Candida* provenientes da mucosa oral e das próteses dos idosos de uma comunidade ribeirinha no Amazonas – Brasil. **Revista de odontologia da UNESP** [online]. 2019; (48): e20190094.
- SINGH, R.; KUMARI, A.; KAUR, K.; SETHI, P.; CHAKRABARTI, A. Relevance of antifungal penetration in biofilm-associated resistance of *Candida albicans* and non-albicans *Candida* species. **Journal of Medical Microbiology**. 2018; 67 (7): 922-926.
- SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. Candida infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **BioMed Research International**. 2013; 1–13.
- ZOMORDIAN, K.; KAVOOSI, F; PISHDAD, G. R.; MEHRIAR, P.; EBRAHIMI, H.; BANDEGANI, A.; PAKSHIR, K. Prevalence of oral *Candida* colonization in patients with diabetes mellitus. **Journal de Mycologie Medicale**. 2016;26(2):103-110.

CAPÍTULO 12

ISOLAMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS E PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO DO MICRO- ORGANISMO ISOLADO *Aspergillus* sp. MB 2.7 PARA PRODUÇÃO DE LIPASES

Data de aceite: 01/06/2020

Mábilli Mitalli Correia de Oliveira

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri campus JK, Instituto de Ciência e Tecnologia, Diamantina-MG.

Adeline Cristina Pereira Rocha

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri campus JK, Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, Diamantina-MG.

Barbhara Mota Marinho

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri campus Janaúba, Instituto de Engenharia, Ciência e Tecnologia, Janaúba-MG.

Vivian Machado Benassi

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri campus JK, Instituto de Ciência e Tecnologia, Diamantina-MG.

um micro-organismo bom produtor de lipases, a fim de padronizar o cultivo do fungo para maior produção enzimática. Analisou-se distintos meios de cultura fonte de nitrogênio e solução de sais do meio, sendo a atividade enzimática determinada por titulação. Isolaram-se dezessete fungos filamentosos, dentre os quais selecionou-se a linhagem MB 2.7 como promissora lipolítica, selecionando-se o meio de cultivo SR, o extrato de levedura como fonte de nitrogênio e sem solução de sais para a produção da enzima, a 30 °C, durante sete dias de cultivo de forma estacionária.

PALAVRAS CHAVE: Enzimas, Biotecnologia, Bioprospecção.

ISOLATION OF FILAMENTOUS FUNGI AND STANDARDIZATION OF THE ISOLATED MICROORGANISM CULTIVATION *Aspergillus* sp. MB 2.7 FOR LIPASE PRODUCTION

ABSTRACT: Among the enzymes of economic and biotechnological interest, highlighted as lipases due to their application in the industry, such as in the food, agrochemical, leather production, oleochemical, pharmaceutical industry, among others. Thus, this objective

RESUMO: Dentre as enzimas de interesse econômico e biotecnológico, destacam-se as lipases devido sua versátil aplicabilidade na indústria, como no setor alimentício, agroquímica, produção de couro, indústria oleoquímica, farmacêutica, entre outros. Dessa forma, esse trabalho objetivou isolar fungos filamentosos de distintas amostras, água e areia do mar em Regência, bem como água e lama do Rio Doce localizado em Linhares, estado do Espírito Santo, bem como selecionar

work isolates fungi from different clothes, water and sea sand in Regência, as well as water and mud from the Rio Doce located in Linhares, state of Espírito Santo, as well as selecting a good lipase-producing microorganism, in order to standardize or grow fungi for greater enzymatic production. Analyze whether the culture media from the nitrogen source and a solution of the medium are being a specific enzyme activity for titration. Isolate ten types of filamentous fungi, among which one selects an MB 2.7 line as a promising lipolytic, calculated or SR culture medium, or extracts as a nitrogen source and without salt solution for enzyme production, at 30 ° C, for seven days cultivation in a stationary way.

KEYWORDS: Enzymes, Biotechnology, Bioprospection.

1 | INTRODUÇÃO

As enzimas estão presentes em micro-organismos, animais e vegetais, e possuem grande potencial catalítico devido as suas excelentes propriedades funcionais, tais como atividade, seletividade e especificidade. Desta forma, as enzimas têm sido utilizadas em várias áreas industriais como fonte ideal e promissora para tornar os processos tecnológicos mais eficientes, com altos rendimentos e sem danos ao meio ambiente (BENASSI et. al, 2012; MUSSATTO et al., 2007)

A produção de enzimas é uma área da Biotecnologia em crescente expansão, sendo a lipase uma das principais enzimas estudadas pela comunidade científica, principalmente devido às suas versáteis aplicações. As lipases classificam-se como E.C. 3.1.1.3, sendo hidrolases, ou seja, enzimas catalizadoras do processo de hidrólise das ligações ésteres presentes em moléculas de triacilgliceróis, na qual liberam ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (BARATTO et al., 2011).

As lipases são, portanto, importantes enzimas industriais e tem sido largamente utilizadas no processamento de óleos e gorduras, como componentes de detergentes, na síntese de fármacos e cosméticos, síntese de biopolímeros, na indústria alimentícia, agroquímicos e têxtil (RIOS et al., 2018). Além disso, as lipases tem uma aplicação importante no campo da bioenergia, especialmente na produção de biodiesel que é um setor em expansão (CANET et al., 2016; MOAZENI et al., 2019).

Devido a grande demanda industrial por novas fontes de lipases com diferentes características bioquímicas, tem-se estimulado a procura de novas cepas de micro-organismos potenciais lipolíticos, pois as principais fontes de obtenção de lipases para aplicação industrial têm sido principalmente os fungos, dentre eles, os filamentosos são classificados como as melhores fontes microbianas produtoras dessas enzimas, sendo as espécies pertencentes aos gêneros *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizomucor*, as que apresentam maior potencial de produção (CARDENAS et al., 2001; TROIANO et al., 2020).

Nessa perspectiva, o presente trabalho teve como objetivo isolar diferentes fungos

filamentosos de amostras do Rio Doce e do mar coletadas em Regência, município de Linhares, estado do Espírito Santo, bem como, selecionar um micro-organismo promissor lipolítico, padronizando seu cultivo em busca de maximizar a atividade enzimática.

2 | MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Biologia do Instituto de Engenharia, Ciência e Tecnologia (IECT), da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) *campus* Janaúba, Minas Gerais, Brasil. Os micro-organismos foram cadastrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), número A64AD93.

2.1 Coleta das amostras e isolamento dos fungos filamentosos

As amostras do Rio Doce e do mar utilizadas para o isolamento dos fungos filamentosos foram coletadas, de forma assépticas, em Regência, distrito de Linhares – Espírito Santo (ES), sendo divididas em amostra 1 (água do mar), amostra 2 (areia do mar), amostra 3 (água do Rio Doce) e amostra 4 (lama do Rio Doce).

Preparou-se o meio de cultura Sabouraud ISOFAR® vertendo-o em placas de Petri suplementado com 0,025 g de Estreptomicina Inlab® para cada 40 mL de meio. Conforme os meios se solidificaram, as amostras foram postas sob o meio de cultura sólido, e incubadas em estufa bacteriológica, à 30 °C, e o crescimento de fungos filamentosos foi observado a cada 24 horas, durante sete dias. Os fungos filamentosos que surgiram foram isolados em novas placas de Petri, contendo o meio de cultura Sabouraud. Durante o isolamento, observaram-se as características macroscópicas quanto à coloração, fundo, pigmentação, textura, superfície, borda e topografia. Após a observação dessas características a identificação dos fungos foi realizada atribuindo-se números sequenciais para a separação dos mesmos.

2.2 Manutenção das cepas em laboratório

As cepas foram mantidas em meio sólido de aveia Quaker® de acordo com Emerson (1941), assim como foram conservadas em sílica gel Dinâmica® segundo a metodologia descrita por Michelin (2009).

2.3 Microcultivo

A possível identificação dos fungos isolados foi determinada através do microcultivo empregando a técnica descrita por Ridel (LACAZ, 1991). As câmaras de microcultivo constituíram-se por uma placa de Petri com um papel filtro Unifil® e uma lâmina, sendo introduzida uma porção de meio Sabouraud 2 %, sobre a lâmina da câmara de microcultivo. O micro-organismo foi inoculado sobre o meio e este recoberto com a lamínula. A câmara

foi colocada em estufa bacteriológica, à 30 °C, durante três dias. Após o crescimento dos fungos, esses foram observados em microscópio óptico com aumento de 100 vezes.

2.4 Seleção dos micro-organismos bons produtores de lipases em meio de cultura sólido

A seleção dos fungos filamentosos produtores de lipases seguiu a metodologia descrita por Sierra (1957). Todos os fungos foram repicados pontualmente, ao centro da placa de Petri, contendo o meio teste e incubados em estufa bacteriológica, à 30 °C, por quatro dias. Em seguida, mediu-se o raio de crescimento da colônia (cm), sendo calculada a taxa de crescimento em centímetros.hora⁻¹; e o halo enzimático (cm) para os fungos que apresentaram algum crescimento e atividade lipolítica, respectivamente.

2.5 Seleção do micro-organismo produtor de lipases em meio de cultura submerso

Os fungos foram repicados em tubos de ensaio contendo meio Sabouraud 2 %, sendo a suspensão de esporos obtida pela inserção de 5 mL de água destilada estéril, retirando-se 1 mL da solução e inserindo-a em 25 mL de meio de cultura submerso para lipase (MSL) (MARINHO, 2011), contidos em Erlenmeyers de 125 mL. Os meios foram armazenados por sete dias em estufa bacteriológica, à 30 °C.

2.6 Obtenção do extrato bruto extracelular e o micélio do fungo

Após o crescimento dos fungos, separou-se o micélio do extrato bruto enzimático por filtração à vácuo. Após a secagem, o micélio foi pesado em balança analítica e os extratos brutos foram submetidos à medição de volume (mL), pH final e determinação da atividade lipolítica.

2.7 Determinação da atividade lipolítica

A reação conteve 1 mL de solução tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 7,0; 1 mL do extrato bruto enzimático; e 2 mL do substrato da reação (azeite de oliva Cacinero®). Inicialmente, o tampão fosfato de potássio e o substrato foram mantidos à 37 °C, durante 5 minutos, em seguida, inseriu-se o extrato bruto enzimático, sendo retiradas amostras de 1 mL da mistura nos tempos de 0 e 15 minutos. Posteriormente, vertidas em 1 mL de solução de acetona:etanol (1:1) para interromper a reação. Realizou-se a titulação utilizando o NaOH 0,1 M e solução de fenolftaleína 2 %. A atividade enzimática foi calculada de acordo com a equação 1.

$$A = \frac{\Delta V_{NaOH} \times N \times 1000}{T' \times V} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde,

A = Atividade enzimática (U.mL^{-1});

ΔV_{NaOH} = Diferença do volume de NaOH (mL) utilizado na titulação no tempo de 15 minutos em relação ao volume do tempo zero;

N = Normalidade da solução de NaOH;

1000 = Fator de conversão de mEq-g para $\mu\text{Eq-g}$;

T' = Tempo de reação (min);

V = Volume da amostra após separação do micélio.

2.8 Análise de diferentes meios de cultura para produção de lipases pelo fungo isolado MB 2.7

Realizou-se o inóculo de 1 mL da suspensão de esporos do fungo selecionado em 25 mL dos meios de cultivo submerso, sendo os meios CP (PEIXOTO et al., 2003), Czapek (WISEMAM, 1975), LTS (SILVA, 2018), SR (RIZZATI et al., 2001), e meio submerso para lipase (MSL) (MARINHO, 2011), contidos em Erlenmeyer de 125 mL. Após esse procedimento, as culturas foram incubadas em estufa bacteriológica, à 30 °C, durante sete dias.

2.9 Análise do efeito da fonte de nitrogênio no crescimento do micro-organismo e na produção de lipases

O fugo MB 2.7 foi cultivado em meio SR variando-se a fonte de nitrogênio na concentração de $0,45 \cdot 10^{-2} \text{ g.mL}^{-1}$, sendo essas o extrato de levedura, peptona, extrato de levedura acrescido de peptona (1:1), acetato de amônio e cloreto de amônio. As cepas foram mantidas à 30 °C, durante sete dias.

2.10 Análise do efeito da solução de sais do meio de cultura na produção de lipase

O fungo selecionado foi cultivado no meio SR contendo extrato de levedura como fonte de nitrogênio, variando-se a fonte de sais do cultivo, sendo essas: solução de sais SR, sais Wesson, solução de sais SR acrescido de sais Wesson (1:1) e sem adição de sais, sendo mantidos em estufa bacteriológica, à 30 °C, por sete dias.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento de fungos filamentosos a partir de distintas amostras e análise das características morfológicas macroscópicas dos isolados

A partir das amostras coletadas isolaram-se dezessete fungos filamentosos, da água do mar (amostra 1) isolou-se o micro-organismo MB 1.4; da areia do mar (amostra 2) isolaram-se os organismos MB 2.11 e MB 2.12; assim como a partir da água do Rio Doce (amostra 3) isolaram-se os fungos MB 2.1, MB 2.4, MB 2.5, MB 2.6, MB 2.9, MB 2.13A, MB 2.13B e MB 2.14; e a partir da lama do Rio Doce (amostra 4) isolaram-se os

micro-organismo identificados como MB 1.1, MB 1.2, MB 1.3, MB 2.2, MB 2.7 e MB 2.8.

Após o processo de isolamento, observou-se que a maior variabilidade de fungos filamentosos foram provenientes da água e lama do Rio Doce, amostras 3 e 4, respectivamente. Enquanto que o baixo aparecimento de fungos na água do mar pode estar correlacionado à quantidade de sal presente na água, tendo por consequência a desidratação dos micro-organismos, afetando o seu desenvolvimento.

Esses resultados são semelhantes aos estudos de Guimarães e colaboradores (2006), que isolaram quarenta fungos filamentosos de várias regiões do Estado de São Paulo, entre os isolados vinte e três apresentaram potencial enzimático. Luz e colaboradores (2016) analisaram amostras coletadas da região de Minas Gerais e obtiveram trinta e seis diferentes micro-organismos em dez amostras coletadas, sendo que 53 % dos isolados mostraram atividade amilolítica. Vale citar que Benassi e Almeida (2019) coletaram oito amostras em locais distintos, também na região de Minas Gerais, e obtiveram-se quarenta e oito fungos filamentosos de diferentes aspectos morfológicos, sendo analisado o potencial amilolítico de dez desses isolados.

Em relação às características morfológicas macroscópicas pode-se inferir que maioria apresentou coloração branca (MB 1.2, MB 1.3, MB 1.4, MB 2.7, MB 2.9, MB 2.11 e MB 2.13A), branca com esporos marrons (MB2.4), branca com esporos amarelos (MB 2.12), os demais apresentaram as seguintes cores: cinza (MB 1.1), amarelo (MB 2.2 e MB 2.13B), alaranjado (MB 2.8), marrom com bordas claras (MB 2.1 e MB 2.6), bege (MB 2.5) e rosé (MB 2.14). Os fungos MB 1.1, MB 2.11 e MB 2.14 foram os únicos que produziram pigmentação, sendo observado pigmento de cor preta, verde e amarelo, respectivamente. A respeito da textura foi possível observar que os fungos filamentosos apresentaram textura algodonosa (MB 1.1, MB 1.2, MB 1.3, MB 1.4, MB 2.8, MB 2.11, MB 2.13A), aveludada (MB 2.1, MB 2.2, MB 2.4, MB 2.6, MB 2.7, MB 2.9 e MB 2.13B), pulverulenta (MB 2.5 e MB 2.12) e camurça (MB 2.14).

A maioria dos isolados apresentaram fundo liso (MB 1.1, MB 1.2, MB 1.4, MB 2.2, MB 2.5, MB 2.7, MB 2.8, MB 2.11, MB 2.12, MB 2.13A e MB 2.14), dos demais fungos, cinco rugosos (MB 1.3, MB 2.1, MB 2.6, MB 2.9, MB 2.13B) e apenas um pregueado (MB 2.13B). Sobre a superfície observou-se doze fungos de característica lisa (MB 1.1, MB 1.2, MB 1.4, MB 2.2, MB 2.5, MB 2.7, MB 2.8, MB 2,9, MB 2.11, MB 2.12, MB 2.13A e MB 2.14), três fissurada (MB 2.1, MB 2.4 e MB 2.6), um rugosa/fissurada (MB 1.3) e um pregueada (MB 2.13B). Visualizou-se, ainda, os fungos com relação as bordas, sendo que oito foram circular (MB 1.1, MB 1.2, MB 2.1, MB 2.2, MB 2.5, MB 2.6, MB 2.12, MB 2.13B), sete irregulares (MB 1.3, MB 1.4, MB 2.4, MB 2,7, MB 2.8, MB 2.9 e MB 2.11) e dois regulares (MB 2.13A e MB 2.14). Por fim, sobre a análise de topografia observou-se doze fungos de forma plana (MB 1.1, MB 1.2, MB 1.4, MB 2.2, MB 2.5, MB 2.7, MB 2.8, MB 2.9, MB 2.11, MB 2.12, MB 2.13A e MB 2.13B), três pregueada (MB 2.1, MB 2.4 e MB 2.6), um fungo de topografia convexa (MB 2.14) e um plana/pregueada (MB 1.3).

3.2 Análise das características microscópicas dos Fungos Filamentosos Isolados

Pode-se observar que os fungos identificados como MB 1.2, MB 2.1, MB 2.4, MB 2.6, MB 2.7, MB 2.9, MB 2.13A e MB 2.13B possivelmente pertencem ao gênero *Aspergillus*, assim como os fungos MB 2.2 e MB 2.8, pertencem ao gênero *Mucor* e os fungos MB 2.5 e MB 2.14 possivelmente pertencem ao gênero *Paecilomyces*. Em relação ao fungo MB 1.3, o mesmo apresentou, possivelmente, o gênero *Rhyzopus*. Os demais não foram identificados (Figura 1).

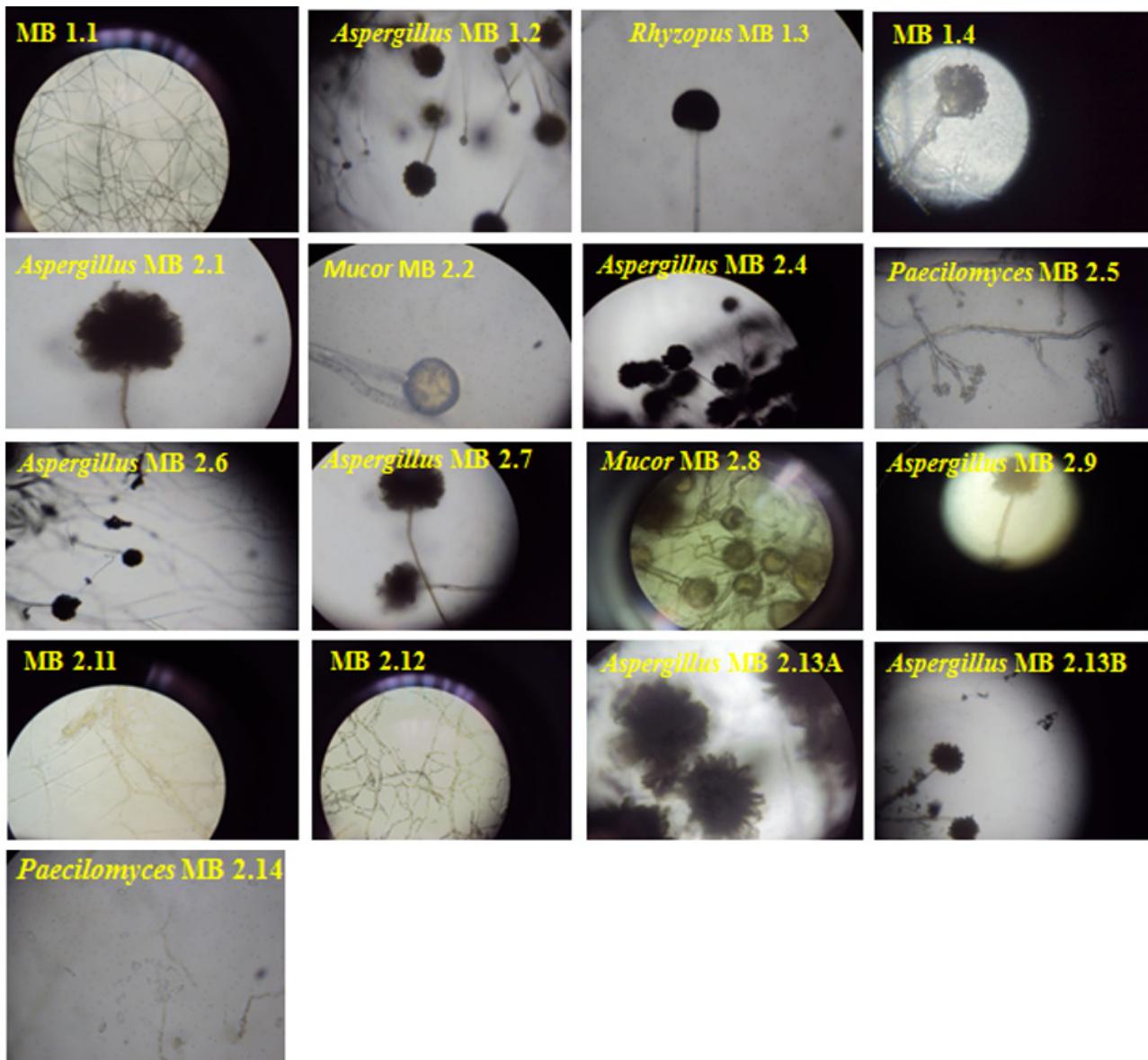


Figura 1 - Imagem microscópica dos fungos filamentosos isolados a partir de amostras coletadas em Regência-Linhares/ES.

3.3 Screening dos fungos filamentosos produtores de lipases em meio sólido

A linhagem identificada como MB 1.1 foi a única que não apresentou crescimento micelial, enquanto que os fungos *Aspergillus* sp. MB 1.2, *Rhizopus* sp. MB 1.3, MB 1.4,

Mucor sp. MB 2.2, *Aspergillus* sp. MB 2.4, *Paecilomyces* sp. MB 2.5, *Mucor* sp. MB 2.8, *Aspergillus* sp. MB 2.9, MB 2.11, MB 2.12 e *Aspergillus* sp. MB 2.13A apresentaram crescimento de 0,0125 cm.h⁻¹, 0,0469 cm.h⁻¹, 0,0365 cm.h⁻¹, 0,0416 cm.h⁻¹, 0,0135 cm.h⁻¹, 0,0104 cm.h⁻¹, 0,0229 cm.h⁻¹, 0,0198 cm.h⁻¹, 0,0135 cm.h⁻¹, 0,0313 cm.h⁻¹ e 0,0156 cm.h⁻¹, respectivamente; mesmo não apresentando halo enzimático.

Enquanto que, os fungos filamentosos isolados promissores para a produção de lipase foram os *Aspergillus* sp. MB 2.1, *Aspergillus* sp. MB 2.6, *Aspergillus* sp. MB 2.7, *Aspergillus* sp. MB 2.13B e *Paecilomyces* sp. MB 2.14. Pode-se afirmar que dentre esses micro-organismos, a linhagem MB 2.7 foi a que apresentou maior taxa de crescimento, sendo de 0,0396 cm.h⁻¹ com um halo enzimático de 1,0 cm, enquanto a linhagem que apresentou o maior halo de atividade lipolítica foi o MB 2.13B, com 1,5 cm e 0,0187 cm.h⁻¹ como taxa de crescimento.

Pode-se inferir que, nem todos os fungos que possuem alta taxa de crescimento são capazes de produzir a enzima lipase, as linhagens *Mucor* sp. MB 1.3 e *Rhyzopus* sp. MB 2.2 são exemplos desse caso. Vale citar, também, que o *Aspergillus* sp. MB 2.6 obteve resultados satisfatórios quanto ao halo da produção enzimática 1,0 cm, enquanto a sua taxa de crescimento foi a menor (0,0083 cm.h⁻¹) em relação aos outros fungos.

3.4 Análise da produção de lipase em meio submerso

A partir da realização da triagem inicial em meio sólido, cinco linhagens de fungos filamentosos foram selecionados, sendo esses identificados como *Aspergillus* sp. MB 2.1, *Aspergillus* sp. MB 2.6, *Aspergillus* sp. MB 2.7, *Aspergillus* sp. MB 2.13B e *Paecilomyces* sp. MB 2.14. Observou-se que o *Aspergillus* sp. MB 2.7 produziu maior massa micelial, apresentando aproximadamente 3,8 %, 12 %, 3,3 % e 19,6 % a mais que as linhagens *Aspergillus* sp. MB 2.1, *Aspergillus* sp. MB 2.6, *Aspergillus* sp. MB 2.13B e *Paecelomyces* sp. MB 2.14, respectivamente (Tabela 1). Ao analisar o pH final do extrato enzimático foi possível observar que todas a linhagens obtiveram pH ácido, apresentando uma variação de 3,5 a 5,5.

A linhagem que obteve o pH mais ácido foi o *Aspergillus* sp. MB 2.13B com pH 3,53 e menor atividade lipolítica de 3,57 U totais, enquanto que o *Aspergillus* sp. MB 2.7 obteve a mais expressiva atividade enzimática, 12,93 U totais, apresentou o pH menos ácido, pH 5,48, seguido do *Aspergillus* sp. MB 2.1 com 6,39 U totais, equivalendo a, aproximadamente, 50 % e 72 % menos atividade que a linhagem de maior atividade lipolítica, respectivamente. Vale citar que, as demais linhagens apresentaram atividade zero, apesar de apresentarem crescimento (Tabela 1). Após a análise dos resultados, o fungo filamentoso estabilizado para estudo foi o MB 2.7.

Fungo	Massa micelial (g)	pH final do extrato enzimático	Atividade (U totais)
MB 2.7	0,258	5,48	12,93
MB 2.1	0,248	5,08	6,39
MB 2.13B	0,249	3,53	3,57
MB 2.6	0,227	5,22	0
MB 2.14	0,207	4,36	0

Tabela 1 – Análise da atividade de lipases produzida pelos fungos filamentosos isolados em meio de cultura submerso.

3.5 Determinação do meio de cultura para crescimento do fungo *Aspergillus* sp. MB 2.7 e produção lipolítica

O meio considerado propício para as condições estabelecidas foi o meio SR com 15,57 U totais, seguido pelo MSL com 13,04 U totais, Czapek com 2,21 U totais, CP com 0,51 U totais e meio LTS, o qual não apresentou atividade enzimática.

As atividades metabólicas desenvolvidas pelos micro-organismos estão atreladas às formas com que esses são submetidos. Este é um critério que está diretamente ligado ao produto de interesse. Portanto, é destacada a importância de escolher e analisar os nutrientes adequados para o cultivo de uma linhagem, utilizando-se fontes propícias que favoreçam o bom desempenho do micro-organismo e retirar aquelas que o inibem. A composição do meio de cultivo é um fator de grande importância na produção de lipases. Os meios de cultura são suplementados com a utilização de compostos quimicamente conhecidos ou matérias-primas naturais (COELHO et al., 2008).

Diante do observado nesse trabalho, os resultados corroboram com os constatado por Facchini e seus colaboradores (2016), cujo meio de cultura selecionado para produção de lipases pelo fungo *Fusarium oxysporum* foi o meio submerso SR, a 30 ° C, após três dias de cultivo a 100 rpm.

3.6 Determinação da fonte de nitrogênio do meio de cultura para produção de lipase

Analizando-se a massa micelial, pode-se dizer que o meio SR contendo apenas extrato de levedura apresentou biomassa inferior (0,488 g) quando comparada ao meio controle SR (0,523 g), entretanto foi observado uma maior atividade lipolítica, sendo essa de 14 % superior ao meio SR (Tabela 2).

Pode-se observar que as fontes de nitrogênio alteraram significativamente o pH da solução, sendo 6,26 para o extrato de levedura, ou seja, quando comparado ao meio controle, 5,44, este obteve um aumento de 13 % na alcalinidade (Tabela 2).

Os resultados demonstraram que o *Aspergillus* sp. MB 2.7 obteve melhor atividade enzimática no meio SR na presença de extrato de levedura, sendo a fonte de nitrogênio

mais favorável com 15,10 U totais, seguido pelo meio controle SR com 12,96 U totais, cloreto de amônio com 8,06 U totais e peptona com 5,81 U totais (Tabela 2).

Fonte	Massa micelial (g)	pH final do Extrato Enzimático	Atividade (U totais)
SR	0,523	5,44	12,96
Extrato Levedura	0,488	6,26	15,10
Cloreto de amônio	0,169	4,47	8,06
Peptona	0,154	7,02	5,81
Extrato Levedura + Peptona	0,410	7,22	4,80
Acetato de amônio	0,197	7,06	4,30

Tabela 2 - Análise de diferentes fontes de nitrogênio do meio submerso SR para a produção lipolítica pelo fungo *Aspergillus* sp. MB 2.7.

O nitrogênio é um importante composto encontrado na natureza nas formas orgânica e inorgânica. Constitui-se de proteínas, ácidos nucléicos e outros compostos celulares, tornando-o um elemento de grande importância na produção enzimática. As fontes de nitrogênio possuem uma elevada importância na síntese das enzimas (TAN et al., 2003).

3.7 Determinação da solução de sais do meio de cultura submerso para produção de lipases

Observou-se que a produção enzimática na ausência de sais do meio submerso SR foi significativa na atividade lipolítica obtendo 20,20 U totais, sendo essa 23 % maior quando comparada ao meio contendo a solução do próprio meio SR (Tabela 3).

Esses resultados são de especial valia uma vez que a não inserção de sais no meio de cultura diminui custo na produção enzimática, além de ser observado um aumento significativo na atividade da enzima. Dessa forma a lipase produzida pelo fungo *Aspergillus* sp. MB 2.7 em meio submerso SR contendo extrato de levedura como fonte de nitrogênio sem soluções de sais, durante sete dias, à 30 °C mostrou-se ser promissora na aplicação biotecnológica.

Sais	Massa micelial (g)	pH final extrato enzimático	Atividade (U total)
SR	0,147	7,00	15,53
SR + Wesson	0,211	6,23	8,57
Wesson	0,127	6,82	11,90
Sem sais	0,197	6,71	20,20

Tabela 3 - Análise da influência de diferentes soluções de sais para a produção lipolítica pelo fungo *Aspergillus* sp. MB 2.7.

4 | CONCLUSÃO

Esse trabalho demonstrou a importância da prospecção de fungos filamentosos a partir de distintos ambientes e a padronização das condições químicas para seu crescimento e produção de lipase.

No presente trabalho, foram coletadas quatro diferentes amostras do município de Linhares-ES, sendo isolados dezessete fungos filamentosos, sendo esses possivelmente pertencentes ao gênero *Aspergillus*, *Mucor*, *Paecilomyces* e *Rhyzopus*, sendo os demais fungos não identificados. A partir do fungos isolados, selecionou-se o *Aspergillus* sp. MB 2.7, como potencial lipolítico sem adição de sais e contendo extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Dessa forma, pode-se dizer que o trabalho foi desenvolvido com êxito, dentro das características estabelecidas, e apresentou potencial biotecnológico uma vez que o fungo *Aspergillus* sp. MB 2.7 tem capacidade de produzir a enzima de interesse com atividade significativa para possíveis aplicações industriais.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM).

REFERÊNCIAS

- BARATTO, C. M.; SALAMONI, S.; COSTA, R.; OLIVEIRA, C. B.; LOCATELLI, G. O. Seleção de MICRO-ORGANISMOS produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. *Evidência*, Joaçaba v. 11 n. 2, p. 15-28, 2011.
- BENASSI, Vivian Machado; ALMEIDA, Aline. Prospecção de fungos filamentosos termotolerantes e termofílicos de distintos materiais coletados no estado de Minas Gerais e análise de potenciais produtores de amilases. *Unimontes Científica*, v. 20, n. 1, p. 150-169, 2019.
- BENASSI, V.M.; LUCAS, R.C.; MICHELIN, M.; JORGE, J.A.; TERENZI, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. Production and action of an *Aspergillus phoenicis* enzymatic pool using different carbon sources. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 15(3), p 253-260, 2012.
- CANET, A., BONET-RAGEL, K., BENAIGES, M. D., & VALERO, F. Lipase-catalysed transesterification: Viewpoint of the mechanism and influence of free fatty acids. *Biomass and Bioenergy*, v. 85, p. 94-99, 2016.
- CARDENAS, F., ALVAREZ, E., DE CASTRO-ALVAREZ, M. S., SANCHEZ-MONTERO, J. M., VALMASEDA, M., ELSON, S. W., & SINISTERRA, J. V. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 14, n. 4-6, p. 111-123, 2001.
- COELHO, M. A. Z; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. Tecnologia enzimática. 1^a edição. 2008.
- EMERSON, Ralph. An experimental study on the life cycles and taxonomy of Allomycetes. *Lloydia*, v. 4, p. 77-144, 1941.
- FACCHINI, F. D. A., VICI, A. C., PEREIRA, M. G., DE OLIVEIRA, M. F., BATISTA, A. C. F., VIEIRA, A. T., ... & POLIZELI, M. L. T. M. A useful methodology to select lipase-catalyzed transesterification aiming biodiesel application. *Revista Brasileira de Engenharia de Biossistemas*, v. 10, n. 1, p. 01-13, 2016.

GUIMARÃES, LHS, PEIXOTO-NOGUEIRA, SC, MICHELIN, M., RIZZATTI, ACS, SANDRIM, VC, ZANOELO, FF, ... & POLIZELI, MDL. Triagem de fungos filamentosos para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Revista Brasileira de Microbiologia**, v. 37, n. 4, p. 474-480, 2006.

LACAZ, C. D. S., PORTO, E., & MARTINS, J. E. C. Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 4, p. 332-332, 1991.

LUZ, B. D. da S. BICAS, J. L.; SARROUH, B.; LOFRANO, R. C. Z.. Bioprospecção de microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial realizada no Parque Estadual Serra do Ouro Branco, Brasil. **Interbio**, v.10 n.1, Jan-Jun, 2016.

MOAZENI, Faegheh; CHEN, Yen-Chih; ZHANG, Gaosen. Enzymatic transesterification for biodiesel production from used cooking oil, a review. **Journal of cleaner production**, 216: 117-128, 2019.

MARINHO, B. M. **Produção de lipase por novas linhagens de fungos filamentosos**. [Trabalho de conclusão de curso]. Diamantina. Curso de farmácia. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2011.

MICHELIN, M. **Potencial dos fungos Aspergillus terricola e Aspergillus ochraceus no desenvolvimento de bioprocessos e propriedades das enzimas xilanolíticas**. [Tese Doutorado em Ciências]. Ribeirão Preto. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP, p.212, 2009.

MUSSATTO, Solange I.; FERNANDES, Marcela; MILAGRES, Adriane MF. Enzimas-Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, 41: 28-33, 2007.

PEIXOTO, S. C., JORGE, J. A., TERENZI, H. F., & MARIA DE LOURDES, T. M. Rhizopus microsporus var. rhizopodiformis: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. **International Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 269-273, 2003.

RIOS, N. S., PINHEIRO, B. B., PINHEIRO, M. P., BEZERRA, R. M., DOS SANTOS. Biotechnological potential of lipases from Pseudomonas: Sources, properties and applications. **Process Biochemistry**, v. 75, p. 99-120, 2018.

RIZZATTI, A.C.S.; JORGE, J.A.; TERENZI, H.F.; RECHIA, C.G.V.; POLIZELI, M.L.T.M. Purification and properties of a thermostable extracellular α -D-xylosidase produced by thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 26:156-160, 2001.

SIERRA, Gonzalo. 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, 1957.

SILVA, L. T. A. **Produção e caracterização bioquímica de amilases produzidas por Penicillium sp. L1 isolado em Janaúba – MG**. [Trabalho de conclusão de curso], 2018. Instituto de Engenharia, Ciência e Tecnologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2018.

TAN, T., ZHANG, M., WANG, B., YING, C., & DENG. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 459-465, 2003.

TROIANO, D., ORSAT, V., & DUMONT, M. J. Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 117, p. 109472, 2020.

WISEMAN, Alan. **Handbook of enzyme biotechnology**. Ellis Horwood Ltd John Wiley & Sons, p.148, 1975.

OCORRÊNCIA DE FUNGOS ASSOCIADOS AO TRATO DIGESTIVO DE ABELHAS SEM FERRÃO *Melipona seminigra* MERRILLAE COCKERELL, 1919

Data de aceite: 01/06/2020

João Raimundo Silva De Souza

Universidade do Estadual do Amazonas, Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, PPG-BIONORTE, Manaus - Amazonas

Melquiades De Oliveira Costa

Universidade Federal do Oeste do Pará, CAMPUS Oriximiná, Oriximiná - Pará

Maria Ivone Lopes Da Silva

Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Manaus - Amazonas

Carlos Gustavo Nunes Da Silva

Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Manaus - Amazonas

RESUMO: As abelhas sem ferrão são altamente adaptadas e responsáveis pela maior parte da polinização das árvores nativas, grande é a variedade de organismos associados a elas, como vírus, bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Estudos já realizados têm relatado o consumo *in natura* e uso de fungos para enriquecimento e produção alimentar por abelhas sem ferrão, além de outra interação ainda não compreendidas. Desta forma este trabalho teve como objetivo isolar fungos do trato digestivo de abelhas sem ferrão *Melipona*

seminigra merrillae Cockerell, 1919. Foram utilizadas 10 abelhas, coletadas de colmeias artificiais em um Meliponário de Oriximiná-PA, no período de estiagem do ano de 2018. As abelhas coletadas foram transferidas para tubos estéreis, acondicionados sob refrigeração e levadas ao Laboratório Multidisciplinar de Biologia da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), Campus Oriximiná, onde as abelhas foram esterilizadas, dissecadas e transferindo-se a parte anterior do intestino (Foregut), intestino médio (Midgute) e intestino posterior (Hindgut) para tubos contendo solução salina, o plaqueamento posterior da solução em meio SABOURAUD em triplicata, e incubadas a 28 °C para desenvolvimento e isolamento das colônias. Após o desenvolvimento das estruturas fúngicas, foi realizada a identificação morfológica a partir de caracteres macro e microscópicos das culturas em microcultivo sob lamínulas, depositadas sobre lâminas. Neste estudo foram observadas 522 colônias, onde 81 não desenvolveram estruturas reprodutivas e foram consideradas Micélio estéril, 127 desenvolveram estruturas reprodutivas mais não foram o suficiente para identificá-las e 314 foram identificadas, distribuídas e 10 gêneros. Destas o gênero *Geotrichum* (203) foi o mais predominante, seguido de *Penicillium* (47),

Curvularia (17), *Cladosporium* (16), *Fusarium* (16), *Paecilomyces* (5), *Aspergillus* (3), *Colletotrichum* (3), *Candida* (3) e *Syncephalastrum* (1). Com este trabalho espera-se conhecer um pouco da biota fúngica do trato digestivo dessas abelhas sem ferrão, e a possibilidade da descoberta de novas espécies de fungos.

PALAVRAS-CHAVE: Abelhas sem ferrão, intestino e fungos

OCCURRENCE OF FUNGI ASSOCIATED WITH THE GUT OF STINGLESS BEES

Melipona seminigra MERRILLAE COCKERELL, 1919

ABSTRACT: Stingless bees are highly adapted and responsible for the greater pollination of native trees, the variety of organisms associated with them, such as viruses, bacteria, yeasts and filamentous fungi, is great. Studies already carried out have reported consumption in natura and use of fungi for enrichment and food production by stingless bees, in addition to another interaction not yet understood. In this way, this work aimed to isolate fungi from the digestive tract of stingless bees *Melipona seminigra merrillae Cockerell, 1919*. Ten bees were used, collected from artificial hives in a Meliponário in Oriximiná-PA, in the drought period of the year 2018. The collected bees were transferred to sterile tubes, packed under refrigeration and taken to the Multidisciplinary Biology Laboratory of the Federal University of Western Pará (UFOPA), Campus Oriximiná, where the bees were sterilized, dissected and the anterior part of the foregut was transferred, midgut and hindgut for tubes containing saline solution, the posterior plating of the solution in SABOURAUD medium was performed in triplicate, and incubated at 28 °C for development and isolation of colonies. After the development of fungal structures, morphological identification was performed from macro and microscopic characters of cultures in microcultures under coverslips, deposited on slides. In this study, 522 colonies were observed, where 81 did not develop reproductive structures and were considered sterile Mycelium, 127 they developed reproductive structures but were not enough to identify them and 314 were identified, distributed and 10 genera. Of these, the genus *Geotrichum* (203) foi o mais predominante, seguido de *Penicillium* (47), *Curvularia* (17), *Cladosporium* (16), *Fusarium* (16), *Paecilomyces* (5), *Aspergillus* (3), *Colletotrichum* (3), *Candida* (3) e *Syncephalastrum* (1). With this work it is expected to know a little about the fungal biota of the digestive tract of these stingless bees, and the possibility of discovering new species of fungi.

KEYWORDS: Stingless bees, intestine and fungi.

1 | 1. INTRODUÇÃO

Estima-se, de 25 a 30 mil espécies de abelhas distribuídas nas diferentes regiões do mundo, o Brasil abriga cerca de 25% das espécies (MICHENER, 2000). As abelhas sem ferrão possuem cerca de 600 espécies e dessas 244 espécies são descritas no Brasil e deste total, 114 espécies estão na Amazônia, das 74 espécies do gênero *Melipona*

(PEDRO, 2014), ocorrem exclusivamente da América do Sul até o Norte do México, na América Central (SOUZA et al., 2009).

Mas desta diversidade de espécies do gênero *Melipona*, muitas produzem mel suficiente para ser explorado comercialmente, porém poucas são criadas com esse objetivo, Meliponicultura (SILVEIRA et al., 2002). Os ecossistemas brasileiros, em especial o amazônico, possuem muitas condições que favorecem a criação dessas abelhas. Dentre elas, podemos citar: clima quente, flora rica em espécies fornecedoras de néctar, pólen, resina e floração mais distribuída ao longo do ano, além de um grande mercado com boa cotação para esse produto (VENTURIERI, 2008).

O desenvolvimento da criação racional das colônias dessas abelhas possibilita a exploração econômica de seus produtos, que serve de suporte econômico para muitas pessoas proporcionando-lhes uma fonte alternativa de renda (SOUZA et al., 2009). Embora a produção de mel das abelhas sem ferrão seja inferior às da abelha *Apis mellifera*, as *Melipona* possuem vantagens muito importantes em relação às outras espécies, especialmente pelo fato delas estarem muito mais adaptadas à polinização das árvores nativas (VENTURIERI, 2008).

Todas as espécies de insetos conhecidos abrigam uma comunidade rica e complexa de microrganismos como ácaros, protozoários, vírus, bactérias ou fungos, onde podem ser encontrados em sua superfície corpórea ou em seu interior, entre eles estão às abelhas (SOUZA et al., 2018). A maioria das espécies de abelhas nativas sem ferrão carece de informações sobre seu comportamento, reprodução e microbiota associada, e um dos aspectos importantes sobre a biologia desses insetos é o conhecimento da microbiota fúngica, a qual pode causar enfermidade a esses organismos e há poucos relatos sobre a relação da microbiota com abelhas sem ferrão (PALUDO et al., 2019).

Apesar de estudos relatarem a microbiota de colmeias (MORAIS et al., 2013) e méis de abelhas sem ferrão no Brasil (SOUZA et al., 2009; MATOS et al., 2011), poucos estudos têm examinado diretamente a microbiota fúngica desses organismos da região Amazônica (FERRAZ et al., 2008; SILVA et al., 2011; SOUZA et al., 2018), estudos envolvendo microrganismos associados a abelhas podem ajudar no desenvolvimento de estratégias para proteger as abelhas (MOTTA et al., 2018).

Neste contexto, realizou-se um levantamento visando conhecer a ocorrência de fungos no intestino de abelhas sem ferrão *M. seminigra*.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta do material biológico e isolamento fúngico

Foram investigadas 10 abelhas sem ferrão em um Meliponário urbano, no período de menor incidência de chuvas (estiagem), mês de setembro do ano de 2018, no município

de Oriximiná, (06°27'47.4"S 98°05'91.5"W), Pará, Brasil, onde foram isolados fungos em todas as abelhas analisadas.

As abelhas foram coletadas vivas com auxílio de pinças, transferindo-as para tubos individuais esterilizados, acondicionando-os em caixa térmica refrigerada para eutanásia por hipotermia das abelhas e preservação do material, para transporte até o Laboratório Multidisciplinar de Biologia, do Campus de Oriximiná da Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA para posterior análise.

As abelhas foram desinfectadas superficialmente em uma solução de 0,5% de hipoclorito de sódio por 1 minuto e enxaguadas em água destilada estéril. Posteriormente, imersas em uma solução de 0,05% de ácido ascórbico mais 0,05% de ácido cítrico por 1 minuto. Ao término deste processo as abelhas foram dissecadas e transferindo-se a parte anterior do intestino (Foregut), intestino médio (Midgute) e intestino posterior (Hindgut) para tubos contendo 1,0 mL de uma solução salina 0,8% acondicionadas em micro tubos.

A remoção dos esporos do intestino das abelhas foi por agitação em vórtex por 10 minutos. Alíquotas de 100 µL de cada amostra foram transferidas para placas de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) com solução de antibiótico Amoxicilina 100 mg/L, em triplicata. O pH do meio de cultura foi aferido em 6.8 e incubadas em estufa BOD a 28 °C por até 30 dias.

2.2 Purificação das colônias isoladas

A técnica da cultura monospórica foi utilizada para purificação das amostras de fungos, onde um pequeno fragmento de inóculo foi transferido para tubo contendo 1,0 mL de solução Tween 80, agitando em vórtex (SÃO JOSÉ et al., 1994).

A diluição realizada em série, retirando-se 100 µL da suspensão da amostra, transferindo-a para um tubo contendo 900 µL de solução salina estéril, a diluição foi repetida sucessivamente até 10^{-3} .

Ao final da série de diluições, 100 µL da diluição 10^{-3} foi inoculada em triplicata, em placas com SDA, e incubadas a 28 °C por 48 horas. Após este período, as colônias foram inoculadas em tubos com o mesmo meio de isolamento. As amostras puras foram repicadas para posterior identificação.

2.3 Microcultivo em lâmina para identificação morfológica de fungos

A técnica de microcultivo em lâmina, segundo Riddell (1950), modificada, onde foi depositado um pedaço circular de papel filtro sobre o fundo de uma placa de Petri, a qual recebeu um par de lamínulas 24 x 24 mm e uma lâmina 76 x 26 mm esterilizadas.

Dois blocos de meio SDA foram transferidos para a superfície central da lâmina estéril, e nas extremidades do bloco de ágar o inóculo de uma porção da colônia, e as lamínulas depositadas sobre a superfície do bloco, o papel foi umedecido com água

destilada esterilizada, suficiente para cinco a sete dias.

Após o crescimento fúngico mostrar-se visualmente suficiente, as lamínulas removidas e dispostas sobre uma gota do corante azul-de-lactofenol na superfície de uma lâmina e analisadas em microscopia óptica (ONIONS et al., 1981), para identificação de suas estruturas sexuais e/ou assexuais (ELLIS, 1971; BARNETT e HUNTER, 1972; ARX, 1974).

De cada um dos isolados foram armazenadas duplicatas da colônia matriz conforme o método Castellani (ARAÚJO et al., 2002) e mantidos em temperatura ambiente. Colônias que não desenvolverem estruturas reprodutivas foram reinoculadas e submetidas à variação na temperatura, pH, luz e nutrientes para estimular o desenvolvimento reprodutivo. Os fungos identificados estão catalogados e estocados na micoteca do Laboratório Multidisciplinar de Biologia, do Campus de Oriximiná da Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA.

2.4 Identificação morfológica de fungos não filamentosos

Para uma classificação morfológica eficaz, os aspectos macroscópicos das colônias analisados quanto a: cor, textura, tamanho, elevação, tipo de borda, brilho e forma. Os aspectos microscópicos das células quanto a: forma, presença de filamentos, brotamento e o tipo de esporos, além de testes fisiológicos de assimilação e fermentação de açúcares, entre outros (NEUFELD, 1999).

3 | RESULTADOS

Neste estudo foram observadas 522 colônias, onde 81 não desenvolveram estruturas reprodutivas e foram consideradas Micélio estéril, 127 desenvolveram estruturas reprodutivas mais não foram o suficiente para identificá-las e 314 foram identificadas a nível de gênero (Gráfico 1 e Tabela 1).

Os isolados do gênero *Geotrichum* (203) foram os mais incidentes neste estudo, seguidos de *Penicillium* (47), *Curvularia* (17), *Cladosporium* (16), *Fusarium* (16), *Paecilomyces* (5), *Aspergillus* (3), *Colletotrichum* (3), *Candida* (3) e na outra vertente o gênero *Syncephalastrum* (1) teve a menor incidência (Gráfico 1).

Os isolados da parte Foregut das abelhas sem ferrão foram mais incidentes com 183 isolados e 10 gêneros identificados, seguido do Midgut, 178 isolados, 8 gêneros e Hindgut, 161 isolados, 7 gêneros.

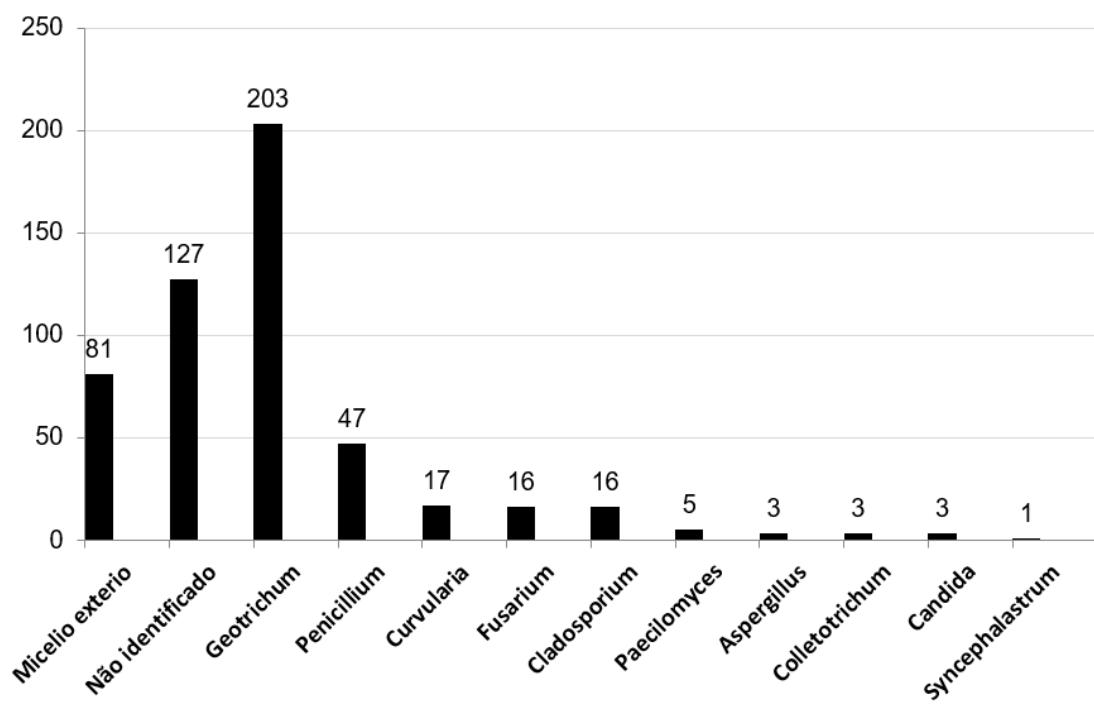


Gráfico 1. Fungos isolados do intestino de abelhas sem ferrão *M. seminigra*, coletadas em um Meliponário urbano no município de Oriximíná-PA.

Gêneros	Intestino			nº isolados
	Foregut	Midgut	Hindgut	
<i>Geotrichum</i>	75	68	60	203
<i>Penicillium</i>	19	15	13	47
<i>Curvularia</i>	5	10	2	17
<i>Fusarium</i>	4	10	2	16
<i>Cladosporium</i>	3	6	7	16
<i>Paecilomyces</i>	5	-	-	5
<i>Aspergillus</i>	1	1	1	3
<i>Colletotrichum</i>	1	1	1	3
<i>Candida</i>	1	2	-	3
<i>Synccephalastrum</i>	1	-	-	1
<i>Micelio exterior</i>	23	29	29	81
<i>Não identificado</i>	45	36	46	127
Total	183	178	161	522

Tabela 1. Isolados fúngicos do intestino de abelhas sem ferrão *M. seminigra* coletadas em um Meliponário urbano no município de Oriximíná-PA.

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

A importância das abelhas para as nossas florestas é incalculável, a ação do homem no ambiente está diretamente ligada ao desaparecimento de milhões de abelhas ao redor do mundo, ocasionando perdas imensuráveis. A busca por conhecimento relacionado ao meio de vida desses indivíduos - e para com outros organismos - é crucial para compreendermos muitas das relações ainda não explicadas.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; KUBLINCKY-SOBRAL, J.; LACAVA, P. T. **Manual: Isolamento de microrganismos endofíticos.** Departamento de Genética. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo. Piracicaba, São Paulo. 2002. 86p.
- ARX, J. A. von. **The genera of fungi sporulating in pure culture.** 2 ed. J. Cramer, Vaduz, 1974, 351p.
- BARNETT, H. L.,; HUNTER, B. B. **II Illustrated genera of imperfect fungi,** 3 ed. Minneapolis, Minnesota, USA: Burgess Publishing Co. 1972. 241p.
- CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Meliponini Lepeletier, 1836. In: Moure JS, Urban D, Melo GAR. (Orgs). **Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region** - online version. 2013.
- ELLIS, B. M. **Dematiaceous hyphomycetes.** Surrey, Commonwealth Mycological Institute, Kew. 1971. 608p.
- ELTZ, T.; BRUHL, C. A.; GORKE, C. Collection of mold (*Rhizopus* sp.) spores in lieu of pollen by the stingless bee *Trigona collina*. **Insects Sociaux**, v. 49, n. 1, pp. 28-30. 2002.
- FERRAZ, R. E.; LIMA, P. M.; PEREIRA, C. C. O.; FREITAS, N. D.; FEIJÓ, F. M. C. Microbiota Fúngica de *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae). **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 3, pp. 345-346. 2008.
- MATOS, I. T. S. R.; NUNES, M. T.; MOTA, D. A.; LAUREANO, M. M. M.; HOSHIBA, M. A. Qualidade microbiológica do mel de *Melipona* spp. produzido na Amazônia Central (Parintins - AM - Brasil). **Revista Verde**, v. 6, n. 4, pp. 91-95. 2011.
- MICHENER, C. D. **The bees of the World.** Baltimore, Johns Hopkins University. 2000. 913p.
- MORAIS, P. B.; SÃO THIAGO CALAÇA, O. S.; ROSA, C. Microorganisms associated with stingless bees. In: Vit, P.; Pedro, S.R.M.; Roubik, D. (Org.). **Pot honey: A legacy of stingless bees.** 1ed, Springer, v. 1, pp. 173-186. 2013.
- MOTTA, E. V. S.; RAYMANN, K. MORAN, N. A. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. **PNAS**, v. 115, n. 41. 2018.
- NEUFELD, P. M. **Manual de Micologia Médica.** Rio de Janeiro: Programa Nacional de Controle de Qualidade. 1999. 240p.
- PEDRO, S. R. M. The Stingless Bee Fauna In Brazil (Hymenoptera: Apidae), **Sociobiology**, v. 61, n. 4, pp. 348-354. 2014.
- PALUDO, C. R.; PISHCHANY, G.; ANDRADE DOMINGUEZ, A.; SILVA-JUNIOR, E. A.; MENEZES, C.; NASCIMENTO, F. S.; CURRIE, C. R.; KOLTER, R.; CLARDY, J.; PUPO, M. T. Microbial community modulates growth of symbiotic fungus required for stingless bee metamorphosis. **PLoS ONE**, v. 14, n. 7. 2019.
- SANTOS, A. L. **Identificação da flora microbiana em colmeias de Miliponina.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, Uberlândia, Minas Gerais. 2007. 35p.
- SÃO JOSÉ, C.; COSTA, M. J.; ALMEIDA, M. J. Isolamento de fungos queratinófílicos a partir de Areia de Praias. **Revista de Biologia.** Lisboa, v.15, pp. 161-171. 1994.
- SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação.** Belo

Horizonte. Ministério do Meio Ambiente/Fundação Araraucária. 2002. 253p.

SILVA, R. T.; CARVALHO-ZILSE, G. A.; RAFAEL, J. A. Insetos associados a colônias de abelhas sem ferrão amazônicas em meliponário urbano e rural. In: 38º CONBRAVET - Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Florianópolis. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Número Especial. 2011.

SOUZA, J. R. S.; SARQUIS, M. I. M; PANTOJA, M. C.; COSTA NETO, P. Q.; PEREIRA, J. O.; GALVÃO, R. M. S.; SILVA, M. I. L. Occurrence of filamentous fungi associated with stingless bees *Melipona* in meliponaries at the metropolitan region of Manaus, Amazonas. **Revista da Biologia**, v. 18, n. 1, pp. 1-5. 2018.

SOUZA, B. A.; CARVALHO, C. A. L.; ALVES, R. M. O.; DIAS, C. S.; CLARTON, L. **Munduri (*Melipona asilvai*): a abelha sestrosa**. 1 ed. Cruz das Almas-BA: Série Meliponicultura, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia 1, 2009. 46p.

VENTURIERI, G. C. **Criação de abelhas indígenas sem ferrão**. 2 ed. Revisada e Atualizada. Belém, PA: EMBRAPA Amazônia Ocidental 1, 2008. 60p.

ONIONS, A. H. S.; ALLSOPP, D.; EGGIN, H. O. W. **Smith's Introduction to Industrial Mycology**, 7 ed., Edward Arnold (ed.), London: Great Britain. 1981. 398p.

RIDDELL, R. W. Permanent Stained Mycological Preparations Obtained by Slide Culture. **Mycologia**, v. 42, n. 2, pp. 265-270. 1950.

INFLUÊNCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *CYBOPOGON FLEXUOSUS* SOBRE A SUSCETIBILIDADE E FATORES DE VIRULÊNCIA DE LEVEDURAS DO COMPLEXO *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

Data de aceite: 01/06/2020

Lucas Daniel Quinteiro de Oliveira

Programa de Residência Multiprofissional em Saúde, Especialização em Urgência e Emergência, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia – GO, Brasil.

Lúcia Kioko Hasimoto e Souza

Departamento de Microbiologia, Parasitologia, Imunologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia – GO, Brasil.

Maria do Rosário Rodrigues Silva

Departamento de Microbiologia, Parasitologia, Imunologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia – GO, Brasil.

Benedito Rodrigues da Silva Neto

Departamento de Microbiologia, Parasitologia, Imunologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia – GO, Brasil.

dr.neto@ufg.br

RESUMO: O complexo *Cryptococcus neoformans* compreende duas espécies, responsáveis por causar criptococose, sendo a principal manifestação a meningoencefalite em imunocomprometidos. Sua patogenicidade está relacionada aos fatores de virulência. O tratamento desta enfermidade é dificultado

devido aos fármacos apresentarem alta toxicidade, resistência do fungo e pouca eficiência terapêutica. Pesquisa com produtos naturais biologicamente ativos tem demonstrado que os óleos essenciais (OEs) apresentam importante atividade antifúngica. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia como antifúngico e ação sobre os fatores de virulência em espécies do complexo *C. neoformans* do óleo essencial de *Cybopogon flexuosus* (Capim limão). *C. flexuosus* reduziu o tamanho da cápsula em 48,7%, inibiu a produção de melanina, urease, fosfolipase e DNAse em 30%, 30%, 25% e 15% respectivamente. Os dados demonstraram que os isolados não produziram proteinase e a atividade hemolítica foi reduzida em 45% para *C. flexuosos*. Os resultados enaltecem o potencial desse óleo essencial no tratamento da criptococose assim como na inibição dos fatores de virulência. Esses dados são promissores, sendo necessário pesquisas mais aprofundadas para o desenvolvimento um novo fármaco.

PALAVRAS-CHAVE: *Cryptococcus neoformans*, óleos essenciais, *Cybopogon flexuosus*, fatores de virulência.

INFLUENCE OF THE CYBOPOGON FLEXUOSUS ESSENTIAL OIL ON THE SUSCETIBILITY AND YEAST VIRULENCE FACTORS OF THE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* COMPLEX

ABSTRACT: The *Cryptococcus neoformans* complex comprises two species, responsible for causing cryptococcosis, the main manifestation of which is meningoencephalitis in immunocompromised individuals. Its pathogenicity is related to virulence factors. The treatment of this disease is difficult due to the fact that the drugs have high toxicity, resistance of the fungus and little therapeutic efficiency. Research with biologically active natural products has shown that essential oils (OEs) have important antifungal activity. Thus, the present study aimed to evaluate the efficacy as an antifungal and action on virulence factors in species of the *C. neoformans* complex of *Cybopogon flexuosus* (Capim lemon) essential oil. *C. flexuosus* reduced the size of the capsule by 48.7%, inhibited the production of melanin, urease, phospholipase and DNase by 30%, 30%, 25% and 15% respectively. The data demonstrated that the isolates did not produce proteinase and the hemolytic activity was reduced by 45% for *C. flexuosos*. The results highlight the potential of this essential oil in the treatment of cryptococcosis as well as in the inhibition of virulence factors. These data are promising and further research is needed to develop a new drug.

KEYWORDS: *Cryptococcus neoformans*, essential oils, *Cybopogon flexuosus*, virulence factors.

1 | INTRODUÇÃO

As leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans* compreende por fungos altamente patogênicos, causadores de sintomas graves e evoluindo para lesões no sistema nervoso (SNC), este acometimento contribui para aumento da mortalidade (Chang & Kwon-Chung 1994; Durski et al. 2013; Meya et al. 2015 those with CM at day 0 ($n = 40$)).

A infecção denominada de Criptococose é responsável por acometer de forma sistêmica e está relacionada com duas espécies: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (Cogliati 2013). Esta infecção fúngica ocorre de forma inesperada e auxiliada por fatores de virulência específicos a exemplo da capsula polissacarídica, fosfolipase, uréase, proteinase, hemolisinas, melanina e Dnase favorecem a patogenia (Steinbach et al. 2007).

O diagnóstico da criptococose é realizado através de exames laboratoriais, usando técnicas de exame direto (ED), cultura, sorologia, diagnóstico molecular a partir de amostras do liquor, escarro, biopsia tecidual, lavado brônquico, sangue, urina, secreção prostática e amostra de medula (Mitchell & Perfect 1995; Gazzoni et al. 2008).

Atualmente o serviço de saúde utiliza alguns fármacos para conter a evolução da doença, entretanto nem sempre é suficiente para alcançar uma terapêutica eficaz, pois efeitos colaterais causados pela presença de toxicidade e resistência farmacológica

prejudicam a continuidade do tratamento, entre esses os principais antifúngicos prescritos são fluconazol, anfotericina B e itraconazol (Saag et al. 2000; Ellis 2002; Severo et al. 2009; Davis et al. 2015; Ravikant et al. 2015).

O gênero *Cymbopogon* pertence à família *Poaceae* e contém 140 espécies sendo encontradas por todas regiões do mundo e na Índia foram descritas cerca de 45 espécies. Esta planta em regiões de clima tropical e subtropical, espalhadas pela Ásia, África e pelas Américas, especificamente em regiões de solo montanhoso, arenosos e em pastagens (Padalia et al. 2011).

2 | METODOLOGIA

2.1 C. flexuosus

O óleo essencial de *C. flexuosus* armazenado na temperatura -4°C a fim de manter a integridade estrutural e conservar todos os compostos fitoquímicos. O OE foi preparado por solubilização em dimetilssulfoxido 0,1% (DMSO) e diluídos em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Sigma, EUA), com glutamina e sem bicarbonato de sódio, tamponados a pH 7,0 com ácido morfolinopropanossulfônico (MOPS, Sigma Chemical). Para a realização dos experimentos foi utilizada a concentração final de 20000 µg/mL do OE e a partir desta foi desenvolvida uma solução inicial de 2048 µg/mL.

2.2 Inóculos

Os estudos foram realizados utilizando 20 isolados do complexo *C. neoformans* de origem clínica, entre esse duas cepas ATCC 90112 *C.neoformans* e ATCC24065 *C.gattii* pertencentes Micoteca do Laboratório de Micologia do IPTSP/UFG. Todos os isolados foram obtidos do líquor de pacientes com SIDA.

2.3 Avaliação da susceptibilidade *in vitro* para determinação da CIM e CFM

Para avaliação da atividade antifúngica, foi utilizada a metodologia de microdiluição em caldo padronizada pelo CLSI, mostrando que OE de *C. flexuosus* em 15 isolados de *C. neoformans* mostrou uma média da CIMs de 192 µg/ml, onde 53,8% apresentou 16 µg/ml. Além disso constatamos que as CFMs 320 µg ml, demonstrando que 46,1% dos isolados de *C. neoformans* foram inibidos em 256 µg/ml.

Para 5 isolados de *C. gattii* observou-se CIMs de 72 µg/ml, sendo que 66,6% foram inibidos a 128 µg/ml e os dados obtidos para CFMs mostraram que na concentração de 128 µg/ml, não se observou crescimento em 50% dos isolados.

Os valores da CIM₅₀ foi de 128µg/ml e na CIM₉₀ foi 256µg/ml. Observamos que valores de CIM e CFM a ação do OE caracterizou pelo efeito fungistático em concentrações menores que 4 X CIM.

O OE *C. flexuosus* conseguiu apresentar ação antifúngica eficaz sobre as leveduras do complexo *C. neoformans*, no entanto devido a utilização de concentrações altas é sugestivo que sua ação seja caracterizada como moderada em relação a outros estudos.

3 I RESULTADOS

3.1 Cinética de crescimento microbiano

A observação do crescimento dos isolados de *Cryptococcus* foi analisada pela técnica de Klepser et al. 1997 & 1998, onde após ação do OE em diversas concentrações do OE e períodos de exposição é realizada a contagem de colônia formadas.

A ação do OE de *C. flexuosus* interagindo no crescimento das leveduras de *C. neoformans* ATCC 90112 demonstraram diminuição na contagem de colônias nas concentrações de 2 X CIM e 4 X CIM. Em uma concentração correspondente a 2 X CIM após 20 h, não se observou o crescimento de colônias, o mesmo ocorrendo após 6 horas submetidas à 4 X CIM.

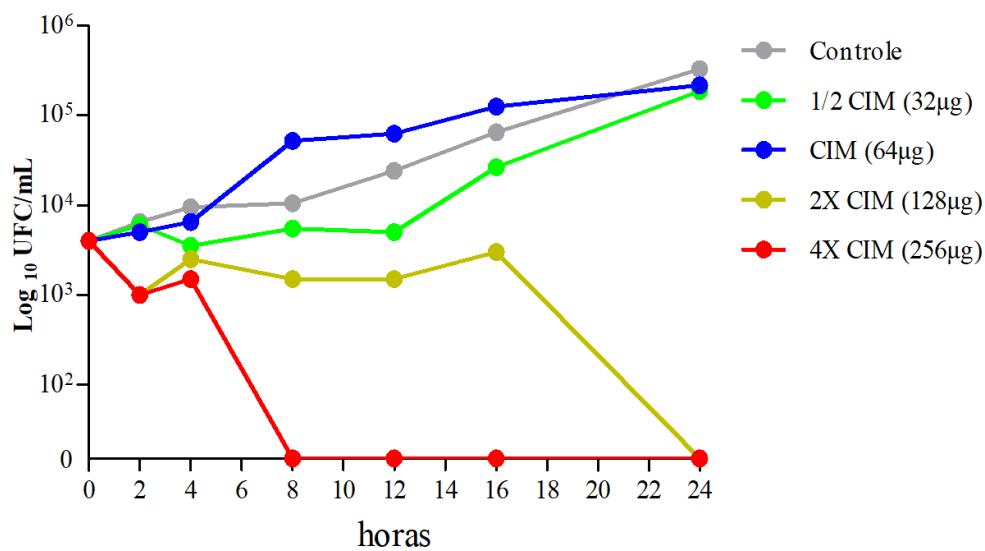


Figura 01 - Cinética de crescimento de *C. neoformans* sob diversas concentrações do OE de *C. flexuosus*.

Ação da *C. flexuosus* sob o crescimento da cepa de *C. gatti* ATCC 24065 demonstrou que 8 horas de exposição inibiu o crescimento total na concentração de 4XCIM. Quando submetido à concentrações inferiores, não houve inibição o crescimento do fungo

3.2 Formação da cápsula polissacarídica

A análise da formação de cápsula foi realizada através da metodologia de indução de cápsula padronizada por Zaragoza & Casadevall, 2004, onde utilizamos um meio indutor acrescido de OE em diversas concentrações para inoculação dos isolados de

Cryptococcus.

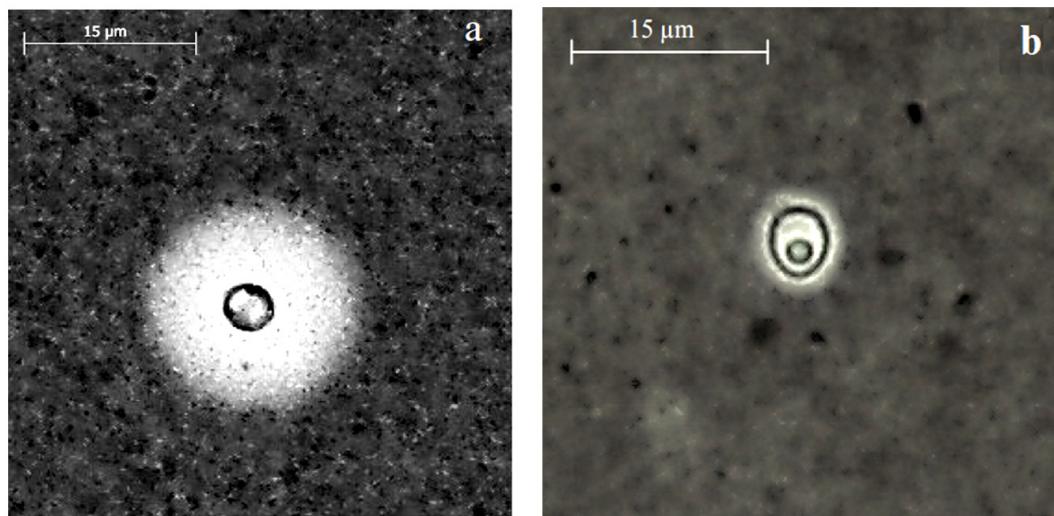


Figura 02 - Cápsula formada pelo isolado L2 de *C. neoformans* após exposição aos: (a) – controle positivo (b) *C. flexuosus* em tinta da nanquim (400X).

Foi observado que os isolados submetidos como controle positivo, meio contendo somente o indutor, apresentaram uma média de diâmetro capsular de $10,30\mu\text{m}$ enquanto no controle negativo usando somente Caldo *Sabouraud dextrose 3%* foi $4,72\mu\text{m}$.

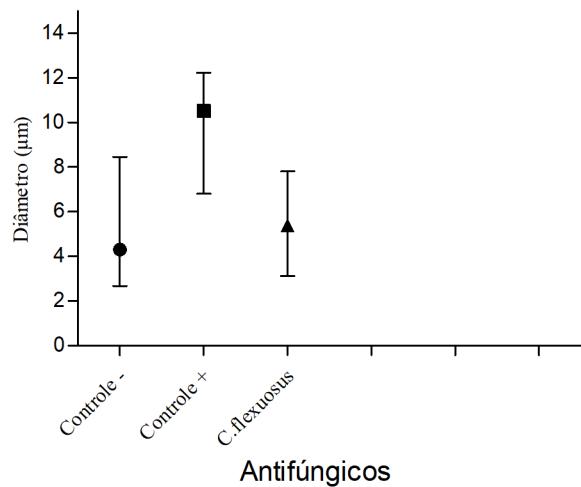


Figura 03 - Média dos diâmetros das cápsulas produzidas por isolados do complexo *C. neoformans* após ação do OEs de *C. flexuosus*, controle positivo (meio indutor) e controle negativo (CSD).

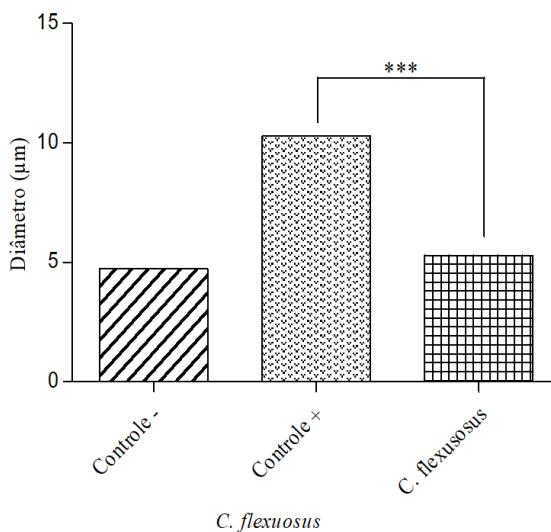


Figura 04 - Comparação dos resultados do diâmetro da cápsula de *C. neoformans* expostas ao OE de *C. flexuosus*, controle positivo e negativo.

No entanto ao realizar o teste usando o OE *C. flexuosus* mostrou variação do tamanho da capsula para 5,45 μm , esses valores demonstraram que houve uma redução significativa no diâmetro em comparação com o controle positivo ($p<0,0001$).

3.3 Produção de melanina

A avaliação da capacidade de produção de melanina foi realizada com auxílio do método de Paliwal & Randhawa, 1978, usando o meio de cultura ágar niger como meio de cultura que favorecerá a formação do pigmento.

Analizando a ação do óleo de *C. flexuosus* utilizando a CIM em meio de cultura, observamos que após a inoculação das leveduras obtivemos resultados demonstrando inibição da produção em respectivamente 12 isolados.

3.4 Produção da uréase

O experimento para observação da ação da enzima foi realizado através da inoculação dos isolados em meio de cultura ureia de Christensen segundo Gomes et al. 2010 contendo o óleo analisado. Os testes com *C. flexuosus* mostrou que ao usar a CIM houve inibição da produção em 25 % dos isolados avaliados.

3.5 Atividade da fosfolipase

A observação da atividade da enzima foi analisada a partir da metodologia de crescimento em meio fosfolipase desenvolvida por Price et al. 1982. Onde foi possível detectar zonas de ação enzimática ao entrar em contato com o meio de cultura rico em lipídeos.

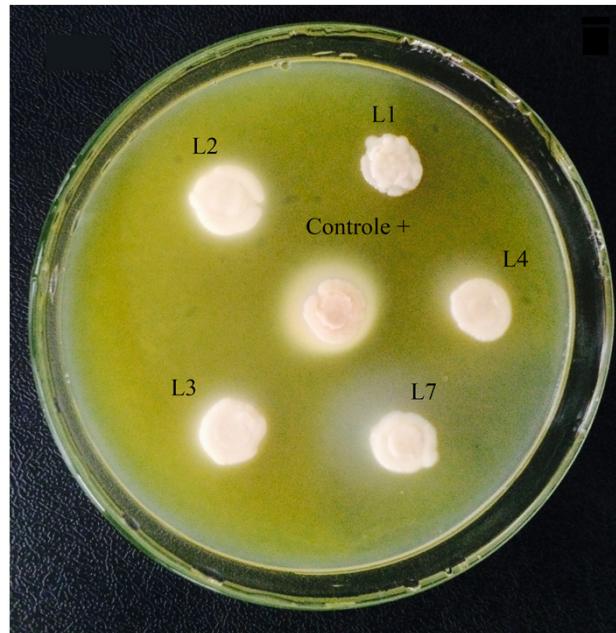


Figura 05 - Avaliação da atividade de fosfolipase com formação de halos precipitação dos isolados do complexo *Cryptococcus neoformans* e controle ATCC 90028 (*Candida albicans*) expostos a *C. flexuosus*.

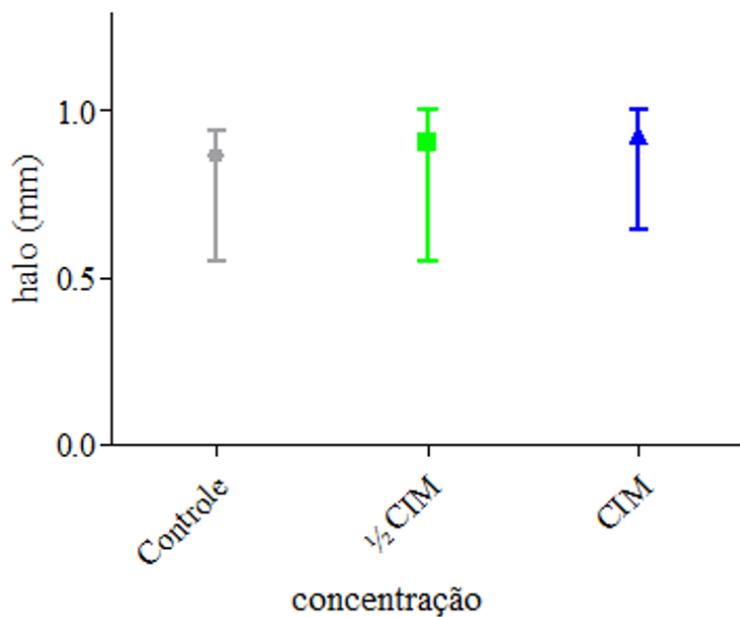


Figura 06 - Resultados da média dos valores da atividade enzimática dos isolados do complexo *C. neoformans* submetidos ao OE de *C. flexuosus*.

Os experimentos utilizando $\frac{1}{2}$ CIM do OE de *C. flexuosus* mostrou que 10% dos isolados não demonstraram efeito da fosfolipase no meio de cultura, no entanto ao usarmos a CIM o percentual de redução alcançou 25%.

3.6 Atividade da proteinase

A proteinase foi avaliada pela técnica de Ruchel et al. 1982, caracterizada pela utilização de um meio de cultura rico em albumina bovina poderá interagir com a enzima.

Os testes mostraram que as leveduras analisadas não apresentaram atividade desta enzima, sendo que o controle positivo com ATCC 90028 *C. albicans* foi característico para atividade enzimática.

3.7 Produção das Hemolisinas

Para determinação da presença das enzimas foi utilizada a técnica de Luo et al. 2001. Onde foi possível aferir a dimensão dos halos formados pela hemólise causada pela interação das leveduras com o meio de cultura rico a base sangue.

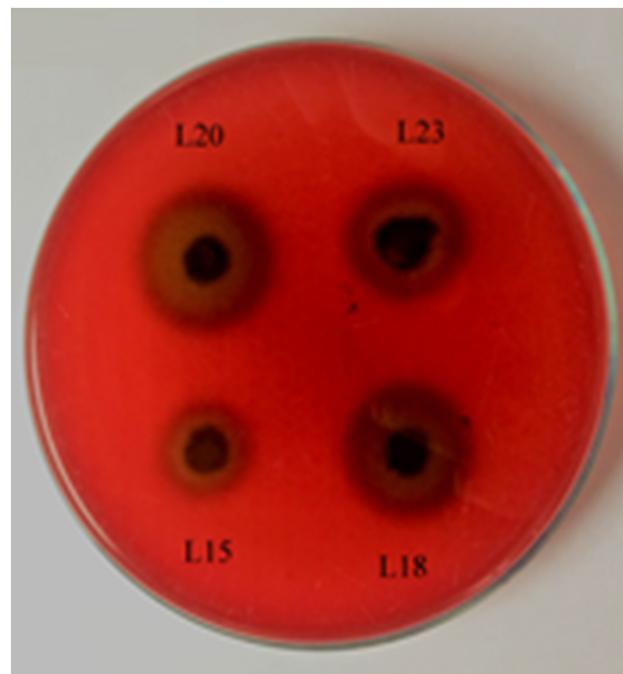


Figura 07 - Avaliação da atividade hemolítica em isolados do complexo *C. neoformans* após ação de OE de *C. flexuosus*.

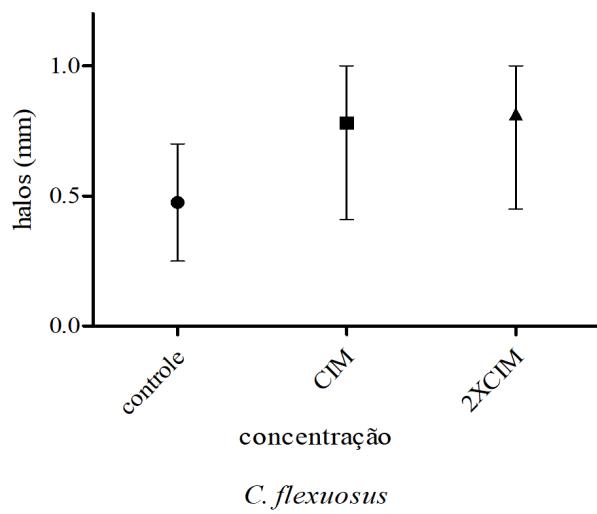


Figura 08 - Média dos resultados de atividade hemolítica dos isolados do complexo *C. neformans* sob ação da CIM e 2 X CIM do OE *C. flexuosus*.

A presença da zona de hemólise indicou que o OE na CIM inibiu a atividade das hemolisinas em 45% dos isolados de *Cryptococcus*, valores demonstraram ser significativos ($p<0,0001$) ao comparar com o controle negativo, na ausência do óleo, houve uma diferença significativa.

3.8 Produção da Dnase

O teste para analisar a produção de Dnase foi realizado em meio de cultura contendo ácido desoxirribonucleico 0,2% (Merk/Alemanha). Para observar a formação halos relacionado com atividade da enzima produzida pelos isolados.

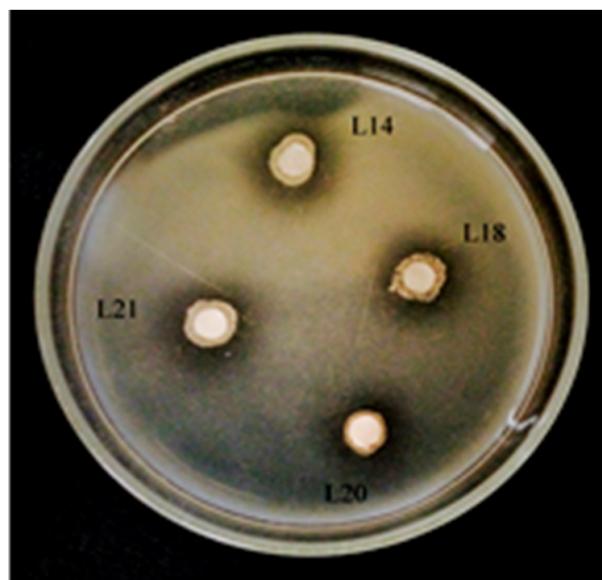


Figura 09 - Produção de DNAse em isolados do complexo *C. neoformans*: (a) - Meio de cultura contendo CIM do OE de *C. flexuosus*.

Os valores da ação enzimática após submissão ao óleo na CIM, mostrou que 15% dos isolados não demonstraram halos característicos de atividade da Dnase. Correspondendo a média da variação dos halos de aproximadamente 0,6 mm, em comparação com o controle negativo na ausência de OE com valores de 0,5 mm houve presença da ação enzimática em todos os isolados $p=0,0427$.

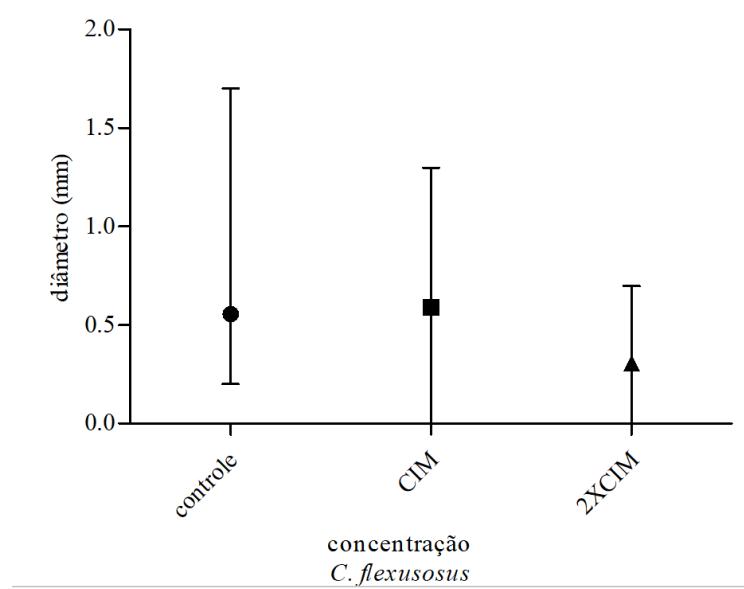


Figura 10 - Média de diâmetro dos halos resultante da ação da DNAse em isolados de *C. neoformans* após ação do OE de *C. flexuosus*.

4 | CONCLUSÕES

Os experimentos mostraram *C. flexuosus* apresentaram ação antifúngica sobre as leveduras do complexo *C. neoformans*, apresentando ação fungicida em altas concentrações, especificamente acima de 4X CIM. Além disso foi observado a capacidade que o OE possui para comprometer a capacidade de formação da capsula polissacarídica. O efeito perante outros fatores foi satisfatório, quando se observa a interferência na produção da melanina em 60% dos isolados avaliados.

Foi constatado que a ação da uréase e fosfolipase foi inibida em 25% das leveduras analisadas. Valores para a atividade de hemolisinas foram mais expressivos e chegando a 45% de redução de hemólise. Também foi constatado que produção de Dnase apresentou pouca redução, onde somente 15% teve ausência da ação desta enzima. Perante os dados analisados, a ação do OE não foi percebida na avaliação da proteinase fúngica.

Os resultados relacionados a atividade deste OE mostraram atividade antifúngica considerável na interferência da produção de importantes fatores de virulência, tornando de grande importância a continuidade dos estudos.

REFERÊNCIAS

- Chang YC, Kwon-Chung KJ. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Molecular and cellular biology*. 14: 4912–9, 1994.
- Cogliati M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica*. 2013: 23, 2013
- Davis S, Vincent BM, Endo MM, Whitesell L, Marchillo K, Andes DR, Lindquist S, Burke M. Nontoxic antimicrobials that evade drug resistance. *Nature Chemical Biology*. 7; 481–487, 2015
- Durski KN, Kuntz KM, Yasukawa K, Virnig BA, Meya DB, Boulware DR. Cost-Effective Diagnostic Checklists for Meningitis in Resource-Limited Settings. *Jaids-Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 63: 1077-9450, 2013.
- Ellis D. Amphotericin B: spectrum and resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 49: 7–10, 2002.
- Meya DB, Okurut S, Zziwa G, Rolfs MA, Kelsey M, Cose S, Joloba M, Naluyima P, Palmer BE, Kambugu A, Mayanja-Kizza H, Bohjanen PR, Eller MA, Wahl SM, Boulware DR., Manabe YC, Janoff EM. Cellular immune activation in cerebrospinal fluid from ugandans with cryptococcal meningitis and immune reconstitution inflammatory syndrome. *The Journal of infectious diseases*, 211: 1597–606, 2015
- Gazzoni AF, Pegas KL, Severo LC. Técnicas histopatológicas no diagnóstico de criptococose por *Cryptococcus* deficiente de cápsula: relato de caso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 41: 76–78, 2008
- Gomes FS, sarmento DN, Santo EPTE, Silva SHM. Quimiotipagem e caracterização fenotípica de *Cryptococcus* isolados em Belém, Estado do Pará, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. 1: 43–49, 2010.
- Klepser ME, Ernst EJ, Ernst ME, Pfaffer MA. Growth medium effect on the antifungal activity of LY 303366.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 29: 227–231, 1997.

Klepser ME, Ernst EJ, Ernst ME, Pfaller MA . Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 42: 1207–12, 1998.

Luo G, Samaranayake LP, Yau JYY. Candida species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 2971–2974, 2001.

Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *American Society for Microbiology*, 8: 515–548, 1995

Padalia RC, Verma RS, Chanotiya CS, Yadav A. Chemical fingerprinting of the fragrant volatiles of nineteen Indian cultivars of *Cymbopogon spreng*. (Poaceae). *Records of Natural Products*, 5: 290–299, 2011.

Paliwal DK, Randhawa HS. Evaluation of a simplified *Guizotia abyssinica* seed medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 7: 346–348, 1978.

Price MF, Wilkinson AND, Gentry LO. Plate Method for Detection of Phospholipase Activity in *Candida Albicans*. *Sabouraudia*. 20: 7–14, 1982.

Ravikant KT, Gupte S, Kaur M. A Review on Emerging Fungal Infections and Their Significance. *J. Bacteriol. Mycol*, 1: 9–11, 2015

Rüchel R, Tegeler R, Trost M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *candida albicans*. *Medical Mycology*, 20: 233–244, 1982.

Saag MS, Graybill JR, Larsen RA, Pappas PG, Perfect, J R, Powderly WG, Sobel JD, Dismukes WE Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious Diseases Society of America. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious. *Diseases Society of America*, 30: 710–718, 2000.

Severo CB, Gazzoni AF, Severo LC. Criptococose pulmonar. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 35; 1136–1144, 2009.

Steinbach WJ , Reedy JL, Cramer RA , Perfect JR, Heitman J. Harnessing calcineurin as a novel anti-infective agent against invasive fungal infections. *Nature reviews. Microbiology* , 5: 418–430, 2007.

Zaragoza O, Casadevall A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biological procedures online*, 6: 10–15, 2004.

PRINCIPAIS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E DE AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE *Candida* sp.

Data de aceite: 01/06/2020

Data de submissão: 29/04/2020

Regiane Nogueira Spalanzani

Universidade Federal do Paraná, Departamento
de Análises Clínicas.

Curitiba, PR.

<http://lattes.cnpq.br/3073595609161469>

**Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos-
Weiss**

Universidade Federal do Paraná. Departamento
de Análises Clínicas.

Curitiba, PR.

<http://lattes.cnpq.br/2824121047365672>

RESUMO: Em indivíduos saudáveis, leveduras do gênero *Candida* fazem parte da microbiota gastrointestinal e genitourinária. Entretanto, em condições favoráveis, estes podem resultar em infecções fúngicas. Devido às diversas manifestações clínicas e dificuldades no diagnóstico e tratamento, as infecções fúngicas representam uma das infecções mais importantes entre pacientes hospitalizados e imunocomprometidos. Apesar de *Candida albicans* ser a principal espécie associada às infecções fúngicas, houve um aumento na incidência de espécies *Candida* não-*albicans*,

como *C. glabrata* e *C. krusei*, relatadas como menos sensíveis aos antifúngicos. Visto que o tratamento antifúngico varia de acordo com a espécie, a rápida identificação e a avaliação do perfil de susceptibilidade antifúngica podem auxiliar no manejo clínico do paciente com infecção, além de contribuir para o monitoramento de espécies resistentes. O objetivo deste trabalho foi descrever os principais métodos de identificação fenotípica e de avaliação da susceptibilidade antifúngica e, apresentar um fluxograma de orientação visando o rápido diagnóstico em casos de suspeita de infecções invasivas por *Candida* sp. Entre os métodos de identificação fenotípica, destacam-se os métodos convencionais, ágares cromogênicos e os métodos automatizados, como o MALDI-TOF-MS. Apesar das vantagens da realização do teste de susceptibilidade antifúngica, o teste não é realizado com frequência na rotina laboratorial. A partir da padronização da avaliação da susceptibilidade antifúngica publicada pelo CLSI (*Clinical and Laboratorial Standards Institute*), diversos métodos foram desenvolvidos para reduzir custos, facilitar e adequar a rotina laboratorial, tais como o E-test, Sensititre YeastOne e Vitek 2.

PALAVRAS-CHAVE: Infecções fúngicas, *Candida* sp., Susceptibilidade antifúngica.

MAIN METHODS OF LABORATORY DIAGNOSIS AND ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY

EVALUATION OF CANDIDA SP.

ABSTRACT: In healthy individuals, yeasts of the genus *Candida* are part of the gastrointestinal and genitourinary microbiota. However, under favorable conditions, it can result in fungal infections. Due to the diverse clinical manifestations and to the difficulties in diagnosis and treatment, fungal infections represent one of the most important infections among hospitalized and immunocompromised patients. Although *Candida albicans* is the main species associated with fungal infections, there was an increase in the incidence of non-*Candida albicans* species, such as *C. glabrata* and *C. krusei*, reported as less sensitive to antifungal agents. Since the antifungal treatment varies according to the species, the rapid identification and the antifungal susceptibility profile evaluation can help in the clinical management of the infected patient, besides contributing to the monitoring of resistant species. The objective of this work was to describe the main methods of phenotypic identification and evaluation of antifungal susceptibility and to present an orientation flowchart aimed at the rapid diagnosis in cases of suspected *Candida* sp. invasive infections. Among the main phenotypic identification methods, stand out the conventional methods, chromogenic agar and automated methods, as MALDI-TOF-MS. Despite the advantages of performing the antifungal susceptibility test, it's not often performed in a laboratory routine. After the antifungal susceptibility standardization published by CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), several methods have been developed to reduce costs, facilitate and adapt to laboratory routine, such as the E-test, Sensititre YeastOne and Vitek 2.

KEYWORDS: Fungal Infections, *Candida* sp., Antifungal Susceptibility.

1 | INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas são comumente ocasionadas por fungos oportunistas em função de um aumento na sua colonização aliado à baixa imunidade local ou geral do indivíduo, que podem levar a infecções graves com alto risco de mortalidade (PAPPAS et al., 2018). Apresentam diversas manifestações clínicas que dificultam o diagnóstico clínico e laboratorial e, consequentemente, o tratamento do paciente (GIACOMAZZI et al., 2016).

De acordo com Giacomazzi e colaboradores (2016), no Brasil, as infecções fúngicas podem afetar em torno de 3,8 milhões de indivíduos, incluindo infecções recorrentes e infecções invasivas. Entre os pacientes hospitalizados, as infecções fúngicas invasivas representam uma das infecções mais importantes, principalmente em pacientes internados em unidades de tratamento intensivo, devido à alta susceptibilidade e complexidade de outras doenças presentes (SINGH et al., 2016).

Os principais fatores de risco associados às infecções fúngicas invasivas são: o uso de antibióticos de amplo espectro e de imunossupressores, cateteres e instrumentos intravasculares, traqueostomia, cateteres urinários, assim como a infecção por HIV (*human immunodeficiency* vírus) e *diabetes mellitus* (DOI et al., 2016; SINGH et al., 2016; ALFOUZAN et al., 2017.).

As infecções fúngicas invasivas são caracterizadas pela obtenção do fungo a partir de cultura de sangue ou outra amostra estéril acompanhada de sinais de infecção (PAPPAS et al., 2018). A maioria destas infecções são causadas por espécies do gênero *Candida* (SINGH et al., 2016; SIQUEIRA et al., 2018). Leveduras do gênero *Candida* fazem parte da microbiota gastrointestinal e geniturinária de indivíduos saudáveis (ALFOUZAN et al., 2017). Entretanto, as espécies de *Candida* são patógenos oportunistas que em condições favoráveis podem causar infecções fúngicas, principalmente em pacientes imunocomprometidos ou hospitalizados, assim como em pacientes com doenças degenerativas ou neoplásicas (PUIG et al., 2017; SIQUEIRA et al., 2018). No Brasil, estima-se que em torno de 74% das infecções fúngicas sejam causadas por *Candida* sp. (GIACOMAZZI et al., 2016).

Apesar de *Candida albicans* ser a espécie frequentemente associada a infecções fúngicas, tem sido relatado um aumento na incidência de espécies *Candida* não-*albicans* (CNA), tais como *C. glabrata* e *C. krusei*, intrinsecamente menos sensíveis aos azois (QUINDÓS et al., 2014; SINGH et al., 2016; GONZÁLEZ-LARA et al., 2017; SIQUEIRA et al., 2018).

Em um estudo multicêntrico retrospectivo realizado por Doi e colaboradores (2016) em 5 regiões diferentes no Brasil, de 2007 a 2010, as espécies CNA representaram 65,7% do total de espécies de *Candida* isoladas em casos de infecção invasiva. O aparecimento de espécies CNA com menor susceptibilidade a diversos antifúngicos destaca a importância da rápida identificação da espécie de *Candida* e do estudo do perfil de susceptibilidade em pacientes hospitalizados e imunocomprometidos devido à alta mortalidade associada (PUIG et al., 2017).

A identificação laboratorial de *Candida* sp. pode ser realizada por métodos convencionais, sorológicos e espectrometria de massa, assim como métodos moleculares tais como RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) e RAPD (*randomly amplified polymorphic DNA*) (ALAM et al., 2014).

Com a emergência de espécies resistentes aos antifúngicos disponíveis, a determinação do perfil de susceptibilidade torna-se cada vez mais importante e, com isso, a partir da padronização do teste de susceptibilidade antifúngica para leveduras pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), novos métodos automatizados e semi-automatizados foram desenvolvidos para simplificar e diminuir custos do procedimento (CUENCA-ESTRELLA et al., 2010).

Métodos de identificação e avaliação da susceptibilidade *in vitro* auxiliam o manejo

clínico de pacientes com infecção, como também contribuem para o monitoramento da epidemiologia de espécies resistentes (SIQUEIRA et al., 2018). Apesar da disponibilidade de diversos antifúngicos, o risco de mortalidade varia de 30 a 70%, sendo a principal causa o diagnóstico tardio (GONZÁLEZ-LARA et al., 2017). Assim, são necessários métodos apropriados e mais rápidos de identificação da espécie de *Candida* e a avaliação da susceptibilidade antifúngica para definir o tratamento antifúngico adequado.

2 | OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi descrever os principais métodos de identificação e de avaliação da susceptibilidade antifúngica de espécies de *Candida* e ressaltar os métodos mais indicados para estes processos. Além disso, propor um fluxograma de orientação para o correto e rápido diagnóstico em casos de suspeita de infecção por *Candida* sp.

3 | METODOLOGIA

O levantamento bibliográfico foi realizado através de publicações sobre os principais métodos de identificação de *Candida* sp. e de avaliação da susceptibilidade antifúngica, mediante consulta às bases de dados Medline PubMed (*US. National Library of Medicine National Institutes of Health*), ScienceDirect (Elsevier), SpringerLink (Springer) e SciELO (*Scientific Electronic Library Online*).

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO

Após a obtenção de colônias puras de leveduras, sem contaminação bacteriana ou com mais de uma espécie, deve-se realizar o repique em meio de cultura ASD (ágar Sabouraud-Dextrose) para sua identificação. O ASD é comumente utilizado nos laboratórios de micologia por ser relativamente barato e permitir o crescimento e isolamento das leveduras (ANVISA, 2013). Os testes fenotípicos são comumente utilizados para identificação das diferentes espécies de *Candida* na rotina laboratorial, com base na morfologia, fisiologia e propriedades bioquímicas. Entretanto, os resultados obtidos são presuntivos, sendo necessário mais de um teste para que a identificação seja precisa (NEPPELENBROEK et al., 2014).

Para espécies do gênero *Candida*, os métodos de identificação mais comuns são: pesquisa de tubo germinativo e microcultivo em ágar fubá + tween 80 (ANVISA, 2013), além disso, a ANVISA destaca o uso de ágares cromogênicos para isolamento e identificação

presuntiva de *Candida* sp.

4.1.1 4Métodos Convencionais

Os testes convencionais de identificação são baseados nas características morfológicas e fisiológicas, e podem levar de 24 a 48h, ou até mais, para completa identificação (ALAM et al., 2014). São incluídos neste grupo os testes: pesquisa de tubo germinativo, microcultivo em ágar fubá + tween 80 e auxanograma (prova de assimilação de açúcares) (LACAZ et al., 2002; DEORUKHKAR et al., 2018).

A pesquisa do tubo germinativo é baseada na detecção de projeções da levedura sem constrição no ponto de inserção da célula, denominada tubo germinativo, produzido por *Candida albicans* ao ser incubado com soro humano por 2h a 37°C (NEPPELENBROEK et al., 2014; DEORUKHKAR et al., 2018). Este teste é considerado simples, econômico, eficiente e permite a rápida diferenciação de *C. albicans* de espécies CNA. Entretanto, este teste nem sempre é preciso visto que em torno de 5% das cepas de *Candida albicans* podem não produzir tubo germinativo, enquanto espécies como *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* também podem produzir (ALAM et al., 2014).

As características morfológicas de hifas e pseudo-hifas, assim como a formação de clacidiosporos, podem ser observadas ao inocular a levedura em ágar fubá + tween 80. Por ser um meio de cultura límpido, o ágar fubá permite a visualização das características morfológicas diretamente no microscópio (LACAZ et al., 2002), o que torna possível a diferenciação das espécies de *Candida*. Além disso, a adição de tween 80 (polissorbato) no meio de cultura facilita a formação de clacidiosporos, hifas e pseudo-hifas (DEORUKHKAR et al., 2018). Apesar de ser um método relativamente de baixo custo, está em desuso para identificação de espécies de *Candida*, sendo mais utilizado para identificação de fungos filamentosos.

Devido a capacidade de *Candida* sp. assimilar um carboidrato específico como única fonte de carbono, é possível realizar a identificação da espécie por meio da prova de assimilação de carboidratos (DEORUKHKAR et al., 2018). Este teste utiliza um meio de cultura à base de nitrogênio que permite o crescimento de leveduras após a adição e difusão local de açúcar no meio. A assimilação de carboidrato é verificada se houver halo produzido ao redor do local onde o açúcar foi adicionado (NEPPELENBROEK et al., 2014). Apesar da simplicidade, este método é demorado, sendo necessário até 72h de incubação para avaliação dos resultados.

Algumas espécies podem ser facilmente confundidas no momento da identificação. *Candida dubliniensis*, por exemplo, pode ser identificada erroneamente como *C. albicans* devido à produção de clacidiosporos e à capacidade de formar tubo germinativo (DEORUKHKAR et al., 2018). O teste de temperatura poderia ser empregado para a sua diferenciação. É um teste fácil e de baixo custo para a identificação de *C. dubliniensis*,

que apresenta pouco crescimento ou nenhum crescimento a 42°C, enquanto *C. albicans* apresenta bom crescimento nesta temperatura (ALAM et al., 2014; NEPPELENBROEK et al., 2014).

4.1.2 Ágar Cromogênico

Os ágares cromogênicos mais utilizados são: CHROMagar™ *Candida* e CandiSelect-4™. Ambos permitem a diferenciação entre as espécies de *Candida*, tais como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*, baseada na ação de enzimas em diversos substratos cromogênicos, que por sua vez produzem colorações variadas (ZHAO et al., 2016; WOHLMEISTER et al., 2017; DEORUKHKAR et al., 2018).

Este método é considerado simples, apresenta boa especificidade e permite avaliação dos resultados após 24 a 48h de incubação (NEPPELENBROEK et al., 2014). Apesar dos resultados obtidos serem fenotípicos, a identificação é presuntiva, relativamente rápida, e pode favorecer o paciente visto que a terapia inicial pode ser direcionada para a espécie em potencial. Além disso, o uso de ágar cromogênico é importante para detectar coinfecção por mais de uma espécie de *Candida* ou até mesmo evitar mais de uma espécie na mesma amostra durante a avaliação da susceptibilidade (ROSENVINGE et al., 2012; ZHAO et al., 2016).

4.1.3 Métodos Semi-Automatizados

Entre os sistemas semi-automatizados destacam-se os sistemas API *Candida* e o sistema AUXACOLOR, ambos relatados como sistemas comerciais simples, de rápida e precisa identificação de espécies de *Candida* (CAMPBELL et al., 1999).

O sistema API Candida consiste na utilização de uma tira de plástico descartável que contém 10 poços para a realização de 12 testes bioquímicos e colorimétricos: 5 testes de assimilação de açúcares e 7 testes enzimáticos. A inoculação baseia-se na reidratação dos substratos nos poços com a suspensão da amostra. Após 18 a 24h de incubação, os resultados são lidos e é obtido um perfil numérico com 4 dígitos que variam de acordo com as reações enzimáticas produzidas, e assim, um *software* disponibilizado pelo fabricante realiza a identificação (CAMPBELL et al., 1999).

Quanto ao sistema AUXACOLOR, consiste basicamente de uma microplaca de plástico descartável com 16 poços, sendo um o controle negativo. Os poços restantes são utilizados para realização dos testes bioquímicos colorimétricos. São eles: 13 testes de assimilação de açúcares, um teste de resistência a cicloheximida e um teste para detecção da enzima fenol-oxidase. A inoculação é feita com a reidratação dos substratos com a suspensão da amostra e, em seguida, incubados por 24 a 48h. Os resultados obtidos são lidos de acordo o perfil de dígitos numéricos obtidos comparados com a lista de referência disponibilizada pelo fabricante (CAMPBELL et al., 1999).

Podem ser utilizados na rotina de laboratórios microbiológicos devido à facilidade de realização do procedimento, fácil leitura e o baixo custo por teste (CAMPBELL et al., 1999).

4.1.4 MALDI-TOF-MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry)

Este método é baseado em feixes de laser que ionizam partículas previamente inseridas em uma matriz polimérica. As partículas, por sua vez, atravessam um analisador, atingem um detector e criam um espectro de massa, o qual é comparado com um espectro de referência. O tempo de chegada ao detector (*time of flight*) entre as moléculas ionizadas é diferente, isto é colocado em gráfico gerando diversos picos. Para cada espécie, o detector cria um padrão de picos, denominado espectro de massa. O espectro formado é, então, comparado à espectros de referência, resultando na identificação da espécie (PASTERNAK, 2012; ALAM et al., 2014; PUIG et al., 2017). Entre os sistemas comerciais MALDI-TOF-MS, os mais conhecidos e utilizados pelos laboratórios clínicos são: MALDI-Sepsityper, MALDI-Biotyper e Vitek-MS™. No Brasil, apenas o sistema MALDI-Sepsityper não está registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2018) e, portanto, não é liberado para uso.

Em estudo realizado por Puig e colaboradores (2017), o sistema Vitek-MS identificou corretamente 89.9% das amostras a nível de espécie e 10.1% a nível de gênero. De acordo com Tran e colaboradores (2015), apesar do alto custo de investimento para obtenção do equipamento, estima-se uma economia de até 51,5% anualmente, incluindo gastos com reagentes, manutenção do equipamento e pessoal técnico.

Devido à rápida identificação, alta sensibilidade e especificidade, os métodos MALDI-TOF-MS podem ser uma boa alternativa frente aos métodos convencionais (ROSENVINGE et al., 2012). Entretanto, Puig e colaboradores (2017) destacam a necessidade de aprimorar estudos com espécies menos frequentemente encontradas, como *C. lusitaniae*, assim como espécies do complexo *C. parapsilosis*. Além disso, erros na identificação de espécies fenotipicamente semelhantes, como *C. albicans* e *C. dubliniensis*, têm sido relatados na literatura, sendo necessário utilizar outro método para diferenciação (HOF et al., 2012).

Bal e McGill (2018) associaram a rápida identificação de espécies de *Candida* com a melhora da resposta no tratamento antifúngico, visto que, dependendo da espécie identificada, o perfil de susceptibilidade antifúngica é previsível. Assim, o tratamento adequado é administrado rapidamente, o que leva à redução da mortalidade.

4.1.5 Métodos Automatizados

Nos últimos anos, foram desenvolvidos diversos métodos automatizados para utilização em laboratórios microbiológicos, como o sistema Vitek YBC (Yeast Biochemical Card), Vitek 2 ID-YST e o sistema BD Phoenix Yeast ID, ambos desenvolvidos para acelerar a identificação de leveduras de interesse clínico (MARUCCO et al., 2018). O sistema BD Phoenix Yeast ID utiliza painéis que realizam testes bioquímicos de fermentação, oxidação, degradação e hidrólise de vários substratos, incluindo substratos cromogênicos e fluorogênicos, além de substratos que contêm apenas uma fonte de carbono.

De acordo com Posteraro e colaboradores (2013), os resultados do sistema BD Phoenix são disponibilizados entre 4 a 12h, enquanto o sistema de identificação Vitek 2 ID-YST leva até 18h para liberação, o que permite economia de tempo de 6 até 14h quando o sistema BD Phoenix é utilizado em vez do sistema Vitek 2.

A identificação pelo sistema BD Phoenix é uma alternativa efetiva para laboratórios que não possuem a tecnologia MALDI-TOF-MS por permitir rapidez e confiabilidade na identificação de leveduras na rotina laboratorial (POSTERARO et. al., 2013; MARUCCO et al., 2018).

4.2 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA

Devido ao aumento das infecções fúngicas e à emergência da resistência às drogas antifúngicas, os testes de susceptibilidade tem se tornado cada vez mais importantes (SIQUEIRA et al., 2018). Apesar da existência de um método padronizado, métodos alternativos de avaliação da susceptibilidade foram desenvolvidos com o objetivo de diminuir o tempo de procedimento e de liberação dos resultados.

4.2.1 *Microdiluição em caldo*

Entre os diversos métodos disponíveis, a microdiluição em caldo padronizada e publicada pelo CLSI em 2008, é o padrão-ouro para avaliação da susceptibilidade antifúngica de *Candida* sp. Este teste permite avaliar o crescimento de espécies de *Candida* em diferentes concentrações de antifúngicos preparadas por diluições seriadas. A menor concentração que inibe ou diminui em até 50% do crescimento fúngico comparado ao controle, sem antifúngico, é determinada de concentração inibitória mínima (CIM).

As etapas são realizadas manualmente, divididas principalmente entre preparação das diluições dos antifúngicos e soluções a serem utilizadas, preparo do inóculo, leitura e interpretação da CIM (SIQUEIRA et al., 2018). A leitura da CIM é subjetiva se realizada visualmente, porém, para contornar essa desvantagem, a inibição do crescimento fúngico pode ser avaliada em espectrofotômetro e quantificada em porcentagem em relação ao crescimento controle (PAPPAS et al., 2018).

A microdiluição em caldo é um excelente teste para determinar o perfil de susceptibilidade de *Candida* sp. e, principalmente, para identificar espécies resistentes

(PAPPAS et al., 2018). Entretanto, por apresentar custo elevado e por demandar tempo, não é frequentemente utilizada nos laboratórios microbiológicos. Além disso, nem todos os antifúngicos estão disponíveis comercialmente.

A partir da padronização realizada pelo CLSI, métodos comerciais automatizados e semi-automatizados foram desenvolvidos com o objetivo de simplificar a avaliação da susceptibilidade antifúngica, além de diminuir custos e permitir a obtenção de resultados mais rápidos (CUENCA-ESTRELLA et al., 2010). Entre os métodos desenvolvidos, destacam-se os métodos E-test, Vitek 2 e Sensititre YeastOne.

4.2.2 E-test

Apesar da padronização da microdiluição em caldo pelo CLSI, muitos laboratórios não realizam a avaliação da susceptibilidade antifúngica na rotina em função da metodologia ser trabalhosa e demorada. Com princípio similar ao método de difusão em disco, o E-test é um método alternativo que permite avaliar a susceptibilidade antifúngica de maneira prática e menos demorada que o padrão-ouro (ABBES et al., 2012; KUMAR et al., 2015).

O método é baseado no inóculo de uma suspensão da amostra em placa com meio de cultura, seguida da aplicação de uma tira impregnada com concentrações predefinidas e crescentes de um único antifúngico (POSTERARO e SANGUINETTI, 2014). Posteriormente, a placa é incubada a 35°C por 24-48h. O halo formado representa a zona de inibição de crescimento de *Candida* sp. e permite identificar a CIM quando este toca na fita (SONG et al., 2015).

Entre os meios de cultura utilizados, o Agar Casitona é considerado o melhor meio para E-test por apresentar resultados semelhantes ao método de microdiluição em caldo. Entretanto, o meio de cultura com melhor reproduzibilidade interlaboratorial e recomendado para esta metodologia é o meio RPMI 1640 (ABBES et al., 2012).

Entre os antifúngicos disponíveis destacam-se o posaconazol, a anfotericina B, o fluconazol, o itraconazol, o voriconazol e a caspofungina (ABBES et al., 2012; KUMAR et al., 2015).

Por apresentar uma metodologia mais simples, rápida e com resultados compatíveis com o método de microdiluição em caldo, o E-test pode ser uma alternativa ao padrão-ouro (KOGA-ITO et al., 2008; POSTERARO & SANGUINETTI, 2014; KUMAR et al., 2015; SONG et al., 2015). Entretanto, a subjetividade é inevitável na leitura da CIM obtida e nem todos os antifúngicos estão disponíveis para esta metodologia (PAPPAS et al., 2018).

4.2.3 Sensititre YeastOne

Baseado na microdiluição em caldo, o Sensititre YeastOne é um método colorimétrico comercial, que dispõe placas de 96 poços com diversos antifúngicos em diferentes concentrações juntamente com o indicador colorimétrico de crescimento, alamarBlueTM (Thermo Fisher), ambos liofilizados (ABBES et al., 2012; POSTERARO & SANGUINETTI,

2014).

Entre os antifúngicos disponíveis neste teste, destacam-se: fluconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol, anidulafungina, caspofungina e micafungina (PFALLER et al., 2004; PFALLER et al., 2008). Comercialmente, é possível adquirir placa com 8 antifúngicos: 5-flucitosina, anfotericina B, caspofungina, cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol (ABBES et al., 2012). Além desta opção, é disponibilizado também placa com anidulafungina e micafungina.

O procedimento baseia-se na reidratação do liofilizado com a suspensão da levedura a ser identificada. Em seguida, a placa é selada e incubada por 24h a 35°C. A leitura da CIM é feita visualmente ao verificar a alteração da cor azul para rosa, se houver crescimento fúngico nos poços das placas (SIQUEIRA et al., 2018). Por ser relativamente mais rápido de executar e de alta correlação com o padrão-ouro (PFALLER et al., 2004; PFALLER, et al., 2008), o Sensititre YeastOne pode ser um método alternativo para avaliação da susceptibilidade antifúngica. Entre as desvantagens, destaca-se a subjetividade do analisador na interpretação da CIM e possíveis variações de temperatura no armazenamento, além de poucos antifúngicos disponíveis (PAPPAS et al., 2018).

4.2.4 Método Automatizado

Comumente utilizados nos laboratórios de microbiologia, o Vitek 2 é um sistema comercial automatizado que, por meio da espectrofotometria, detecta crescimento fúngico, realiza a identificação e a determinação da CIM simultaneamente (CUENCA-ESTRELLA et al., 2010). Este método requer pouca manipulação da amostra. A leitura do resultado é automaticamente determinada e interpretada pelo *software* do sistema. Apesar da facilidade de realizar o procedimento, este método permite avaliação de somente três diluições no teste de susceptibilidade antifúngica (SIQUEIRA et al., 2018). Em estudo sobre comparação da susceptibilidade antifúngica de *Candida* sp., Alfouzan e colaboradores (2017) destacaram que o sistema Vitek 2 pode substituir o E-test, o que permite a avaliação *in vitro* da susceptibilidade antifúngica mais rapidamente.

Segundo González-Lara e colaboradores (2017), os resultados obtidos na avaliação da susceptibilidade antifúngica realizada no Vitek 2 são semelhantes ao método de microdiluição em caldo do CLSI. O mesmo foi destacado por Cuenca-Estrella e colaboradores (2010) ao encontrar alta correlação com o CLSI, estatisticamente significativa ($p < 0.01$). Além disso, o método direto Vitek 2 identifica com precisão a maioria das espécies de *Candida* e pode reduzir tempo (13h a 18h) de obtenção dos resultados preliminares (GONZÁLEZ-LARA et al., 2017).

4.3 FLUXOGRAMA

Conforme revisão de literatura realizada e o que foi apresentado neste trabalho,

propomos um fluxograma para auxiliar e direcionar o profissional do laboratório em casos de suspeita de infecção por *Candida* sp., visando o rápido diagnóstico em infecções invasivas. A partir de colônias isoladas em ágar Sabouraud Dextrose, recomenda-se realizar repique em ágar cromogênico, visto que este permite uma identificação presuntiva da espécie de *Candida*, e partir para identificação e avaliação da susceptibilidade antifúngica. Os ágares cromogênicos, como o CHROMagar® *Candida*, permitem a visualização de múltiplas espécies em casos de coinfecção e auxiliam no direcionamento do tratamento antifúngico inicial a partir da espécie identificada. A recomendação proposta neste trabalho é apresentada na **Figura 1**.

Entre os métodos automatizados recomenda-se o Vitek 2, visto que este realiza ambos os testes: de identificação fenotípica e de avaliação da susceptibilidade antifúngica. Já para metodologias não automatizadas, recomenda-se identificação da espécie por métodos convencionais e, para avaliar a susceptibilidade antifúngica, recomenda-se a utilização do método Sensititre YeastOne, devido maior praticidade e simplicidade da técnica.

Os métodos convencionais representam um marco na identificação de *Candida* sp. Apesar de demandarem em torno de 72h para obtenção de resultados, estes métodos são comumente utilizados na rotina com o auxílio das novas metodologias para diagnóstico complementar. Em razão das limitações dos testes convencionais, diferentes métodos comerciais foram desenvolvidos para facilitar a identificação de espécies de *Candida*.

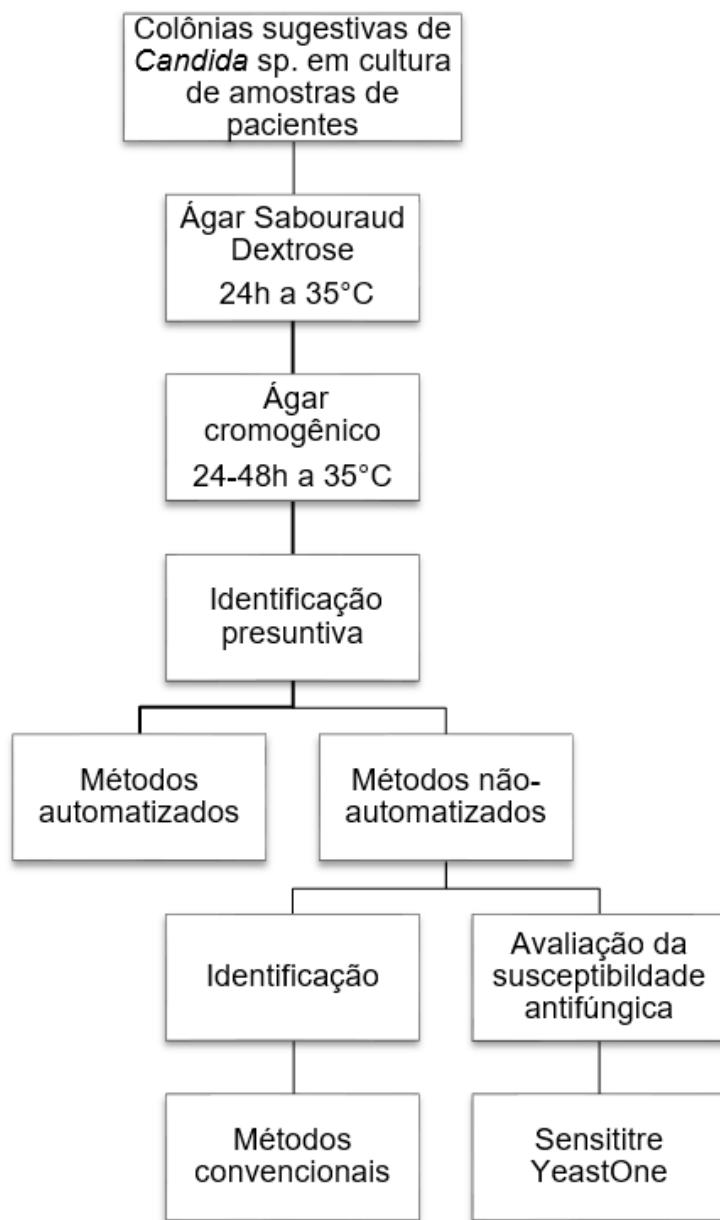


Figura 1 – FLUXOGRAMA DE RECOMENDAÇÃO PARA DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES INVASIVAS POR ESPÉCIES DE *CANDIDA*

De acordo com a demanda, o método MALDI-TOF-MS é uma excelente alternativa para identificação visto que permite rápida obtenção dos resultados, além de ser de fácil execução e interpretação. O custo para obtenção do equipamento é elevado, entretanto, o valor por teste realizado é bem reduzido, tornando-o um método com excelente custo-benefício. Apesar das vantagens do método, vale ressaltar a importância de se realizar ao menos um teste complementar para identificação.

A microdiluição em caldo ainda é o padrão-ouro para avaliação da susceptibilidade antifúngica de *Candida* sp., porém, por ser trabalhoso e de maior custo, não é o método de escolha nos laboratórios de microbiologia. Entre os diversos métodos existentes para teste de susceptibilidade antifúngica, o método Sensititre YeastOne é uma alternativa simples, prática e de rápida execução para ser utilizada na rotina.

Os métodos automatizados apresentam os melhores resultados em relação à

rapidez, precisão e acurácia na obtenção de resultados de identificação e avaliação da susceptibilidade antifúngica. É o método de escolha na maioria dos laboratórios clínicos devido sua praticidade e facilidade de manuseio.

5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

A rápida identificação da espécie de *Candida*, especialmente em hemocultura, pode auxiliar no manejo clínico da infecção e permitir a melhor escolha de tratamento, principalmente em pacientes com elevado risco de desenvolver infecção fúngica invasiva. Entretanto, a identificação precisa ser específica, pois erros de identificação podem resultar em terapia imprópria visto que a susceptibilidade é baseada na espécie identificada.

Devido ao elevado número de infecções por *Candida* sp. em pacientes hospitalizados, ao aumento na incidência de espécies resistentes aos antifúngicos e ao alto risco de mortalidade associado, destaca-se a importância da realização dos testes de susceptibilidade antifúngica. Estes testes não são realizados na rotina dos laboratórios de microbiologia devido ao alto custo e tempo de procedimento.

Com o objetivo de adequar o tratamento antifúngico e reduzir o risco de mortalidade em pacientes suscetíveis, destaca-se a relevância dos estudos de vigilância que permitem o acompanhamento da incidência das espécies resistentes em casos de infecções por *Candida* sp., além de permitirem a elaboração de novas estratégias para a rápida e correta identificação da espécie.

REFERÊNCIAS

ABBES, S.; TRABELSI, H.; AMOURI, I.; SALLEMI, H.; NEJ, S.; FATMA, C.; MAKNI, F; AYADI, A. **Méthodes d'étude de La sensibilité in vitro de Candida spp. aux antifongiques. Annales de Biologie Clinique.** v. 70, n. 6, p. 635-642, 2012.

ALAM, M. Z.; ALAM, Q.; JIMAN-FATANI, A.; KAMAL, M. A.; ABUZENADAH, A. M.; CHAUDHARY, A. G.; AKRAM, M.; HAQUE, A. **Candida identification: a journey from conventional method to molecular methods in medical mycology.** World Journal of Microbiology and Biotechnology. v. 30, n. 5, p. 1437-1451, 2014.

ALFOUZAN, W.; AL-ENEZI, T.; ALROOMI, E.; SANDHYA, V.; CHANDY, R.; KHAN, Z. U. **Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with Etest using clinical isolates of Candida species.** Revista Iberoamericana de Micología. v. 34, n. 3, p. 171-174, 2017.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consultas. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/>>. Acesso em: 20 set. 2018.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde.** Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica – Brasília: Anvisa, 2013.

BAL, A. M. & MCGILL, M. **Rapid species identification of Candida directly from blood culture broths by Sepsityper-MALDI-TOF mass spectrometry: impact on antifungal therapy.** Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh. v. 48, n. 2, p. 114-119, 2018.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing Yeasts. Approved standard-M27-A3.** Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

CAMPBELL, C. K.; DAVEY, K. G.; HOLMES, A. D.; SZEKELY, A.; WARNOCK, D W. **Comparison of the API Candida System with the AUXACOLOR System for Identification of Common Yeast Pathogens.** Journal of Clinical Microbiology. v. 37, n. 3, p. 821-823, 1999.

CUENCA-ESTRELLA, M.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; BERNAL-MARTINEZ, L.; CUESTA, M.; BUITRAGO, M. J.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. **Comparison of the Vitek 2 Antifungal Susceptibility System with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and Etest Techniques for In Vitro Detection of Antifungal Resistance in Yeast Isolates.** Journal of Clinical Microbiology. v. 48, n. 5, p. 1782-1786, 2010.

DEORUKHKAR, S. C. & ROUSHANI, S. **Identification of Candida Species: Conventional Methods in the Era of Molecular Diagnosis.** Annals of Microbiology and Immunology. v. 1, n. 1:1002, 2018.

DOI, A. M.; PIGNATARI, A. C. C.; EDMOND, M. B.; MARRA, A. R.; CAMARGO, L. F. A.; SIQUEIRA, R. A.; MOTA , V. P. da; COLOMBO, A. L. **Epidemiology and Microbiologic Characterizatin of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program.** PLoS ONE: e0146909, v. 11, n. 1, p.1-9, 2016.

GIACOMAZZI, J.; BEATHGEN, L.; CARNEIRO, L. C.; MILLINGTON, M. A.;DENNING, D. W.; COLOMBO, A. L.; PASQUALOTTO, A. C. **The burden of serious human fungal infections in Brazil.** Mycoses. v. 59, n. 3, p. 145-150, 2016.

GONZÁLEZ-LARA M. F.; TORRES-GONZÁLES, P.; RANGEL-CORDER, A.; SIFuentes-OSORNIO, J.; PONCE-DE-LEÓN, A.; MARTÍNEZ-GAMBOA, A. **Identification and Susceptibility Testing of Candida spp. Directly from yeast-positive blood cultures with Vitek-2.** Diagnostic Microbiology & Infectious Disease, v. 89, n. 3, p. 202-204, 2017.

HOF, H; EIGNER, U.; MAIER, T.; STAIB, P. **Differentiation of Candida dubliniensis from Candida albicans by means of MALDI-TOF mass spectrometry.** Clinical Laboratory. v. 58, n. 9, p. 927-931, 2012.

KOGA-ITO, C. Y.; LYON, J. P.; RESENDE, M. A. **Comparison between E-test and CLSI Broth Microdilution Method for antifungal susceptibility testing of Candida albicans oral isolates.** Revista do Instituto de Medicina Tropical. v. 50, n. 1, p. 7- 10, 2008.

KUMAR, D.; BHATTACHARYYA, S.; GUPTA, P.; BANERJEE, G.; SINGH, M. **Comparative analysis of disc diffusion and E-test with broth micro-dilution for susceptibility testing of clinical Candida isolates against amphotericin B, fluconazole, voriconazole and caspofungin.** Journal of Clinical and Diagnostic Research. v. 9, n. 11, p. 1-4, 2015.

LACAZ, C. S.; PORTO, E. MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica.** 9a ed., São Paulo: Sarvier, 2002.

MARUCCO, A. P.; MINERVINI, P.; SNITMAN, G. V.; SORGE, A.; GUELFAND, L. I.; MORAL, L. L.; INTEGRANTES DE LA RED DE MICOLOGIA CABA. **Comparison of the identification results of Candida species obtained by BD PhoenixTM and Maldi- TOF (Bruker Microflex LT Biotyper 3.1).** Revista Argentina de Microbiología. v. 50, n. 4, p. 337-340, 2018.

NEPPELENBROEK, K. H.; SEÓ, R. S.; URBAN, V. M.; SILVA, S.; DOVIGO, L. N.; JORGE, J. H.; CAMPANHA, N. H. **Identification of Candida species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques.** Oral Diseases. v. 20, n. 4, p.329-344, 2014.

PAPPAS, P. G.; LIONAKIS, M. S.; ARENDRUP, M. C.; OSTRYSKY-ZEICHNER, L.; KULLBERG B. J. **Invasive candidiasis.** Nature Reviews Disease Primers. v. 4:18026, 2018.

PASTERNAK, J. **Novas metodologias de identificação de micro-organismos: MALDI- TOF.** Einstein (São Paulo), São Paulo, v. 10, n. 1, p. 118-119, 2012.

PFALLER, M. A.; CHATURVEDI, V.; DIEKEMA, D. J.; GHANNOUM, M. A.; HOLLIDAY, N. M.; KILLIAN, S. B.; KNAPP, C. C.; MESSEY, S. A.; MISKOV, A.; RAMANI, R. **Clinical Evaluation of the Sensititre YeastOne Colorimetric Antifungal Panel for Antifungal Susceptibility Testing of the Echinocandins Anidulafungin, Caspofungin and Micafungin.** Journal of Clinical Microbiology. v. 46, n. 7, p 2155-2159, 2008.

PFALLER, M. A.; ESPINEL-INGROFF, A.; JONES, R. N. **Clinical Evaluation of the Sensititre YeastOne Colorimetric Antifungal Panel for Antifungal Susceptibility Testing of the New Triazoles Voriconazole, Posaconazole, and Ravuconazole.** Journal of Clinical Microbiology. v. 42, n. 10, p 4577-4580, 2004.

POSTERARO, B. & SANGUINETTI, M. **The future of fungal susceptibility testing.** Future Microbiology. v. 9, n. 8, p. 947-967, 2014.

PUIG, C. R. de A.; AGÜERO-BALBÍN, J.; FERNÁNDEZ-MAZARRASA, C.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. **Evaluation of the Vitek-MS™ system in the identification of Candida isolates from bloodstream infections.** Revista Iberoamericana de Micología., 2018, no prelo.

POSTERARO, B.; RUGGERI, A.; DE CAROLIS, E.; TORELLI, R.; VELLA, A.; DE MAIO, F.; RICCIARDI, W.; POSTERARO, P.; SANGUINETTI, M. **Comparative Evaluation of BD Phoenix and Vitek 2 Systems for Species Identification of Common and Uncommon Pathogenic Yeasts.** Journal of Clinical Microbiology. v. 51, v. 11, p. 3841-3845, 2013.

QUINDÓS, G. **Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face.** Revista Iberoamericana de Micología. v. 31, n. 1, p. 42-48, 2014.

ROSENVINGE, F.; DZAJIC, E.; KNUDSEN, E.; MALIG, S.; ANDERSEN, L. B.; LOVIG, A.; ARENDRUP, M.; JENSEN, T.; GAHRN-HANSEN, B.; KEMP, M. **Performance of matrix-assisted laser desorption-time of flight mass spectrometry for identification of clinical yeast isolates.** Mycoses. v. 56, n. 3, p. 229-235, 2012.

SINGH, G.; PITYO, C. W.; ADITIANINGSIH, D.; RUMEND, C. M. **Risk factors for early invasive fungal disease in critically ill patients.** Indian Journal of Critical Care Medicine, v. 20, n. 11, p. 633-639, 2016.

SIQUEIRA, R. A.; DOI, A. M.; CROSSARA, P. P. P.; KOGA, P. C. M.; MARQUES, A. G.; NUNES, F. G.; PASTERNAK, J.; MARTINO, M. D. V. **Evaluation of two commercial methods for the susceptibility testing of Candida species: Vitek 2® and Sensititre YeastOne®.** Revista Iberoamericana de Micología, v. 35, n. 2, p. 83-87, 2018.

SONG, Y. B.; SUH, M. K.; HA, G. Y.; KIM, H. **Antifungal susceptibility Testing with Etest for Candida species Isolated from Patients with Oral Candidiasis.** Annals of Dermatology. v. 27, n. 6; p. 715-720, 2015.

TRAN, A.; ALBIN, K.; KERR, A.; JONES, M.; GILLIGAN, P. H. **Cost savings incurred by implementation of routine microbiological identification by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry.** Journal of Clinical Microbiology. v. 52, n. 8, p. 2473-2479, 2015.

WOHLMEISTER, D.; VIANNA, D. R. B.; HELFER, V. E.; CALIL, L. N.; BUFFON, A.; FUENTEFRIA, A. M.; CORBELLINI, V. A.; PILGER, D. A. **Differentiation of Candida albicans, Candida glabrata, and Candida krusei by FT-IR and chemometrics by CHROMagar™ Candida.** Journal of Microbiological Methods. v. 141, p. 121-125, 2017.

ZHAO, L.; DE HOOG, G. S.; CORNELISSEN, A.; LYU, Q.; MOU, L.; LIU, T.; VATANSHENASSAN, M.; KANG, Y. **Prospective evaluation of the chromogenic medium CandiSelect 4 for differentiation and presumptive identification of non- Candida albicans Candida species.** Fungal Biology. v. 120, p. 173-178, 2016.

SCREENING DE FUNGOS FILAMENTOSOS VOLTADO PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS

Data de aceite: 01/06/2020

Data de submissão: 13/03/2020

Inaiá Ramos Aguiar

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de
Ribeirão Preto – USP
Ribeirão Preto – SP
<http://lattes.cnpq.br/1349514489281803>

Mônica Stropa Ferreira-Nozawa

Vectorcontrol
Vinhedo – SP
<http://lattes.cnpq.br/6646435354431954>

RESUMO: O território brasileiro apresenta uma ampla biodiversidade biológica, especialmente de fungos filamentosos, microrganismos cujo potencial para pesquisas biotecnológicas é enorme pois são excelentes produtores de enzimas. Dentre elas, podemos destacar as pectinases, que são enzimas que degradam pectina, componente da parede celular de vegetais. Indústrias como as alimentícias, têxteis, de papel, de biocombustíveis etc. precisam degradar a pectina da matéria prima de seus produtos, porém o alto custo de produção de enzimas pectinolíticas é o maior obstáculo para a comercialização das mesmas, portanto a substituição de métodos tradicionais

de produção, por fungos filamentosos pode aumentar a eficiência de produção da enzimas, bem como diminuir seus custos. Além da alta taxa de produção enzimática dos fungos filamentosos, estes organismos podem se utilizar de resíduos agroindustriais como fonte de carbono para seu crescimento. No presente artigo foram selecionados fungos filamentosos bons produtores de pectinases e seu meio de cultivo foi otimizado utilizando-se resíduos agroindustriais como fonte de carbono, visando uma alta produção de pectinases de forma sustentável e a baixo custo.

PALAVRAS CHAVE: Bioprospecção, fungos filamentosos, pectinases, *Aspergillus*, enzimas.

FILAMENTOUS FUNGI SCREENING AIMING ENZYME PRODUCTION

ABSTRACT: Brazilian territory has a wide biological biodiversity, especially of filamentous fungi, microorganisms whose potential for biotechnological researches is huge, because they are excellent enzyme producers. Among them, there are pectinases, which degrades pectin, a vegetable cell wall component. Food, textiles, paper and biofuels industries, for example, need to degrade pectin from raw materials of their products, however, the high

cost of pectinase production is the biggest obstacle to their commercialization, therefore the replacement of traditional methods by filamentous fungi, to produce pectinolytic enzymes, can be more efficient and reduce its cost. In addition to the high rate of filamentous fungi enzyme production, these organisms can use agro-industrial wastes as carbon source for their growth. In this article, filamentous fungi, good pectinase producers, were selected and their culture medium was optimized using agro-industrial wastes, aiming the highest and sustainably pectinase production, with a low cost.

KEYWORDS: Bioprospection, filamentous fungi, pectinases, *Aspergillus*, enzyme.

REVISÃO

1 | FUNGOS FILAMENTOSOS

Devido a condições climáticas, o Brasil apresenta uma das maiores biodiversidades do planeta, incluindo a dos fungos que podem ser encontrados facilmente em diversos ecossistemas e habitats (PEREIRA *et al.*, 2017). Apesar da ampla diversidade de espécies fungos, apenas uma parcela de 6,6% das 1.500.000 estimadas estão descritas na literatura, das quais cerca de 13.800 podem ser encontradas no Brasil (KIRK *et al.* 2008; LEWINSOHN & PRADO 2006).

A maioria dos fungos são filamentosos e sua morfologia é uma das mais diversas. São organismos multicelulares e apesar de seres microscópicos, podem ser vistos a olho nu devido seus extensos filamentos chamados de hifas (**Figura 1**). Essas hifas são o suporte dos conidióforos que liberam esporos e a organização em trama desses filamentos forma o micélio (estrutura vista a olho nu) (KAVANAGH, 2005; RAVEN *et al.*, 2013).

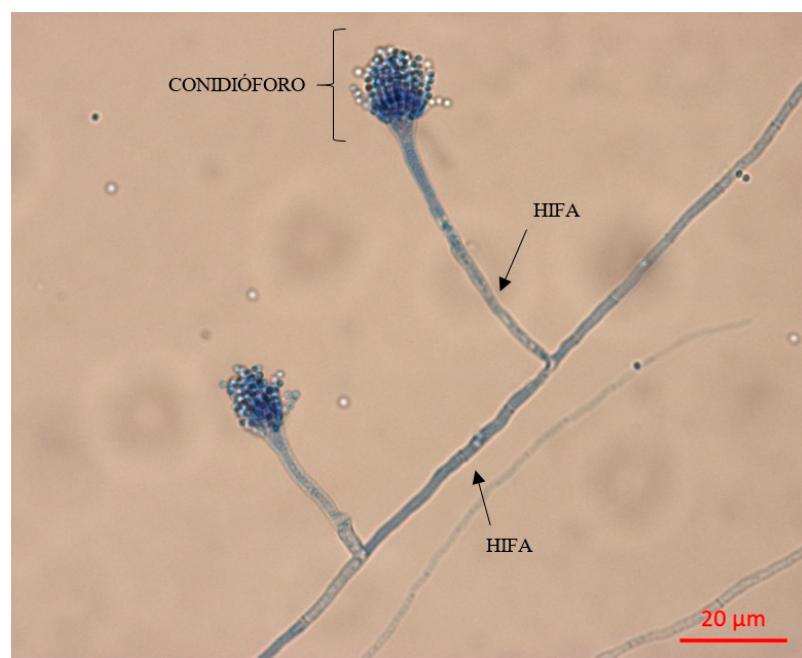


Figura 1: Conidióforos e hifas do fungo *Aspergillus thermomutatus*, também denominado *Neosartorya pseudofischeri*. (Foto: Inaiá Ramos Aguiar)

A fisiologia dos fungos tem grande impacto no meio ambiente, nas indústrias e saúde humana. Do ponto de vista ecológico, os processos bioquímicos da natureza não aconteceriam sem a participação dos fungos como decompositores primários de materiais orgânicos (BENASSI & ALMEIDA, 2019). Eles são organismos heterótrofos, porém sua parede celular constituída de quitina impede a entrada de alimentos na célula por fagocitose, portanto, fungos devem absorver nutrientes simples e solúveis através da membrana plasmática. Para tal, estes secretam enzimas que degradam polímeros complexos até se tornarem simples e solúveis na membrana (DEACON, 2013).

Os fungos são facilmente cultivados em laboratório por apresentarem rápido crescimento, simplicidade de composição, serem de fácil manuseio, ocuparem pouco espaço e as condições de cultivo podem ser facilmente controladas (DESAGIACOMO, 2014). Devido a essas características, o potencial industrial dos fungos filamentosos tem estimulado diversas pesquisas, mas principalmente visando desenvolvimento de processos de fermentação em larga escala e purificação de enzimas (**Figura 2**) (BASSANI & ALMEIDA, 2019). Bioprospecção é a pesquisa por microrganismos com potencial uso econômico e eventual desenvolvimento tecnológico, de forma legal e sustentável (SACCARO & NILO, 2011).



Figura 2: Aplicações industriais de enzimas produzidas por fungos filamentosos. (Imagem: Inaiá Ramos Aguiar).

2 | ENZIMAS

Enzimas são biomoléculas envolvidas em catálise de processos bioquímicos, ou

seja, aumentam a velocidade das reações. Podem tanto decompor moléculas grandes em moléculas menores, como podem construir moléculas maiores a partir de unidades menores, além de catalisarem alterações estruturais. Portanto, todas as reações químicas que ocorrem nos seres vivos dependem da ação de enzimas. Em sua maioria são proteínas, que por sua vez são compostas por aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas (NELSON & COX, 2011).

A atividade enzimática pode ser alterada por diversos fatores, dentre eles: concentração de substratos; temperatura, sendo que cada enzima tem sua temperatura ótima; o pH, no qual as enzimas também apresentam um pH ótimo. São utilizadas como biocatalisadores para produção de alimentos e bebidas, por meio da fermentação microbiana natural, mesmo antes de serem descobertas no século XIX (MÁRQUEZ *et al.*, 2011). Por serem extremamente eficientes e altamente específicas, desde sua descoberta foram utilizadas em processos biotecnológicos como ferramentas promissoras na síntese de compostos de alto valor agregado e até hoje vêm sendo extremamente importantes para processos industriais de biotecnologia (REGINATTO *et al.*, 2017).

O alto custo na produção enzimática é o maior obstáculo para comercialização de novas enzimas, porém a otimização das condições de cultivo e escolha de micro-organismo adequados, pode levar a uma produção enzimática mais eficaz e com redução de custos de produção (MENESES, 2007).

3 | PECTINA E PECTINASES

As células vegetais são aderidas umas às outras pela parede celular, por meio de uma lamela média, constituída principalmente por pectina (LATARULLO *et al.*, 2016). Pectinas são polissacarídeos de alto peso molecular, carregadas negativamente (ROSSI, 2011). São componentes estruturais de plantas (2 a 10% da biomassa) que contribuem para integridade e manutenção desses tecidos, além de participarem da organização estrutural da celulose e hemicelulose (CANTERI *et al.* 2012; LATARULLO *et al.*, 2016).

São complexos coloidais de polissacarídeos ácidos, compostos de resíduos de ácido galacturônico (GalA), unidos por ligações α -1,4 em sua cadeia principal, conhecida como homogalacturonana (HG), que podem estar parcialmente esterificadas, e com ramificações, conhecidas como rhamnogalacturonana I (RG-I) e rhamnogalacturonana II (RG-II). RG-I consiste na repetição de unidades de dissacarídeos de ácido galacturônico e rhamnose. A RG-II tem um suporte estrutural de HG, com cadeias laterais complexas ligadas a resíduos de GalA (**Figura 3**) (RIDLEY *et al.*, 2001).

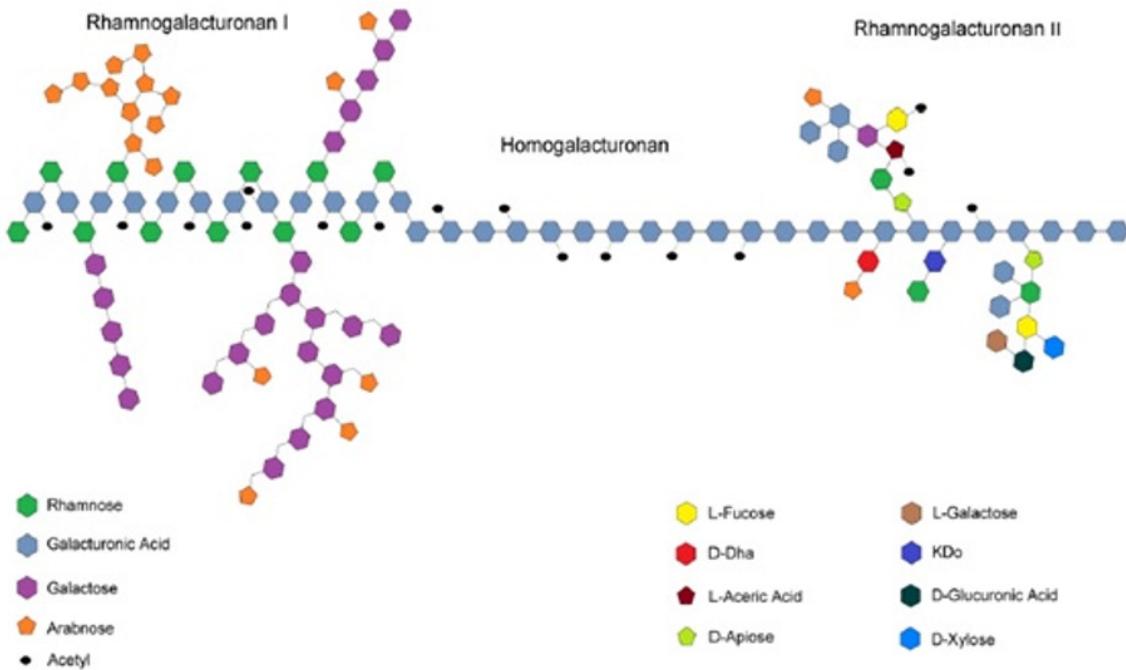


Figura 3: Representação esquemática convencionais da estrutura da pectina (POLIZELI *et al.*, 2013).

De acordo com as modificações nas ligações da cadeia principal, podem ser classificadas em: protopectina, ácido pectínico, ácido péctico e pectina (UENOJO & PASTORE, 2007).

Enzimas pectinolíticas, também conhecidas como pectinases, são utilizadas, principalmente, na indústria alimentícia, na produção de sucos de frutas ou vinho, contribuindo para a redução da viscosidade, de modo a aumentar a eficiência de filtração e clarificação dos mesmos, além de serem usadas nas indústrias têxteis e de papel e recentemente na extração de óleos vegetais (REGINATTO *et al.*, 2017, ORTIZ *et al.*, 2017). Têm ganhado significativa atenção e eficiência de uso para fins tecnológicos, em função de avanços em estudos sobre a natureza dos tecidos vegetais e atualmente quase 5% da produção e vendas de enzimas globais são de pectinases (CATHARINA, 2013; KETIPALLY & RAM, 2018).

4 | O GÊNERO *ASPERGILLUS*

Dentre os diversos fungos filamentosos, os fungos do gênero *Aspergillus* se destacam como um dos mais importantes para a produção de enzimas extracelulares, pois secretam cerca de 90% de suas enzimas produzidas, o que facilita a extração e purificação das mesmas e, além disso, o valor de pH de muitos processos industriais se aproxima ao valor de pH da atividade dos fungos filamentosos, portanto, estes organismos estão intimamente envolvidos em muitas pesquisas biotecnológicas voltadas para processos industriais, principalmente voltadas para o comércio, incluindo as pesquisas voltadas para a produção de pectinases (BENNETT, 2010; REGINATTO *et al.*, 2017; DESAGIACOMO,

JUSTIFICATIVA

O aumento da conscientização ambiental nos últimos anos, principalmente sobre efeitos da poluição industrial, pressionou a indústria e o governo para substituir processos químicos tradicionais por processos biológicos alternativos, envolvendo micro-organismos e enzimas (BHARDWAJ *et al.*, 2017). Os coprodutos agroindustriais representam alternativa viável, tanto no enfoque nutricional como econômico (SILVA *et al.*, 2007).

Uma das aplicações em potencial de resíduos industriais pode ser sua utilização como fonte de carbono em bioprocessos para obtenção de enzimas, entre outros produtos (UENOJO & PASTORE, 2007). Nesse cenário, o Brasil tem um papel proeminente na agricultura, em produção e exportação, principalmente, de café, cana-de-açúcar, soja, frutas e outros produtos que têm grande potencial como fonte de carbono para fungos filamentosos (DAMASIO *et al.*, 2011).

Agroindústrias geram uma enorme quantidade de materiais residuais, cuja deposição no meio causa sérios problemas de poluição. A substituição dos componentes do meio de cultivo por resíduos industriais desencadeia um processo de produção ecologicamente correto e mais econômico, uma vez que se utiliza de matéria que seria descartada e se tornaria poluente para o meio ambiente e ainda substitui substratos químicos de alto custo para produzir produtos químicos como as enzimas.

Pectinases são enzimas utilizadas em indústrias para diversos processos e é vantajoso que exista uma maneira de produzi-las em grande escala, de forma simples e de baixo custo. Fungos são bons produtores dessas enzimas e a extração enzimática, cultivo do fungo e seu armazenamento são processos simples, rápidos e de baixo custo, fazendo com que esses organismos sejam alvo de estudos biotecnológicos.

Os resultados deste artigo permitiram determinar fungos bons produtores de pectinases, os melhores meios de cultivo, tipo de fermentação e condições de pH e temperatura para micro-organismos ainda não descritos na literatura quanto a produção dessas enzimas. Assim pectinases foram produzidas em meios formulados com composição simples, com baixo custo e em quantidades elevadas para futura aplicação biotecnológica. Este estudo envolvendo a produção enzimática utilizando resíduos industriais não só, é um processo que não causa impactos ambientais, como evita poluição por degradação de biomassa residual. Este estudo também visa a associação das pectinases em um coquetel enzimático, que tem como alvo a produção de açucares fermentescíveis a partir da degradação de paredes celulares de bagaço de malte de indústrias cervejeiras artesanais e de bagaço de cana de açúcar, levando a formação de etanol de segunda geração.

REFERÊNCIAS

- BENASSI, V. M.; ALMEIDA, A. **Prospecção de fungos filamentosos termotolerantes e termofílicos de distintos materiais coletados no estado de Minas Gerais e análise de potenciais produtores de amilases.** Unimontes Científica, v. 20, n. 1, p. 150-169, 2019.
- BENNETT, J. W. **An overview of the genus Aspergillus.** Portland: Caister Academic Press, 2010. 238 p.
- BHARDWAJ, V.; DEGRASSI, G.; BHARDWAJ, R. K. **Microbial Pectinases and their applications in industries: A review.** International Research Journal of Engineering and Technology. v. 4, n. 8, p. 829-836, 2017.
- CANTERI, M.H.G.; MORENO, L; WOSIACKI, G.; SCHEER, A. **Pectin: from raw material to the final product,** 22(2), 149-157, 2012.
- CATHARINA, L. M. S. **Avaliação da produção de pectinases por Aspergillus oryzae ipt-301 em processo submerso.** 2013. 89 f. Tese (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul, 2013.
- DAMASIO, A.R; MALLER, A; SILVA, T; JORGE, J.A.; TERENZI H.F; POLIZELI, M.L.T.M. **Biotechnological potential of alternative carbon sources for production of pectinases by Rhizopus microsporus var. rhizopodiformis.** Brazilian Archives of Biology and Technology, 54(1), 141-148, 2011.
- DEACON, J. W. **Fungal biology.** Somerset: Wiley, 371 p., 2013.
- DESAGIACOMO, C. C. V. **Produção, purificação, propriedades funcionais e aplicação de uma poligalacturonase produzida por Neosartorya glabra.** 2014. 101f. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.
- KAVANAGH, K. **Fungi.** Editora Wiley, 1°ed., Chinchester 2005, p. 2-3.
- KETIPALLY, R; RAM, M. R. **Optimization of Pectinase Production by Aspergillus oryzae RR 103.** Current Agriculture Research Journal, v. 6, n. 1, p. 37-44, 2018.
- KIRK P.M.; CANNON P.F.; DAVID J.C.; STALPERS J.A. (eds.) 2008. **Dictionary of the Fungi,** 11th ed. Wallingford: CABI Publishing.
- LATARULLO, M. B., TAVARES, E. Q., PADILLA, G., LEITE, D. C., & BUCKERIDGE, M. S.; **Pectins, endopolygalacturonases, and bioenergy.** Frontiers in plant science, v. 7, p. 1401, 2016.
- LEWINSOHN T.M. & PRADO P.I. 2006. **Síntese do conhecimento atual da biodiversidade brasileira.** In: Lewinsohn T.M. (org.). Avaliação do estado do conhecimento da biodiversidade brasileira. Brasília: Ministério do Meio Ambiente.
- MÁRQUEZ A. L.; PÁRAMO M. G. Z., ROMERO E. L., CAMACHO H. C. **Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi.** Biotechnol Lett, v. 33, n. 5, p. 859-868, 2011.
- MENESES, A. G. **Produção de Enzimas pectinolíticas e seletividade de produtos fitossanitários sobre o agente biológico “G088”.** 2007. 112 f. Tese (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2007.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de Bioquímica.** Ed. Sarvier, 5°ed., Porto Alegre, Artmed, 2011, 1273 p.
- ORTIZ, G. E.; MOURA, M. C. P.; NOSEDA, D. G.; CAZABAT, G.; SARAVALLI, C.; LÓPEZ, M. C.; GIL, G. P.; BLASCO, M.; ALBERTÓ, E. O. **Pectinase production by Aspergillus giganteus in solid-state.** Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. v. 44, p. 197-211, 2017.

PEREIRA J.O., DE SOUZA A.Q.L., DE SOUZA A.D.L., DE CASTRO FRANÇA S., DE OLIVEIRA L.A. **Overview on Biodiversity, Chemistry, and Biotechnological Potential of Microorganisms from the Brazilian Amazon.** In: de Azevedo J., Quecine M. (eds) Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics. Springer, Cham. p. 71-103, 2017.

POLIZELI, M.L.T.M.; DAMÁSIO, A.R.L.; MALLER, A.; CABRAL, H.; POLIZELI, A.M.; RAI, M. **Pectinases produced by Microorganisms: Properties and Applications.** In: POLIZELI, M.L.T.M.; RAI, M. Fungal Enzyme. CRC Press, 2013, p. 316-340.

RAVEN, P. H. **Biology of plants.** New York: W.H. Freeman and Company Publishers, 2013.

REGINATTO, C.; ROSSI, C.; MIGLIORANZA, B. G.; SANTOS, M.; MENEGHEL, L.; SILVEIRA, M. M.; MALVESSI, E. **Pectinase production by Aspergillus niger LB-02-SF is influenced by the culture medium composition and the addition of the enzyme inducer after biomass growth,** Process Biochemistry v. 58, p. 1-8, 2017.

RIDLEY, B. L., O'NEIL, M. A., MOHNEN, D. **Pectins: structure, biosynthesis, and Oligogalacturonide – related signaling.** Phytochemistry, v. 57, p. 929-967, 2001.

ROSSI, S. C. **Produção de aromas frutais por ceratocystis fimbriata cultivado em polpa cítrica, farelo de soja e melaço de cana por fermentação no estado sólido – determinação da atividade de poligalacturonase, esterases e lipase.** 2011. 89 f. Tese (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2011.

SACCARO, JR, NILO, L. **A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil.** Ambiente & Sociedade, v. 14, n. 1, p. 229-244, 2011.

SILVA, H.G. O., PIRES, A. J. V., NETO, P. A. C., CARVALHO, G. G. P., VELOSO, C. M., SILVA, F. F. **Digestibilidade de dietas contendo silagem de capim -elefante amonizado e farelo de cacau ou torta de dendê em ovinos.** Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, v.36, n.2, p.499 - 506, 2007.

UENOJO, M; PASTORE, G.M. **Pectinases: aplicações industriais e perspectivas.** Química Nova, 30(2), 388-394, 2007.

VERDOES J. C., PUNT, P. J., VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. **Molecular genetic strain improvement for the overproduction of fungal proteins by filamentous fungi.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 43: p. 195-205, 1995.

CAPÍTULO 17

SELEÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS PRODUTORES DE LIPASE

Data de aceite: 01/06/2020

Vitória Cristina Santiago Alves

Universidade Federal de Pernambuco

vikeju92@gmail.com

Fábio Figueiredo de Oliveira

Universidade Federal de Pernambuco

Marcela Vanessa Dias da Costa

Universidade Federal de Pernambuco

Sarah Signe do Nascimento

Universidade Federal de Pernambuco

Joenny Maria da Silveira de Lima

Universidade Federal de Pernambuco

Cristina Maria de Souza-Motta

Universidade Federal de Pernambuco

obstáculo para a comercialização das mesmas, portanto a substituição de métodos tradicionais de produção, por fungos filamentosos pode aumentar a eficiência de produção da enzimas, bem como diminuir seus custos. Além da alta taxa de produção enzimática dos fungos filamentosos, estes organismos podem se utilizar de resíduos agroindustriais como fonte de carbono para seu crescimento. No presente artigo foram selecionados fungos filamentosos bons produtores de pectinases e seu meio de cultivo foi otimizado utilizando-se resíduos agroindustriais como fonte de carbono, visando uma alta produção de pectinases de forma sustentável e a baixo custo.

PALAVRAS-CHAVE: Lipase; Biotecnologia; fungos endofíticos.

ABSTRACT: Brazilian territory has a wide biological biodiversity, especially of filamentous fungi, microorganisms whose potential for biotechnological researches is huge, because they are excellent enzyme producers. Among them, there are pectinases, which degrades pectin, a vegetable cell wall component. Food, textiles, paper and biofuels industries, for example, need to degrade pectin from raw materials of their products, however, the high cost of pectinase production is the biggest

RESUMO: O território brasileiro apresenta uma ampla biodiversidade biológica, especialmente de fungos filamentosos, microrganismos cujo potencial para pesquisas biotecnológicas é enorme pois são excelentes produtores de enzimas. Dentre elas, podemos destacar as pectinases, que são enzimas que degradam pectina, componente da parede celular de vegetais. Indústrias como as alimentícias, têxteis, de papel, de biocombustíveis etc. precisam degradar a pectina da matéria prima de seus produtos, porém o alto custo de produção de enzimas pectinolíticas é o maior

obstacle to their commercialization, therefore the replacement of traditional methods by filamentous fungi, to produce pectinolytic enzymes, can be more efficient and reduce its cost. In addition to the high rate of filamentous fungi enzyme production, these organisms can use agro-industrial wastes as carbon source for their growth. In this article, filamentous fungi, good pectinase producers, were selected and their culture medium was optimized using agro-industrial wastes, aiming the highest and sustainably pectinase production, with a low cost.

KEYWORDS: Bioprospection, filamentous fungi, pectinases, *Aspergillus*, enzyme.

INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas degradadoras de lipídios sua ação consiste em converter gorduras em ácidos graxos e esteróis. Sua utilização na indústria tem se tornado cada vez mais frequente devido à avanços nas pesquisas em biotecnologia permitindo a sua utilização principalmente na indústria alimentícia, de cosméticos, de detergentes, entre outras (CARVALHO et al., 2015; COLLA, et al., 2012; RIBEIRO et al., 2011). As lipases de origem microbiana apresentam um interesse maior em aplicações industriais por serem consideradas mais estáveis, além de apresentarem ampla especificidade a substratos (GRIEBELER et al., 2011; CONTESINI et al., 2010). Muitos micro-organismos são conhecidos como produtores de lipases extracelulares, incluindo os fungos filamentosos, sendo assim, o presente estudo objetivou avaliar a capacidade de produção de lipase por cepas de fungos endofíticos pertencentes aos gêneros *Alternaria*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Diaporthe* e *Talaromyces*, todas estão em processo de depósito na Micoteca URM (University Recife Mycology) da UFPE.

METODOLOGIA

Foi preparado meio de cultura com 2g de Peptona, 1g de NaCl, 0.00012g de CaCl₂, 500µL de tween, 3g de Ágar e 200 ml de água destilada em Erlenmeyer de 500ml, esterilizados e vertidos em placas de Petri esterilizadas. Depositaram-se 20 µL de uma suspensão de esporos na concentração de 10⁷ no centro de placas de Petri de 9 cm contendo meio de cultura. Após 7 dias a 30°C em BOD com lâmpada fluorescente, a atividade lipásica extracelular foi observada pela formação de um halo opaco em torno das colônias fúngicas, por degradação dos sais de lipídio, conforme Hankin e Anagnostakis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cepas de *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. e *Diaporthe* sp. foram capazes de crescer no meio indutor de lipase, porém não foi observado a formação de

halo de degradação. O resultado negativo para a formação de halo de degradação pode ser justificado pela limitação da técnica utilizada, não significando que essas cepas não são produtoras de lipase.



Figura 1. Crescimento das cepas de *Diaporthe* (A 32), *Penicillium* (142), *Alternaria* (B116) e *Fusarium* (A34) respectivamente, sem formação de halo de degradação.

Dentre os fungos testados, apenas *Talaromyces sp.* foi capaz de formar halo opaco com IE de 1,86, evidenciando sua capacidade degradativa para lipase. Lealem e Gashe (1994) estabelecem que, para que um micro-organismo seja considerado um bom produtor de enzimas extracelulares em meio sólido, é necessário que seu IE seja maior ou igual a 2,0, porém, próximo desse valor já pode ser considerado um bom produtor necessitando apenas alterar outras condições.



Figura 2. Halo de degradação da cepa de *Talaromyces*. A. verso da colônia. B. reverso da colônia.

CONCLUSÃO

Com isso, para essa metodologia, a cepa que mostrou resultado positivo foi *Talaromyces* sendo selecionada para estudos posteriores mais aprofundados de otimização da produção de lipase.

APOIO

Departamento de Micologia, Micoteca URM (University Recife Mycology) e Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco.

REFERÊNCIAS

- CARVALHO, L. F. F.; CASTIGLIONE, G. L., 2015. Aplicação de lipase microbiana no tratamento de resíduos oleosos. Blucher Chemical Engineering Proceeding, v. 1, n. 2, p. 2354-2361.
- COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V., 2012. Aplicações e produção de lipases microbianas. Revista CIATEC-UPF, v. 4, n. 2, p. 1-14.
- CONTESINI, F. J.; LOPES, D. B.; MACEDO, G. A.; NASCIMENTO, M. G; CARVALHO, P. O., 2010. Aspergillus sp. Lipase: potencial biocatalyst for industrial use. Jornal of Molecular Catalyses B: Enzymatic, v. 67, n. 3-4, p. 163-171.
- GRIELBELER, N.; POLLONI, A. E.; FRANCIELI, A.; REMONATTO, D.; VANDDANEZA, R.; CECHET, J. L.; LUCCIO, M. D.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; RIGO, E.; NINOW, J. L., 2011. Isolation e screening of lipases-producing fungi with hydrolytic activyti. Food and Bioprocess Technology, v. 4, n. 4, p. 578-586.
- LEALEM F.; Gashe, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (Eragrostis tef). J Appl Bacteriol. 1994 Sep;77(3):348-52, doi:10.1111/j.1365-2672.1994.tb03084.x.
- RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G., 2011. Production and use de lipases in bioenergy: a review from thefeedstocks to biodiesel production Enzyme Research, v. 2011, p. 1-16.

SOBRE O ORGANIZADOR

BENEDITO RODRIGUES DA SILVA NETO - Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Mato Grosso (2005), com especialização na modalidade médica em Análises Clínicas e Microbiologia (Universidade Cândido Mendes - RJ). Em 2006 se especializou em Educação no Instituto Araguaia de Pós graduação Pesquisa e Extensão. Obteve seu Mestrado em Biologia Celular e Molecular pelo Instituto de Ciências Biológicas (2009) e o Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (2013) da Universidade Federal de Goiás. Pós-Doutorado em Genética Molecular com concentração em Proteômica e Bioinformática (2014). O segundo Pós doutoramento foi realizado pelo Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás (2015), trabalhando com o projeto Análise Global da Genômica Funcional do Fungo *Trichoderma Harzianum* e período de aperfeiçoamento no Institute of Transfusion Medicine at the Hospital Universitätsklinikum Essen, Germany. Seu terceiro Pós-Doutorado foi concluído em 2018 na linha de bioinformática aplicada à descoberta de novos agentes antifúngicos para fungos patogênicos de interesse médico. Palestrante internacional com experiência nas áreas de Genética e Biologia Molecular aplicada à Microbiologia, atuando principalmente com os seguintes temas: Micologia Médica, Biotecnologia, Bioinformática Estrutural e Funcional, Proteômica, Bioquímica, interação Patógeno-Hospedeiro. Sócio fundador da Sociedade Brasileira de Ciências aplicadas à Saúde (SBCSaúde) onde exerce o cargo de Diretor Executivo, e idealizador do projeto “Congresso Nacional Multidisciplinar da Saúde” (CoNMSaúde) realizado anualmente, desde 2016, no centro-oeste do país. Atua como Pesquisador consultor da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Goiás - FAPEG. Atuou como Professor Doutor de Tutoria e Habilidades Profissionais da Faculdade de Medicina Alfredo Nasser (FAMED-UNIFAN); Microbiologia, Biotecnologia, Fisiologia Humana, Biologia Celular, Biologia Molecular, Micologia e Bacteriologia nos cursos de Biomedicina, Fisioterapia e Enfermagem na Sociedade Goiana de Educação e Cultura (Faculdade Padrão). Professor substituto de Microbiologia/Micologia junto ao Departamento de Microbiologia, Parasitologia, Imunologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás. Coordenador do curso de Especialização em Medicina Genômica e Coordenador do curso de Biotecnologia e Inovações em Saúde no Instituto Nacional de Cursos. Atualmente o autor tem se dedicado à medicina tropical desenvolvendo estudos na área da micologia médica com publicações relevantes em periódicos nacionais e internacionais. Contato: dr.neto@ufg.br ou neto@doctor.com

ÍNDICE REMISSIVO

A

Abelhas sem ferrão 10, 114, 115, 116, 118, 119, 121
Água 14, 15, 17, 35, 36, 37, 45, 51, 63, 64, 72, 74, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 92, 94, 96, 102, 104, 105, 106, 107, 117, 157
Alternative control 22
Amazônia 20, 21, 32, 33, 42, 58, 72, 73, 74, 76, 97, 101, 114, 115, 120, 121
Antagonismo 12
Antifúngica 10, 16, 19, 21, 22, 23, 43, 59, 62, 70, 122, 124, 125, 131, 133, 135, 136, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145
Aspergillus 10, 23, 24, 27, 102, 103, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 115, 118, 119, 148, 149, 152, 154, 155, 157, 159
Atividade enzimática 44, 46, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 102, 104, 105, 109, 110, 128, 151

B

Basidiomycota 22, 23
Bioautografia 11, 12, 14, 16, 17, 18, 19
Bioprospecção 102, 113, 148, 150
Biotecnologia 21, 33, 44, 57, 102, 103, 114, 151, 154, 156, 157, 158, 160

C

Candida spp. 61, 62, 63, 68, 69, 71, 97, 98, 99, 100, 145, 146
Candidíase oral 61, 68, 71, 98
Cogumelo 48, 49, 51, 53
Cryptococcus gattii 9, 72, 73, 123, 131
Cryptococcus neoformans 10, 72, 73, 122, 123, 131, 132
Cultivo submerso 32, 35, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 106
Cylopogon flexuosus 122, 123

D

Diversidade 7, 9, 33, 34, 41, 74, 76, 80, 89, 93, 94, 95, 96, 116, 149

E

Enzimas 10, 44, 45, 49, 54, 60, 66, 68, 69, 99, 102, 103, 111, 112, 113, 129, 138, 148, 150, 151, 152, 153, 154, 156, 157, 158
Espiróticose 8, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10

Essential oils 21, 123

Extrato aquoso 11, 12, 55

F

Fatores de virulência 9, 10, 60, 62, 68, 69, 70, 97, 98, 99, 101, 122, 123, 131

Fluconazol 9, 58, 60, 61, 64, 67, 68, 69, 124, 141, 142

Fontes nutricionais 48, 50

Fungos 2, 7, 8, 9, 10, 2, 11, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 32, 33, 35, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 49, 54, 57, 73, 74, 75, 77, 93, 94, 95, 96, 99, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 123, 134, 137, 145, 148, 149, 150, 152, 153, 154, 156, 157, 158, 160

Fungos endofíticos 8, 10, 20, 32, 33, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 156, 157

Fungos filamentosos 10, 73, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 112, 113, 114, 137, 148, 149, 150, 152, 153, 154, 156, 157

Fusariosis 22, 23, 29

G

Gatos domésticos 1, 6, 7

I

Idosos 9, 97, 98, 99, 101

Infecções fúngicas 10, 62, 68, 133, 134, 135, 140

Intestino 114, 115, 116, 117, 119

L

Lipase 10, 44, 45, 46, 102, 103, 105, 106, 109, 110, 111, 112, 113, 155, 156, 157, 158, 159

M

Metabolismo secundário 33

N

Natural products 22, 23, 30, 41, 42, 123, 132

Nordeste brasileiro 8, 1, 8, 9

P

Pectinases 148, 149, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157

Phytopathogen 22, 24, 27, 29

R

Resíduos agroindustriais 44, 148, 156

Resistência fúngica 61

S

Solo 9, 2, 3, 7, 13, 21, 72, 74, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 94, 96, 124

Susceptibilidade antifúngica 133, 142, 143, 145

T

Transmissão zoonótica 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9

V

Virulence factors 61, 71, 98, 101, 123

Z

Zoospóricos 9, 74, 75, 76, 80, 93, 94, 95, 96

 Atena
Editora

2 0 2 0