

# Principais Grupos e Aplicações Biotecnológicas dos Fungos



**Benedito Rodrigues da Silva Neto**  
**(Organizador)**

**Atena**  
Editora  
Ano 2019

Benedito Rodrigues da Silva Neto  
(Organizador)

# Principais Grupos e Aplicações Biotecnológicas dos Fungos

Atena Editora  
2019

2019 by Atena Editora  
Copyright © Atena Editora  
Copyright do Texto © 2019 Os Autores  
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora  
Editora Chefe: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Antonella Carvalho de Oliveira  
Diagramação: Rafael Sandrini Filho  
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**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> 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  
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia  
Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Faria – Universidade Estácio de Sá  
Prof. Dr. Eloi 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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie di Maria Ausiliatrice  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Universidade Federal do Maranhão  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> 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  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

#### **Ciências Agrárias e Multidisciplinar**

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

### **Ciências Biológicas e da Saúde**

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri  
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª 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  
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 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

<b>Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)</b>	
P957	Principais grupos e aplicações biotecnológicas dos fungos [recurso eletrônico] / Organizador Benedito Rodrigues da Silva. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019.  Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader. Modo de acesso: World Wide Web. Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-730-7 DOI 10.22533/at.ed.307191810  1. Biotecnologia. 2. Fungos – Pesquisa – Brasil. I. Silva, Benedito Rodrigues da.  CDD 571.295
<b>Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422</b>	

Atena Editora  
Ponta Grossa – Paraná - Brasil  
[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)  
contato@atenaeditora.com.br

## APRESENTAÇÃO

Dentre os diversos microrganismos existentes, uma classe peculiar é a dos fungos, pois possuem uma diversidade de características únicas que refletem em seu modo de vida, nas suas interações e na sua aplicabilidade. Para se ter uma ideia já foram identificados cerca de 120.000 espécies de fungos das quais a grande maioria ainda é um vasto campo de estudo para os micologistas e biotecnólogos.

Consideramos como micologia o estudo de microrganismos que possuem aspectos leveduriformes e/ou filamentos assim denominados fungos. Trata-se portanto de uma área de estudo ampla que atrai diversos pesquisadores em diferentes campos científicos, tecnológicos e industriais. O Brasil é uma referência em se tratando de estudos em micologia, principalmente o que onhecemos como micologia médica, tanto pelos pesquisadores precursores quanto pela nova geração armada com as evoluções biotecnológicas e moleculares. Entre os pais da micologia médica brasileira destacamos Adolf Lutz em 1908 seguido por Alfonso Splendore e Floriano Paulo de Almeida na identificação do *Paracoccidioides brasiliensis*, além de Alberto Thomaz Londero, Olga Fischman Gompertz e principalmente o professor Carlos da Silva Lacaz com seu “Tratado de micologia médica” de 2002.

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.

Sinto-me muito feliz por ver a obra “Principais Grupos e Aplicações Biotecnológicas dos Fungos” publicada pela editora Atena, em primeiro lugar por saber do potencial da micologia e em segundo por evidenciar essa área tão importante para o cenário brasileiro e para um país que tem inúmeras possibilidades de evoluir nos estudos biotecnológicos aplicados aos fungos. Como pesquisador da área desejo que esse primeiro volume seja uma fagulha que desperte o interesse dos acadêmicos e que atraia pesquisadores da micologia médica e áreas correlatas para publicação de novos volumes com esse foco.

Desejo à todos uma excelente leitura!

Benedito Rodrigues da Silva Neto

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
FUNGOS: BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA, UM BREVE PANORAMA	
Benedito R. da Silva Neto	
<b>DOI 10.22533/at.ed.3071918101</b>	
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>11</b>
AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASE EM FUNGOS ENDÓFITOS ISOLADOS DE AVELÓS ( <i>Euphorbia tirucalli</i> L.)	
Lívio Carvalho de Figueirêdo	
Daniela Rayane da Silva Moraes	
Luana Kelly Carvalho da Silva	
Pablo Igor Lima Vieira	
Francisca das Chagas da Silva Paula Neta	
Ana Letícia Holanda Moraes	
<b>DOI 10.22533/at.ed.3071918102</b>	
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>17</b>
AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DE FUNGOS BASIDIOMICETOS AO HERBICIDA GLIFOSATO	
Wagner Mansano Cavalini	
Jaqueline da Silva Coelho Moreira	
<b>DOI 10.22533/at.ed.3071918103</b>	
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>30</b>
IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA DE ISOLADOS CLÍNICOS DO COMPLEXO <i>Candida Parapsilosis</i>	
Carolina Maria da Silva	
Ana Maria Rabelo de Carvalho	
Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo	
Cícero Pinheiro Inácio	
Reginaldo Gonçalves de Lima Neto	
Rejane Pereira Neves	
<b>DOI 10.22533/at.ed.3071918104</b>	
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>41</b>
SUSTENTABILIDADE AGRÍCOLA COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS	
Richard Henrique Siebra Bergamo	
Bruno Vinicius Daquila	
Helio Conte	
<b>DOI 10.22533/at.ed.3071918105</b>	
<b>CAPÍTULO 6</b> .....	<b>53</b>
TESTE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PROTEASE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>Euphorbia tirucalli</i> L.	
Lívio Carvalho de Figueirêdo	
Francisca das Chagas da Silva Paula Neta	
Luana Kelly Carvalho da Silva	
Pablo Igor Lima Vieira	
Daniela Rayane da Silva Moraes	
Ana Letícia Holanda Moraes	
<b>DOI 10.22533/at.ed.3071918106</b>	

**CAPÍTULO 7 ..... 59**

ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE PROTEASES, AMILASES, UREASES, LIPASES E TANASES POR FUNGOS E BACTÉRIAS ISOLADAS DE ÁREA COSTEIRA DO NORDESTE DO BRASIL

Igor Luiz Vieira de Lima Santos

Mykaella Joyce Silva de Araújo

Amanda Geovana Pereira de Araújo

Maria das Graças Morais de Medeiros

Carliane Rebeca Coelho da Silva

**DOI 10.22533/at.ed.3071918107**

**SOBRE O ORGANIZADOR..... 71**

**ÍNDICE REMISSIVO ..... 72**

## FUNGOS: BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA, UM BREVE PANORAMA

### **Benedito R. da Silva Neto**

Pós-Doutorando em Genética Molecular com concentração em Proteômica e Bioinformática. Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública pela Universidade Federal de Goiás. Mestrado em Biologia Celular e Molecular. Tem experiência na área de Microbiologia Genômica, Engenharia Genética e Quimioinformática.

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTSP/UFG  
dr.neto@ufg.br

### **INTRODUÇÃO**

Os fungos são microrganismos eucariotos, possuem dimensões variáveis e tem sido utilizado pelos seres humanos na produção alimentícia, na degradação de resíduos, na produção de produtos industriais, cosméticos e em fins medicinais. Aplicando a descrição botânica tradicional já foram identificados cerca de 120.000 espécies de fungos, contudo por meio de análises de sequenciamento e ciências da computação são estimadas cerca de 4 milhões, tornando este reino o mais diversificado do domínio *Eukarya* (JANBON, *et al.*, 2019).

O uso de estratégias biotecnológicas tem sido primordial na pesquisa com fungos. A vasta

diversidade fúngica apresenta grande potencial, seja para estudos de aplicações biotecnológicas, podendo ser utilizada no biocontrole, secreção de metabólitos secundários, micoparasitismo, fonte de novos fármacos, fonte de enzimas de interesse industrial, como para a descrição e melhoramento de novas espécies.

Sabemos que o DNA fúngico está inserido em uma quantidade relativamente menor núcleo da célula, sendo encontrado também nas mitocôndrias e nos plasmídeos, sendo o genoma dos fungos o menor entre os eucariotos. As técnicas de eletroforese permitem o estudo do DNA fúngico e a biologia molecular tem tornado possível a classificação dos fungos, mesmo na ausência de estruturas reprodutivas.

Encontramos nos mais variados meios de comunicação diversas definições para a biotecnologia. Uma definição ampla se refere ao uso de microrganismos vivos ou parte deles para a produção de bens e serviços. Nessa definição encaixam-se a biotecnologia clássica e a moderna.

A biotecnologia clássica envolve um conjunto de atividades que o homem vem desenvolvendo há milhares de anos, como a produção de alimentos fermentados a exemplo do pão e vinho. Já a biotecnologia moderna envolve tecnologias de engenharia genética,



DNA recombinante, cultura de células, a mais recente tecnologia de edição gênica CRISPR Cas9, para o desenvolvimento de produtos e processos.

O perfil da biotecnologia varia de um país para outro, em função dos recursos naturais, econômicos e políticos, das características das empresas envolvidas e do papel assumido pelos setores público e privado. O processo de busca e descoberta biotecnológica em si vem sofrendo profundas alterações em função das mudanças de modelos desencadeadas pelo avanço da biologia molecular, genômica e bioinformática.

A descoberta de novos metabólitos ativos de origem microbiana é um desafio que pode trazer inúmeros benefícios, pois os fungos são essenciais para a saúde e prosperidade de muitos ecossistemas, sendo fundamentais para a sustentabilidade e biodiversidade dos mesmos. Nesse contexto, é necessário enfatizar a importância da biotecnologia para obtenção de novas tecnologias para benefícios da saúde humana e equilíbrio ambiental.

Os fungos como eucariotos, além de reproduzirem-se rapidamente, puderam ser usados com eficiência na resolução de problemas genéticos. E foi utilizando fungos filamentosos e leveduras que se descobriu em 1941 que os genes produzem enzimas e outras proteínas, sendo então os fungos precursores da biotecnologia.

Os primeiros trabalhos relacionados à transformação genética de fungos iniciam no final da década de 70 com a transformação de protoplastos de linhagens de *Saccharomyce cerevisiae* e *Neurospora crassa*.

As vantagens das leveduras relacionam-se com sua capacidade de realizar modificações pós-traducionais, como glicosilações, que não apenas contribuem para que as proteínas heterólogas adquiram a conformação correta, como também para sua estabilidade, prolongando a meia vida enquanto agente terapêutico. Além disso, diferente das bactérias, que precisam ser rompidas para a obtenção das proteínas de interesse, as células de levedura são capazes de secretar as proteínas recombinantes, facilitando as próximas etapas de purificação. Assim, a partir da comercialização da “Recombivax” em 1986 pela Merck, vacina contra a Hepatite B, várias outras proteínas terapêuticas heterólogas produzidas por *Saccharomyce cerevisiae*, como a insulina, passaram a ser comercializadas.

As leveduras dos gêneros *Torulopsis* e *Candida* sendo capazes de crescer em melaço ou licor sulfítico, subprodutos da fabricação de açúcar e papel, respectivamente, são utilizadas para o tratamento destes resíduos industriais. A biomassa microbiana formada pode ser, subsequentemente, utilizada como fonte de proteína para a alimentação animal.

Considerando ainda o potencial biotecnológico das leveduras, os gêneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, e *Candida* são capazes de fermentar diferentes açúcares e etanol. É de particular importância para o Brasil a produção de álcool combustível pela fermentação da sacarose do caldo da cana-de-açúcar por *Saccharomyce cerevisiae*, tendo em vista ser o país, juntamente com os EUA um dos maiores produtores de etanol do mundo.

Os cogumelos já eram utilizados desde os tempos mais remotos com finalidades medicinais para combater hemorragias, feridas, asma etc. Algumas tribos brasileiras usavam *Pycnoporus sanguineus* (orelha de pau vermelha) para a cicatrização. Pesquisas recentes indicam vários atributos medicinais dos cogumelos: efeitos antivirais, antibacterianos, antitumorais, antiinflamatórios etc. O cogumelo comestível mais conhecido é o champignon (*Agaricus brunnescens*) da Europa, no Brasil temos o *Pleurotus*.

Os fungos estão associados à tecnologia de alimentos desde os primórdios, alimentos orientais, indígenas, processamentos de leite. Hoje já é possível conhecer os processos pelos quais os fungos modificam os alimentos, pela produção de micotoxinas ou contaminação.

A partir do metabolismo dos fungos pode-se dispor de diversos compostos naturais com atividades metabólicas. O metabolismo dos fungos se divide em: metabolismo primário (pequenas moléculas produzidas ao longo do crescimento vegetativo e são usados em indústrias alimentícias). Metabolismo secundário (sintetizados quando o crescimento microbiano está na fase estacionária. São frequentemente bioativos e de baixa massa molecular e muito importantes devido às atividades antibióticas e de importância farmacêutica, bem como atividades imunossupressoras e tóxicas.

Os fungos filamentosos são fungos que se destacam devido a sua grande facilidade de cultivo, por secretarem suas enzimas diretamente no meio, não sendo necessária a ruptura da célula. Entre as enzimas fúngicas importantes para a indústria alimentícia destacam-se: Amiloglicosidases produzidas por *Aspergillus* e *Rhizopus*; Amilases que transformam amido em dextrinas e oligossacarídeos isoladas por fermentação de *Aspergillus niger*; Lipases que catalisam reversivelmente a hidrólise de triacilgliceróis sob condições naturais, podendo catalisar a transesterificação e a síntese esteroespecífica de ésteres em um grande número de substratos.

A maioria dos fungos produtores de enzimas necessárias para a degradação de materiais lignocelulósicos pertence aos grupos de Ascomycetes, Basidiomycetes e Deuteromycetes. Podem causar 3 tipos de degradação: Branca (componentes da madeira), Marron (degradam principalmente polissacarídeos) e Macia (degradam lignina e aflatixina B<sub>2</sub>, ocratoxina A, cítreoviridina e 11 polissacarídeos, porém em baixa velocidade. Essas degradações são feitas geralmente por enzimas oxidativas como lacase e peroxidase).

As enzimas produzidas por fungos possuem vantagens para a produção em larga escala, via fermentação, com potencial de aplicação na substituição de processos químicos convencionais de interesse industrial. Além do processo industrial, os fungos estão diretamente ligados à recuperação ambiental, tanto na reciclagem de resíduos agrícolas e agroindustriais, como na biodegradação de materiais lignocelulósicos (celulose, poliose e lignina), especialmente a madeira. Como controle biológico o *Trichoderma* e *Metharhizium* são usados como microerbicidas, micoInseticidas ou

micoparasitas como controladores biológicos na produção de inseticidas microbianos que diminuem o uso de agroquímicos.

## DESENVOLVIMENTO

### Fungos Endofíticos: biodiversidade e aplicações

Petrini (1991) define endófitos como sendo microrganismos que habitam o interior das plantas, sem, aparentemente causar qualquer efeito negativo aos seus hospedeiros.

Uma definição mais recente de Azevedo e Araújo (2007) diz que são todos aqueles microrganismos que podem ou não crescer em meios de cultura, e que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais, sem causar prejuízos ao seu hospedeiro e sem produzir estruturas externas emergindo dos vegetais. Mendes e Azevedo sugerem a seguinte divisão: Tipo I que não produzem estruturas externas à planta, e Tipo II que produzem estruturas externas.

A utilização de microrganismos endofíticos como fonte de produtos bioativos ou metabólitos secundários é uma interessante estratégia, pois esses microrganismos habitam o interior de plantas sem causar nenhuma doença. Dados mostram que fungos patogênicos e fungos do solo produzem menos metabólitos secundários, quando comparados aos endofíticos. Assim esses fungos são potencialmente úteis na agricultura e indústria alimentícia e farmacêutica. Podem ser também usados como vetores, agentes inibidores, fontes de metabólitos primários e secundários como o Taxol que é um anticancerígeno.

A maior biomassa viva do planeta é formada por comunidades microbianas, responsáveis por muitos dos processos essenciais à vida. É estimado que possa existir mais de um milhão de diferentes espécies de fungos, mas apenas 80-100 mil já foram descritas. Os fungos endofíticos representam uma rica fonte de diversidade genética e de espécies ainda não descritas e, normalmente, um novo microrganismo está associado à um novo produto natural ou biomolécula.

Os fungos endofíticos tem atraído a atenção por dois motivos: 1) são isolados de praticamente todas as plantas; 2) possuem interação mutualística com a planta hospedeira que proporciona nutrientes e proteção para o fungo, recebendo em troca compostos químicos. O Brasil possui um grande potencial a ser explorado, considerando cerrado, caatinga, mangue, floresta tropical e Amazônia.

Vários papéis tem sido atribuídos aos fungos endofíticos, incluindo a proteção contra insetos herbívoros, nematoides, parasitas de plantas e microrganismos fitopatogênicos. Existem pesquisas recentes voltadas para a influência econômica benéfica ou prejudicial dentro da produção e colheita e culturas, assim como ao estudo de metabólitos secundários, principalmente para descobrir moléculas ou compostos

bioativos.

## Controle biológico

O efeito negativo de fungos endofíticos sobre insetos herbívoros está associado à produção de metabólitos ou toxinas pelo fungo, embora fatores ambientais e a presença de micorrizas e nutrientes possam influenciar o resultado da associação.

Vega et al., (2008) em revisão investigaram o modo de ação dos fungos endofíticos contra insetos, descartando o controle por ação direta de infecção ou desenvolvimento de micose no inseto, sugerindo que a ação do fungo está associada à produção de metabólitos e toxinas. Recente estudo indica que *B. bassiana*, coloniza endofiticamente banana no controle do inseto *Cosmopolites sordidus* (Akello et al., 2008).

Fungos endofíticos habitam um nicho ecológico semelhante àquele ocupado por fitopatógenos, podendo, assim, se tornar uma ferramenta poderosa no controle desses patógenos por competição aos nutrientes, produção de substâncias antagônicas, parasitismo ou induzindo resistência na planta.

O uso de estratégias de controle biológico de fitopatógenos, envolvendo endófitos vem crescendo cada vez mais e, com o acúmulo de informações a respeito da diversidade, modo de ação e biologia, pode-se vislumbrar um controle que minimize o uso de agentes químicos, a exemplo da doença “vassoura-de-bruxa” na qual o agente é o fungo *Moniciopathora perniciosa*, o gênero endofítico *Gliocladium catenulatum* reduz a incidência em até 70% nas mudas de cacau (Runini et al., 2005).

Da mesma forma também tem sido comprovado que *Fusarium oxysporum* é um antagonista de nematoides, demonstrando que os metabólitos produzidos por esse fungo causam a morte dos parasitas. Raízes de tomate colonizadas endofiticamente por *F. oxysporum* mostraram redução de 60% em relação ao nematoide *Meloidogyne incógnita*, pelos metabólitos secundários produzidos. Nematoides são um dos principais problemas em culturas de banana. O controle geralmente é feito com nematicidas carbamatos e organofosforados. Entretanto a biodegradação e seleção de espécies resistentes torna-se um problema (Hallmann; Sikora, 1994)

## Produtos naturais e biomoléculas produzidas por fungos endofíticos

Historicamente, de todos os microrganismos estudados, os actinomicetos e os fungos tem sido os maiores produtores de metabólitos secundários. Sugere-se ainda que os fungos são fundamentais à saúde e à prosperidade de muitos ecossistemas terrestres, sendo essenciais para a sustentabilidade e diversidade do mesmo.

Diversos estudos demonstram o potencial dos fungos endofíticos para a produção de moléculas bioativas, como ácido coletotrico do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da *Artemisia mongólica*, que apresenta atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *S. aureus* e contra o fungo *Helminthosporium sativum*.

Sebastianes et al., (2008) isolaram fungos endofíticos das espécies vegetais

*Rhizophora mangle* encontrada em manguezais do litoral de São Paulo, com o objetivo de selecionar endófitos capazes de produzir agentes microbianos para controle de bactérias patogênicas humanas *E. coli* e *S. aureus*. *Gliocladium flavofusum* apresentou ótimos resultados.

O Taxol, um diterpenoide produzido pela planta *Taxus brevifolia*, e largamente utilizado no tratamento do câncer mamário e de útero, é também produzido pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae* isolado de *T. Brevifolia*. Alguns compostos de origem vegetal também são produzidos por fungos que habitam vegetais, indicando haver uma transposição de genes entre plantas e fungos, seria uma espécie de engenharia genética in vivo. Não somente o Taxol, mas outros compostos com ação antitumoral são descritos como produzidos por fungos endofíticos, exemplo, *F. oxysporum* isolado de *Catharanthus roseus* tem a capacidade de produzir vincristine. Kurasi et al., (2009) isolaram, identificaram e caracterizaram o endofítico *Aspergillus fumigatus*, isolado de *Juniperus communis*, como novo produtor de deoxypodophyllotoxin, precursor de drogas no combate ao câncer.

*Gliocladium roseum* isolado de *Eucryphia cordifolia* produz uma série de hidrocarbonetos voláteis e derivados em meio de cultura aveia (Strobel, 2008). Substâncias voláteis com alto valor energético são alternativas para novas fontes de combustíveis.

Deste modo destacamos aqui que o entendimento das interações fungo endofítico/planta hospedeira, pode abrir novas perspectivas ao potencial biotecnológico desses microrganismos. Assim, o incremento na bioprospecção de moléculas biologicamente ativas e endofíticos abre novas perspectivas e alternativas para contribuir com o desenvolvimento de novas tecnologias e estratégias na área médica, farmacêutica e agrícola.

## Enzimas Lignolíticas

A maioria dos fungos produtores de enzimas necessárias à degradação de materiais lignocelulósicos (madeira, casca, palha etc) pertencem aos grupos Ascomycetos, Basidiomycetos e Deuteromycetos. Essas degradações branca, marron e macia, em geral são feitas por enzimas oxidativas.

A biodegradação de lignina está relacionada principalmente aos fungos de degradação branca. É uma degradação mais rápida, entretanto o substrato para o seu desenvolvimento não é somente a lignina, mas também a hemicelulose e a celulose. O crescimento dos fungos em geral diminui em ocasiões de carência de nitrogênio e carbono, e as atividades lignolíticas aparecem como uma forma metabólica secundária. Devido à natureza e ao tamanho da lignina, as enzimas responsáveis pelo ataque inicial são moléculas extracelulares e não específicas que, em alguns casos, são chamados sideróforos.

Tendo em vista o impacto ambiental causado pelos efluentes, esforços tem sido

feitos no sentido de reduzir ou eliminar o uso de compostos clorados nas etapas de branqueamento. Os fungos de decomposição branca possuem um sistema enzimático extracelular e intracelular capaz de tolerar altas concentrações de poluentes tóxicos. Essas enzimas estão envolvidas na degradação de lignina e celulose pelo fungo de degradação branca o *P. Chrysosporium*. A utilização de fungos objetiva a descontaminação desses ambientes (efluentes do processo de obtenção de polpas celulósicas).

A eficiência do processo está diretamente relacionada com a capacidade do fungo em degradar a lignina. Enzimas como a lignina peroxidase e manganês peroxidase são produzidas por esses fungos como resposta à baixa concentração de carbono e nitrogênio. Essas enzimas mineralizam a grande quantidade de compostos aromáticos recalcitrantes, e a imobilização dessas enzimas em cerâmicas porosas ou resinas não afeta negativamente as propriedades das enzimas oxidativas e mostra bom potencial na aplicação ambiental.

A tirosinase, que catalisa a hidroxilação de fenóis e desidrogenação de o-difenóis, em sua forma imobilizada apresenta excelente remoção de fenóis. A lacase por sua vez é capaz de eliminar fenóis por meio da polimerização, mas na presença de mediadores como o 1-hidrobenzotriazol, além de outros, degradando por processo oxidativo.

## Enzimas Hidrolíticas

Enzimas são biocatalizadores, são proteínas produzidas pelas células com a finalidade de acelerar as reações químicas do metabolismo, sendo específicas quanto à sua função.

As enzimas hidrolíticas por sua vez, constituem uma grande classe de enzimas responsáveis pela catálise de reações de hidrólise de diversos substratos como proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, lipídios, além de biomoléculas. Uma grande variedade de enzimas hidrolíticas podem ser produzidas por fungos, proteases e endonucleases podem ser detectadas em todas as espécies, outras como as carboidrases podem ser excretadas por algumas espécies quando o fungo está em ambiente deficiente de açúcar.

As hidrolases comerciais podem ser obtidas de microrganismos, tecidos vegetais e animais. Entretanto, atualmente quase todas as preparações vêm da fermentação. Nesse processo, um microrganismo selecionado é inoculado em um biorreator contendo meio nutriente adequado onde, sob condições físico-químicas, bioquímicas e operacionais específicas ocorre a produção do tipo de enzima desejada. No caso de obtenção de enzima por fungo filamentoso, é um fator delicado, uma vez que grande massa micelial formada pode prejudicar a difusão do oxigênio em culturas submersas ou ser morfológicamente afetada pelo sistema de aeração.

Recentemente muitos estudos tem procurado métodos alternativos para a produção de enzimas por fungos baseado em processo semi-sólido ou em células

imobilizadas. Particularmente nos últimos anos tem crescido o interesse pelos processos de fermentação em estado sólido. Nesse processo o fungo filamentoso desenvolve-se em substrato sólido natural ou suportes inertes embebidos no meio de cultura, com teores baixos de água livre. As principais vantagens seriam a utilização de rejeitos agrícolas como substrato, alto rendimento, melhoramento das características do produto final e facilidade na recuperação do produto com baixo rendimento de energia.

## Pigmentos fúngicos

Apesar do grande interesse por pigmentos naturais, o conhecimento a cerca de sua distribuição, disponibilidade e propriedades é muito limitado. Muitos trabalhos já foram publicados sobre o risco dos pigmentos artificiais, o que torna extremamente viável a produção destes de forma sustentável.

Pigmentos característicos são obtidos por uma grande variedade de fungos como *Aspegillun glaucus* e *Fusarium culmorum*. A indústria dos corantes sofre com o aumento dos custos das matérias-primas e energia para a síntese, assim como a necessidade de diminuir os danos ao ambiente. Logo, as indústrias estão buscando vias mais econômicas por ferramentas biotecnológicas, haja vista o isolamento de antraquinonas de *Trichoderma*, *Aspegillus* e *Curvularia*.

Os pigmentos também são ativos contra bactérias, leveduras e protozoários. A atividade citotóxica de naftoquinonas por exemplo contra leucemia em ratos e células HeLa tem sido descrito. Os pigmentos produzidos como metabólitos secundários por vários isolados de *Monascus* tem sido usado de forma tradicional como corante em alimentos orientais, entretanto, estudos recentes indicaram que um dos metabólitos secundários produzidos tem estrutura idêntica à micotoxina citrina.

A produção de pigmentos fúngicos é uma nova área em expansão e apresenta um potencial biotecnológico muito atraente. Acredita-se que após estudos toxicológicos e comparação com os pigmentos sintéticos, os novos pigmentos fúngicos possam ser aceitos naturalmente.

## CONCLUSÃO

Os avanços tecnológicos são de fundamental importância para o avanço social e econômico de uma nação. Grande parte desses avanços são frutos da pesquisa básica desenvolvida em diversas instituições de ensino superior do país. A microbiologia como grande área da saúde tem influenciado diretamente nesse âmbito, haja vista os diferentes estudos e descobertas relevantes em trabalhos com vírus, bactérias e fungos.

A biotecnologia é um campo vasto para desenvolvimento e avanços. Aliada à microrganismos leveduriformes ou filamentosos (como é o caso dos fungos que

aqui apresentamos) torna-se promissora e capaz de solucionar problemas no campo ambiental, farmacêutico, alimentício etc.

Essa breve revisão é apenas a ponta o iceberg quando comparada às inúmeras aplicações da micologia. Sabemos que no campo da micologia médica o Brasil é uma referencia com nomes que sustentaram e evidenciaram os estudos desses microrganismos. Assim há de fato uma responsabilidade aos novos micologistas, seja no campo médico, ambiental, alimentar, farmacêutico em dar continuidade ao desenvolvimento desta ciência aplicada, uma vez que o estudo vai muito além dos produtos, biomoléculas e técnicas biotecnológicas aqui apresentadas.

## REFERÊNCIAS

Azevedo, J. L.; Araújo, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: Ganguli, B.N. (eds) *fungi: multifaceted microbes*. CRC Press, Boca Raton. p 189-207. 2007.

Azevedo, J. L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: Melo, I. S. (Eds) *Ecologia Microbiana*. Embrapa-CNPMA. Jaguariúna, p. 117-137. 1998.

Akello, J. et al., Effect of endophytic *Beauveria bassiana* on populations of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*, and their damage in tissue-cultured banana plants. *Entomol. Exp. Appl.*, 129:157-165, 2008.

BEARDSLEY, J. **Fungo é a próxima “superbactéria” a ameaçar a saúde humana**. ABC Notícias. Disponível em: <<https://mobile.abc.net.au/news/2019-04-17/fungus-superbug-next-threat-to-human-health/11018652?pfmredir=sm>>. Acesso em 09 de julho de 2019.

DE OLIVEIRA, R. M. Z. **Técnicas Avançadas no Diagnóstico de Micoses**. [Entrevista concedida a] *Micro in foco*. XXVIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Florianópolis. Outubro, 2015. Disponível em: <<https://sbmicrobiologia.org.br/novas-tecnologias-aceleram-o-diagnostico-de-infecoes-fungicas/>>. Acesso em 09 de julho de 2019.

GÓES, A. C. S. OLIVEIRA, B. V. X. **Projeto genoma humano: um retrato da construção do conhecimento científico sob a ótica da revista Ciência Hoje**. *Ciênc. Educ.*, Bauru, v. 20, n. 3, p. 561-577, 2014.

HALLMANN, J.; SIKORA, R. A. Occurrence of *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* in tomato of diferente agro-ecological zones in Kenya an their mutual interactions. *International Journal of Pest Management*, 40:321-325, 1994.

JANBON, G. et al. **Studying fungal pathogens of humans and fungal infections: fungal diversity and diversity of approaches**. *Genes & Immunity*. v. 20, p. 403–414. 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41435-019-0071-2.pdf>>. Acesso em 11 de julho de 2019.

KURASI, S. et al., *Aspergillus fumigatus* Fresenius, an endophytic fungus from *Juniperus communis* L. Horstmann as a novel source of the anticancer pro-drug deoxypodophyllotoxin. *J. Appl. Microbiol.*, 2009.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews, J. H.; Hirano, S. S. *Microbial Ecology of Leaves*. Springer-Verlag, New York, p.179-187, 1991.

VEGA, F. E. et al., Entomopathogenic fungal endophytes. *Bio. Cont.*, 46:72-82, 2008.



RUBINI, M. R. et al., Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. *Int. J. Biol. Sci.*, 1:24-33, 2005.

SEBASTIANES, F. L. S. et al., Endophytic fungi isolated from two mangrove ecosystems in São Paulo State, Brazil. In: XII International Congresso f Mycology, p 69-96, 2008

## AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASE EM FUNGOS ENDÓFITOS ISOLADOS DE AVELÓS (*Euphorbia tirucalli* L.)

### **Lívio Carvalho de Figueirêdo**

Universidade Federal Rural do Semi-Árido,  
Departamento de Biociências  
Mossoró – RN

### **Daniela Rayane da Silva Morais**

Universidade Federal Rural do Semi-Árido,  
Departamento de Biociências  
Mossoró – RN

### **Luana Kelly Carvalho da Silva**

Universidade Federal Rural do Semi-Árido,  
Departamento de Biociências  
Mossoró – RN

### **Pablo Igor Lima Vieira**

Universidade Federal Rural do Semi-Árido,  
Departamento de Biociências  
Mossoró – RN

### **Francisca das Chagas da Silva Paula Neta**

Universidade Federal Rural do Semi-Árido,  
Departamento de Biociências  
Mossoró – RN

### **Ana Letícia Holanda Morais**

Universidade Federal Rural do Semi-Árido,  
Departamento de Biociências  
Mossoró – RN

**RESUMO:** Fungos endófitos são micro-organismo que vivem no interior de plantas, não causando problemas aparentes no funcionamento das mesmas. Esses podem evoluir com seu hospedeiro, havendo assim

uma associação que traz benefícios para ambas às espécies. Tais fungos são conhecidos por apresentar alta capacidade de produção de enzimas extracelulares de interesse biotecnológico, sendo amplamente aplicadas na indústria. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade enzimática de amilase extracelular em isolados endofíticos de Avelós (*Euphorbia tirucalli* L.). Em trabalho realizado anteriormente, foram isolados 10 fungos endofíticos de espécimes de Avelós na cidade de Mossoró, Rio Grande do Norte. Os fungos foram cultivados em meio BDA (batata dextrose ágar) por sete dias à 28°C em câmara BOD. Posteriormente, foram retirados dois discos de micélio com meio de 6 mm de cada isolado e cultivado por 5 dias em meio ágar amido. Em seguida, os isolados foram submetidos ao teste enzimático para amilase, utilizando meio ágar amido e, para revelação, foi utilizado vapor de iodo. Como resultado, foi observado que, 80% dos isolados apresentaram ação enzimática, e 20% não. Dentre os positivos, o isolado 6 (seis) apresentou maior índice enzimático (IE), com média de 2,29. Os demais isolados apresentaram IE inferior, sendo o isolado 10 (dez) o mais baixo, com IE=1,10. De acordo com os resultados, conclui-se que isolados de Avelós (*Euphorbia tirucalli*), apresentam atividade de amilase extracelular, destacando, assim, o grande potencial biotecnológico do

estudo de isolados endófitos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Avelós; Enzimas; Metabólitos Fúngicos.

## EVALUATION OF AMILASE PRODUCTION IN ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM AVELÓS (*Euphorbia tirucalli* L.)

**ABSTRACT:** Endophytic fungi are microorganisms that live inside plants, causing no apparent problems in their functioning. These fungi can evolve with their host, consequently having an association that brings benefits to both species. Such fungi are known for their capacity in producing a high amount of extracellular enzymes of biotechnological interest, being widely applied in the industry. Thus, the present study aimed to evaluate the enzymatic activity of extracellular amylase in endophytic isolates of Avelós (*Euphorbia tirucalli* L). In previous work, 10 endophytic fungi of Avelós specimens were isolated in the city of Mossoró, Rio Grande do Norte. The fungi were grown in BDA (potato dextrose agar) medium for seven days at 28°C in a BOD chamber. Subsequently, two mycelial discs with 6 mm size of each isolate were cultured and cultured for 5 days in starch agar medium. Then, the isolates were submitted to enzymatic testing for amylase, using starch agar medium and, for development, iodine vapor was used. As a result, it was observed that, 80% of the isolates presented enzymatic action, and 20% did not. Among the positives, isolate 6 (six) had a higher enzymatic index (EI), with an average of 2.28. The remaining isolates had lower EI, with the isolate 10 (ten) the lowest, with EI = 1.10. According to the results, it is concluded that isolates from Avelós (*Euphorbia tirucalli*) show extracellular amylase activity, thus highlighting the great biotechnological potential of the study of endophyte isolates.

**KEYWORDS:** Avelós; Enzymes; Fungal Metabolites.

## 1 | INTRODUÇÃO

Organismos vegetais, como plantas, tendem a viver em relações de mutualismo com microrganismos presentes nos solos, ou mesmo que colonizem seus tecidos, tais relações, consideradas de simbiose, podem ocorrer durante uma fase do ciclo de vida desta planta ou mesmo durante todo ele. Dentro desta última classe de organismos capazes de colonizar tecidos vegetais vivos se encontram os fungos endofíticos, que são microrganismos que exibem uma interação complexa com a planta hospedeira (CLAY; SCHARDL, 2002). Tal interação, pode ser chamada de mutualismo, uma vez que essa relação traz mais benefícios que malefícios para ambos (SCHARDL; LEUTCHMAN; SPIERING, 2004). Fungos endofíticos se tornam fontes de metabólitos secundários para a planta e esta, em consequência, fornece nutrientes e proteção para os fungos (KELLER; TURNER; BENNET, 2005).

Fungos endófitos são microrganismo que vivem no interior de plantas, não causando problemas aparentes no funcionamento desse organismo hospedeiro, eles podem ser encontrados nas partes aéreas da planta, como caules e folhas

(BERNARDI-WENZEL et al., 2012). Tais fungos podem evoluir com seu hospedeiro, havendo assim uma associação que traz benefícios para ambas espécies, como: controle biológico de pragas e produção de biofármacos. Esses microrganismos são conhecidos por apresentar alta capacidade de produção de enzimas extracelulares de interesse biotecnológico, sendo amplamente aplicado na indústria têxtil, de alimentos e fármacos (SAIKKONEN et al., 2004).

A *Euphorbia tirucalli* L. (Figura 1), é uma planta pertencente a família Euphorbiaceae, nativa do continente Africano, que foi trazida por imigrantes para países de clima tropical, como o Brasil, onde se adaptou facilmente ao clima semiárido, sendo amplamente encontrada em estados da região Nordeste como, Paraíba, Sergipe, Ceará e Rio Grande do Norte. Ela é popularmente conhecida como aveloz, labirinto, mata-verruga, cachorro-pelado, dentre outros (COSTA, LUCIANA SOBRINHA MEDEIROS, 2011).



Figura 1 – Aspecto geral de *Euphorbia tirucalli* L.

O amido é um complexo de moléculas de glicose formado por ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6. A amilopectina, molécula com cerca de 6000 unidades de glicose adjuntas por ligações  $\alpha$ -1,4, e a amilose, contendo ligações  $\alpha$ -1,4 entre as moléculas de glicose e  $\alpha$ -1,6 nos pontos de ramificação, são os componentes desta estrutura. Para que o amido seja assimilado, é necessária a atuação de diversas enzimas do grupo das amilases. Estas têm a capacidade de hidrolisar o amido, resultando em oligossacarídeos menores, como as maltoses e as dextrinas (MYERS et al., 2000; HAKI; RAKSHIT, 2003). Sendo categorizadas de acordo com seu modo de ação, as amilases podem ser definidas como endoamilases e exoamilases. As endoamilases reagem em uma porção aleatória do interior da cadeia do amido. Em contrapartida, as exoamilases atuam nas porções das extremidades das mesmas, resultando em compostos finais menores (GUPTA et al., 2002).

Dentre as principais amilases, tem-se as  $\alpha$ -amilases,  $\beta$ -amilases e glicoamilases.

As  $\alpha$ -amilases são endoamilases que agem de forma aleatória no nas ligações  $\alpha$ -1,4 no interior das amiloses e amilopectinas, liberando compostos menores, como glicose, maltose e dextrina. As  $\beta$ -amilases são caracterizadas como exoamilases, hidrolisando na penúltima ligação  $\alpha$ -1,4, liberando moléculas de maltose. Já as glicoamilases pertencem ao grupo das exoamilases, sendo capazes de romper tanto as ligações  $\alpha$ -1,4 quanto as ligações  $\alpha$ -1,6 do amido, resultando na liberação de glicose (GUPTA et al., 2002).

Amilases são enzimas de extrema importância para o mercado industrial, podendo ser aplicadas nos mais diversos âmbitos, como na indústria cervejeira e de bebidas destiladas, química, farmacêutica, detergentes, dentre outros (GUPTA et al., 2003; PANDEY et al., 2005).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ação enzimática, quanto a produção de amilase extracelular em isolados endófitos de Avelós (*Euphorbia tirucalli* L.).

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Foram previamente isolados 10 fungos endófitos de Avelós na cidade de Mossoró, Rio Grande do Norte, e cultivados em BDA a 28°C (denominados de EET1 a EET10) em câmara BOD para crescimento por sete dias. Para o teste de atividade amilolítica, seguiu-se a metodologia definida por Hankin e Anagnostakis (1975) adaptada, na qual retirou-se dois discos de micélio de 6mm de cada isolado e cultivou-se por 5 dias em meio ágar amido (1,8% de ágar e 1% de amido diluídos em tampão citrato fosfato a 0,1 M com pH 5,0). Para revelação do halo a tampa da placa de cultivo foi preenchida com grãos de iodo e a base contendo o meio foi disposta de forma invertida sobre os grãos, então esperou-se 60 segundos para os vapores dos sais de iodo corarem o meio. Os resultados positivos foram analisados a partir da formação de um halo translúcido ao redor da colônia e dimensionados os diâmetros da colônia. O diâmetro da colônia e os halos de degradação foram medidos para determinar o índice enzimático ( $IE = \text{diâmetro da colônia} / \text{diâmetro da colônia mais a área do halo de degradação}$ ). Os testes enzimático foram realizados em quatro repetições.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos dez isolados, oito (80%) apresentaram ação enzimática, sendo que os isolados EET7 e EET8 não apresentaram atividade amilolítica. Dentre os que apresentaram a formação de halo de degradação, todos foram estatisticamente diferentes, o isolado EET6 apresentou maior índice enzimático, com média de 2,29; o segundo maior índice de degradação avaliado foi do isolado EET3 com um  $IE=1,78$  e o isolado 10 (dez) o mais baixo, com  $IE=1,10$  (Tabela 1).

Isolados	Média IE
EET8	0,00 a*
EET7	0,00 a
EET10	1,10 b
EET2	1,12 c
EET9	1,21 d
EET4	1,43 e
EET5	1,45 f
EET1	1,46 g
EET3	1,78 h
EET6	2,29 i

Tabela 1 – Médias dos índices enzimáticos (IE) para amilase dos isolados de *Euphorbia tirucalli* L.

\*Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

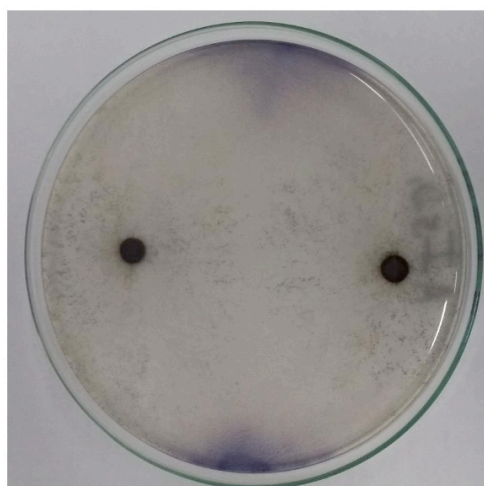


Figura 2 – Aspecto do halo de degradação de amido pelo isolado EET6.

Fernandes (2009) analisou a atividade amilolítica de 71 fungos isolados de diferentes fontes, como café, solo, amendoim, pão, além de outros substratos, e observou a atividade amilolítica de 31 isolados, na qual apenas cinco puderam ser considerados bons produtores ( $IE \geq 2,0$ ). Pereira (2012) realizou trabalho semelhante utilizando 60 isolados de substratos distintos, dentre eles café, batata e inhame, porém não obtiveram nenhum resultado positivo para a produção de amilase. O presente trabalho difere dos anteriormente citados, pois apesar de 80% dos isolados apresentarem atividade amilolítica apenas um dos isolados se mostrou bom produtor de amilase ( $IE \geq 2,0$ ).

#### 4 | CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados pelo estudo, conclui-se que isolados de Avelós (*Euphorbia tirucalli* L.), apresentam atividade de amilase extracelular, com halos de degradação significativos, destacando assim, o grande potencial

biotecnológico do estudo de isolados endófitos e sua importância para a indústria.

## REFERÊNCIAS

BERNARDI-WENZEL, J.; SIQUEIRA, A.L.; BURIN, F.A.G.; HEIN, D.P.R.; SILVEIRA, J.A.; ROMANI, S. **Isolamento e atividade antagonística de fungos endofíticos isolados de soja (*Glycinemax* L. (Merril))**. SaBios: Revista de Saúde e Biologia, v.7, n.3, p.86-96, set.-dez., 2012.

CLAY, K.; SCHARDL, C. **Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses**. American Naturalist. 2002. vol: 160, p. 99 – 127.

COSTA, L. S. **Estudo do uso do aveloz (*Euphorbia tirucalli*) no tratamento de doenças humanas: uma revisão**. [s.l.] Universidade Estadual da Paraíba, 2011.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; KHAN, S.; CHAUHAN, B. **An overview on fermentation, downstream processing and properties of alkaline protease**. App Microbiol Biotech., V. 60, p. 381-395, 2002.

GUPTA, R.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. **Microbial  $\alpha$ -Amylases: a biotechnological perspective**. Process Biochemistry, V. 38, N. 11, p. 1-18, 2003.

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. **Developments in industrially important thermostable enzymes: a review**. Biores Tech., V. 89, p. 17-34, 2003.

Keller, N. P.; Turner, G.; Bennett J. W. **Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics**. Natural Reviews Microbiology, vol: 3, p 937-947, 2005.

MYERS, A. M.; MORELL, M. K.; JAMES, M. G.; BALL, S. G. **Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal**. Plant Physiology, V. 122, p. 989-997, 2000.

PANDEY, A. **Enzyme technology**. New Delhi: Asiatech, 2005. 742 p.

SAIKKONEN, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S.H. **Evolution of endophyte–plant symbioses**. Trends in Plant Science, v.9, n.6, p.275-280, 2004.

SCHARDL, C. L.; LEUCHTMANN, A.; SPIERING, M. J. **Symbiosis of grasses with seedborne fungal endophytes**. Annual Review of Plant Biology. 2004. vol: 55, p. 315-340.

## AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DE FUNGOS BASIDIOMICETOS AO HERBICIDA GLIFOSATO

**Wagner Mansano Cavalini**

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular  
Maringá – Paraná

**Jaqueline da Silva Coelho Moreira**

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica, Maringá – Paraná

**RESUMO:** O aumento das atividades agrícolas tem intensificado a contaminação ambiental, promovendo a disposição inadequada de diferentes compostos químicos, entre eles os herbicidas, que podem também causar alguns efeitos colaterais indesejáveis, implicando na contaminação do solo, ar, recursos hídricos superficiais e subterrâneos. Dentre as tecnologias mais utilizadas na recuperação de áreas contaminadas, destaca-se a biorremediação, que dispõe principalmente de microrganismos como agentes recuperadores. O glifosato (N-Fosfonometilglicina) é o ingrediente ativo do Roundup, um dos herbicidas mais populares e utilizados não apenas na agricultura, mas também em áreas residenciais. Fungos basidiomicetos, popularmente conhecidos como cogumelos e orelhas-de-pau, são capazes de metabolizar diversos tipos de moléculas, incluindo os xenobióticos, como os pesticidas. Portanto, o objetivo deste trabalho é observar a tolerância desses fungos ao herbicida

glifosato. *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus pulmonarius* e *Ganoderma lucidum* foram cultivados em um meio contendo solo contaminados artificialmente com diferentes concentrações de herbicida glifosato e o crescimento micelial foi avaliado. Os resultados mostraram que todos os fungos testados foram tolerantes às concentrações de 2, 5 e 10 mg de glifosato/kg de solo. Também foi observado que o herbicida estimulou o crescimento de *P. chrysosporium* nas concentrações de 50, 100 e 200 mg/kg de solo. Contudo, quando o cultivo foi realizado na presença de glifosato como única fonte de nitrogênio ou fósforo em meio líquido, tal efeito não foi observado. Em vista disso, é provável que *P. chrysosporium* transforme o glifosato por um processo chamado de co-metabolismo, onde há a necessidade de outros nutrientes para suportar o crescimento e metabolismo primário do fungo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Áreas degradadas; Descontaminante. Fungo; Poluentes; Solo.

### TOLERANCE EVALUATION OF BASIDIOMYCETE FUNGI TO HERBICIDE GLYPHOSATE

**ABSTRACT:** The increase in farm activities has intensified environmental pollution, promoting the improper disposal of different chemicals



among them herbicides, which can also cause some unwanted side effects, resulting in the contamination of soil, air, surface and underground water resources. Among the most used technologies in the recovery of contaminated areas, stands out bioremediation, this has as recovery agents primarily microorganisms. Glyphosate (N-phosphonomethyl glycine) is the active ingredient of Roundup, one of the most popular herbicides and used not only in agriculture but also in residential areas. The Basidiomycete fungi are able to metabolize various types of chemicals, including xenobiotics, such as pesticides. Therefore, the objective of this work is to observe the tolerance of Basidiomycetes fungi to the glyphosate herbicide. *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus pulmonarius* and *Ganoderma lucidum* were cultivated on solid medium with artificially contaminated soil with different glyphosate concentrations and evaluated mycelial growth. The results showed that all the fungi tested were tolerant to the concentrations of 2, 5 and 10 mg glyphosate/kg soil. It was also observed that the herbicide stimulated the growth of *P. chrysosporium* at the concentrations of 50, 100 and 200 mg/kg of soil. However, this process was not observed when the fungus was cultivated in the presence of glyphosate as the only source of nitrogen or phosphorus in liquid medium. It is possible that *P. chrysosporium* transforms the glyphosate herbicide by the cometabolism process, which needs the addition of other nutrients to support the growth and primary metabolism of the fungi.

**KEYWORDS:** Degraded areas; Decontaminant; Fungus; Pollutants; Soil.

## 1 | INTRODUÇÃO

O intenso aumento da população mundial gera uma busca cada vez maior de alimentos, espaço e condições para sobrevivência, fazendo com que as ações antrópicas ao meio ambiente sejam, ao longo do tempo, cada vez maiores (Alves, 2006). Entre estas ações destaca-se a prática da agricultura, que está entre as principais fontes responsáveis pela liberação de compostos perigosos no ambiente (Harms *et al.*, 2011). Entre estes compostos, os pesticidas (fungicidas, herbicidas, inseticidas) têm sido usados por décadas sem nenhum controle, o que resulta em uma séria contaminação do solo e da água, bem como de alimentos.

Em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos tomando o posto de maior mercado mundial de agrotóxicos. Nos últimos dez anos, enquanto o mercado mundial de pesticidas cresceu 93%, o mercado brasileiro cresceu 190%. Neste contexto, existe uma concentração do mercado de agrotóxicos em determinadas categorias de produtos. Como os herbicidas que são os mais usados, representando 45%, os fungicidas 14%, os inseticidas 12% e as demais categorias de agrotóxicos 29% do total comercializado. (Anvisa & UFPR, 2012). Assim, a maioria dos agrotóxicos utilizados no combate às pragas é representada por herbicidas e fungicidas de difícil degradação e com grande capacidade de movimentação entre o solo e as águas, o que facilmente pode provocar uma variedade de efeitos tóxicos.

Em função do uso intensivo de produtos químicos na agricultura moderna e da

formação de grandes quantidades de resíduos, nos últimos anos tem havido uma maior preocupação em se conhecer o comportamento e destino dos pesticidas, nos diversos ecossistemas (Araújo, 2002). Os pesticidas possuem as finalidades de aumento da produtividade e garantia da produção de alimentos para a humanidade que se encontra em contínuo crescimento.

Atualmente, sítios contaminados são amplamente reconhecidos como potenciais ameaças à saúde humana, o que tem gerado grandes esforços na remediação destes ambientes. Algumas tecnologias que têm sido usadas são a incineração a altas temperaturas e vários tipos de decomposição química, como a oxidação por luz ultravioleta. Apesar de serem efetivas na redução dos níveis de contaminantes, estas técnicas possuem várias desvantagens, como os altos custos de aplicação, altos riscos ambientais e alta probabilidade de exposição de trabalhadores aos contaminantes. Portanto, é necessária a remoção destes compostos do ambiente através do desenvolvimento de técnicas eficientes, ecológicas e financeiramente viáveis. Neste aspecto a biorremediação é uma estratégia atrativa que consiste na aplicação de sistemas biológicos, como plantas, bactérias, fungos e enzimas para remover compostos químicos perigosos no ambiente (Vidali, 2001). Por ser uma forma natural de degradação de compostos químicos, a biorremediação promove um tratamento adequado, tendo um impacto ambiental desprezível e baixo custo (Ruggaber *et al.*, 2001).

Nas últimas décadas, a utilização de fungos basidiomicetos em estratégias de biorremediação tem sido crescente nas pesquisas. Isso se deve, pelo menos em parte, à habilidade destes fungos de degradar uma grande variedade de poluentes ambientais por meio de enzimas extracelulares de ampla especificidade. Entre os basidiomicetos mais utilizados estão os que causam a podridão branca da madeira. Estes fungos apresentam uma ampla atividade de degradação, pois produzem uma grande diversidade de enzimas extracelulares, o que os torna capazes de metabolizar os mais diversos tipos de moléculas, incluindo compostos químicos estranhos lançados no ambiente (xenobióticos), como os pesticidas. Os fungos da podridão branca são capazes de degradar todos os polímeros da madeira, incluindo a lignina, por isso são conhecidos como fungos ligninolíticos (Barr & Aust 1994).

As enzimas extracelulares microbianas mais importantes nos processos de biorremediação são a lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase. A natureza inespecífica do processo de degradação permite que essas enzimas sejam utilizadas na degradação de poluentes ambientais. Contudo, em alguns casos a degradação de xenobióticos por estes micro-organismos pode proceder intracelularmente, através do complexo enzimático citocromo P450 (Harms *et al.*, 2011). Logo, a diversidade metabólica dos fungos e suas características particulares de crescimento (Ex.: rapidez relativa de colonização de substratos) indicam que eles são bem adequados para biorremediação de solos.

Os estudos referentes à degradação de poluentes por fungos basidiomicetos

tiveram início em 1980 com linhagens de *Phanerochaete chrysosporium*. Desde então, vários autores evidenciaram a capacidade desse organismo em degradar, além da lignina, um amplo espectro de poluentes como DDT [1,1-bis (4clorofenol)-2,2,2-tricloetano], lindano (hexaclorociclohexano), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH), dioxinas (Cameron *et al.*, 2000) e outros poluentes orgânicos clorados (Zouari *et al.*, 2002). O sucesso desta espécie de basidiomiceto tem estimulado estudos sobre outros fungos ligninolíticos com potencial para a biorremediação. É o caso de *Pleurotus pulmonarius*, *Coriolus versicolor* e *Tremetes versicolor* (Masaphy *et al.*, 1996, Hiratsuka *et al.*, 2001, Uhnáková *et al.*, 2009).

O Glifosato (N-Fosfonometilglicina) é o ingrediente ativo do Roundup, um dos herbicidas mais populares e utilizados não apenas na agricultura, mas também em áreas residenciais. Ele causa inibição enzimática da via metabólica do ácido chiquímico, resultando em depleção de aminoácidos aromáticos essenciais necessários para o crescimento e sobrevivência da planta (Andrea *et al.*, 2003). A meia-vida do glifosato no solo varia de alguns dias até 3 meses, porém há relatos de períodos maiores de persistência, que variam de 100 a 1.000 dias (Andrea *et al.*, 2003).

O glifosato é metabolizado por plantas via duas rotas semelhantes e presentes em micro-organismos (Fig. 1). Uma destas rotas envolve a quebra da ligação carbono-nitrogênio (C-N) para produção de ácido aminometilfosfônico (AMPA), e a outra quebra a ligação carbono-fósforo (C-P) por uma C-P liase para gerar o N-metilglicina (sarcosina) (REDDY *et al.*, 2004).

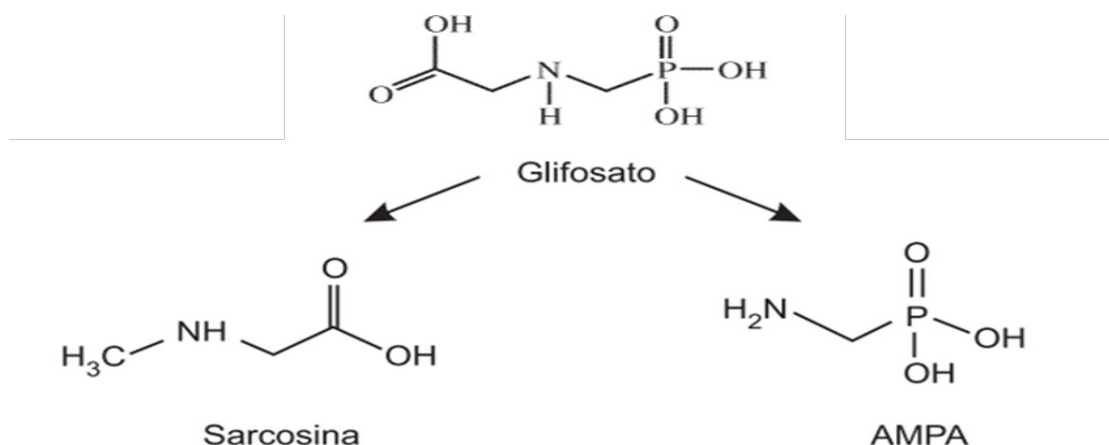


Figura 1 – Rota de metabolização do Glifosato.

Fonte: AMARANTE JR., 2002.

Devido as suas propriedades físico-químicas específicas, o glifosato é fortemente adsorvido ao solo (Many & Barriuso, 2005). Na maioria dos solos, é essencialmente imóvel, mas a mobilidade varia conforme o pH do solo. O AMPA se decompõe rapidamente, e resulta na lixiviação de quantidades mínimas nos solos (Solomon & Thompson, 2003).

A degradação do glifosato por microrganismos que utilizam o produto como

fonte de energia, fósforo, nitrogênio e carbono, se faz por meio de duas rotas catabólicas, produzindo o AMPA como o principal metabólito, e sarcosina como metabólito intermediário na rota alternativa (Dick & Quinn, 1995). O AMPA é o produto da biodegradação do glifosato em sistemas naturais antes da mineralização final e a quebra do produto em complexos fosfonados (Barja & Afonso, 2005). O AMPA por sua vez é degradado em dióxido de carbono e amônia (Rueppel *et al.*, 1977).

Este trabalho teve como objetivo analisar a tolerância de fungos da podridão branca da madeira em meios de cultivo contendo solo contaminado com o herbicida glifosato.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Coleta do solo

O solo foi obtido de um local livre de aplicação recente de pesticidas, sendo coletado nas intermediações do campus da Universidade Estadual de Maringá. As amostras de solo foram coletadas e armazenadas conforme metodologia descrita por Pramer & Bartha (1972). Detritos como pedras foram removidos manualmente e passando o solo por uma peneira de aproximadamente 2 mm de diâmetro e estocado em frascos de polietileno e armazenados sob refrigeração a 4°C até a realização dos estudos.

### 2.2 Herbicida

A solução estoque de glifosato foi preparada pela diluição do herbicida comercial Roundup Original® (360 g/l de glifosato) em água, atingindo a concentração de 3,6 g/l (21,2 mM). A solução foi esterilizada por filtração através de uma membrana Milipore (0,45 µm) e estocada a 4°C até o uso.

### 2.3 Micro-organismos e inóculo

Os fungos *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus pulmonarius*, *Ganoderma lucidum* e *Trametes sp.*, obtidos de culturas mantidas no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia da Universidade Estadual de Maringá, que foram cultivados em meio batata-dextrose-ágar (BDA) por até duas semanas a 28°C em estufa incubadora tipo BOD. Quando as placas de Petri estavam completamente cobertas com o micélio, discos miceliais (18 mm de diâmetro) foram feitos e usados como inóculo.

### 2.4 Cultivos sólidos na presença de solo e glifosato

Em um dos meios de cultivo foi utilizada uma solução mineral (Vogel, 1956) suplementada com glicose (1%) e adicionada de ágar (1,8%) e solo (8% p/v). O conjunto foi autoclavado a 121 °C por 20 min. Após resfriamento, estes meios foram

contaminados artificialmente com diferentes concentrações de glifosato. Em seguida os meios foram vertidos em placas de Petri (90x15 mm) em condições estéreis. Inoculou-se, no centro geométrico de cada placa de Petri, em câmara de fluxo laminar contínuo, um disco de inóculo. As placas foram mantidas a 28 °C no escuro em estufa incubadora tipo BOD, observando-se o desenvolvimento do micélio. Para cada concentração de glifosato, realizaram-se três replicatas. Meios de cultivo sem adição de herbicida foram utilizados como controle.

Os fungos foram testados em três diferentes concentrações de glifosato, sendo: 2 mg de glifosato/kg de solo, 5 mg de glifosato/kg de solo e 10 mg de glifosato/kg de solo. Posteriormente, foram testadas concentrações maiores de glifosato (50 mg de glifosato/kg de solo, 100 mg de glifosato/kg de solo e 200 mg de glifosato/kg de solo) somente para o fungo *P. chrysosporium*.

## 2.5 Cultivos em meio líquido

A capacidade de *P. chrysosporium* de utilizar a molécula de glifosato como nutriente foi avaliada em condições líquidas estacionárias a 28°C e no escuro. Três discos miceliais (inóculo) foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 25 ml de solução mineral (Vogel, 1956) suplementada com 1% de glicose e glifosato. Quando o herbicida foi usado como única fonte de nitrogênio e fósforo, nitrato de amônia ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) e fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) foram substituídos por glifosato a uma concentração final de 2mM. O controle consistiu na solução mineral completa suplementada com glicose e com as concentrações de fósforo ou nitrogênio ajustadas segundo a quantidade fornecida por 2mM de glifosato. Os meios de cultivo sem glifosato foram previamente esterilizados por autoclavagem a 121 °C por 15 minutos. Realizou-se a pesagem da massa seca após 7 dias e 14 dias de cultivo.

## 2.6 Avaliação do crescimento micelial em placas de Petri

Para avaliação do crescimento micelial, foram feitas medições com régua milimétrica a cada 12 ou 24 h, tomadas a partir da borda do disco do inóculo até o limite de crescimento do micélio. Em cada placa de Petri, tomaram-se quatro registros de crescimento por leitura (um em cada quadrante), registrando-se o diâmetro em milímetros das colônias até que a placa estivesse totalmente colonizada (Fig. 2), sendo estes valores utilizados para a determinação da média de crescimento fúngico de cada meio de cultivo. A média e o desvio padrão do crescimento do micélio foram calculados e as diferenças determinadas pela análise de variância e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

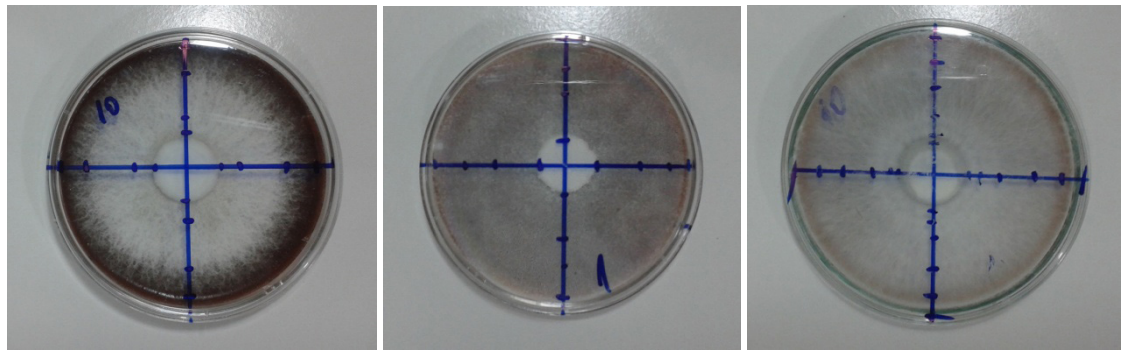


Figura 2 - Medidas do crescimento do micélio em meio de cultivo sólido contendo solo.

### 3 | RESULTADOS

Todas as três espécies de fungo testadas foram tolerantes ao herbicida glifosato nas concentrações de 2 mg/kg de solo, 5mg/kg solo e 10 mg/kg solo. Isto pode ser evidenciado pelo fato de que não houve alteração significativa no crescimento fúngico quando os tratamentos foram comparados ao controle, como mostrado na figura 3 para o fungo *P. pulmonarius*.

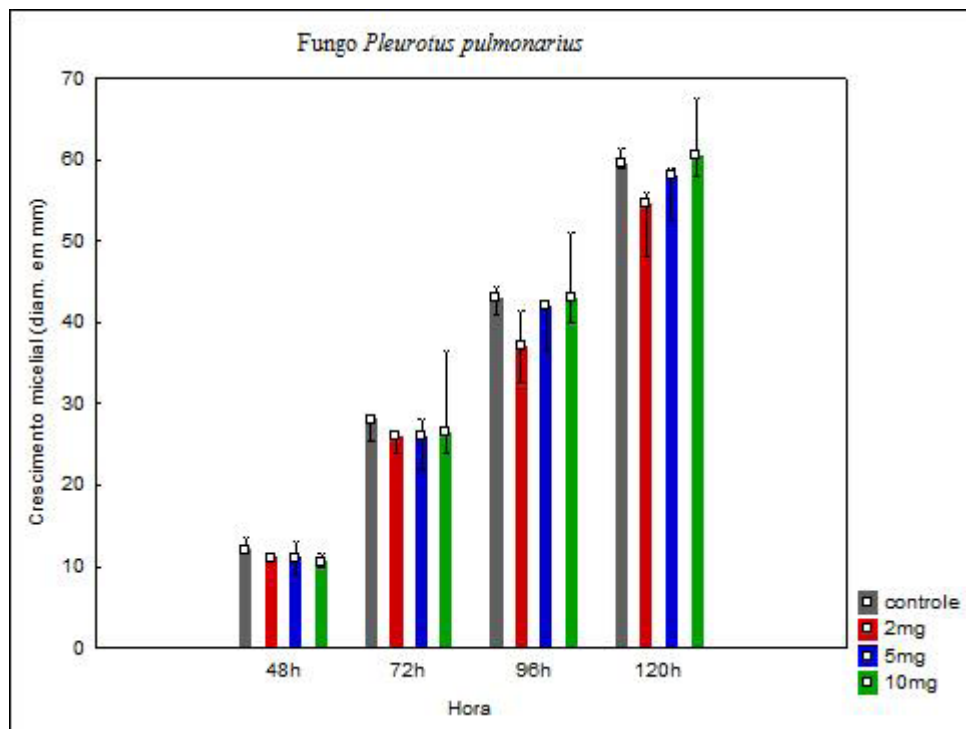


Figura 3 - Crescimento de *P. pulmonarius* em placa de Petri contendo solução mineral suplementada com ágar (1,8%) e glicose (1%) e solo (8%).

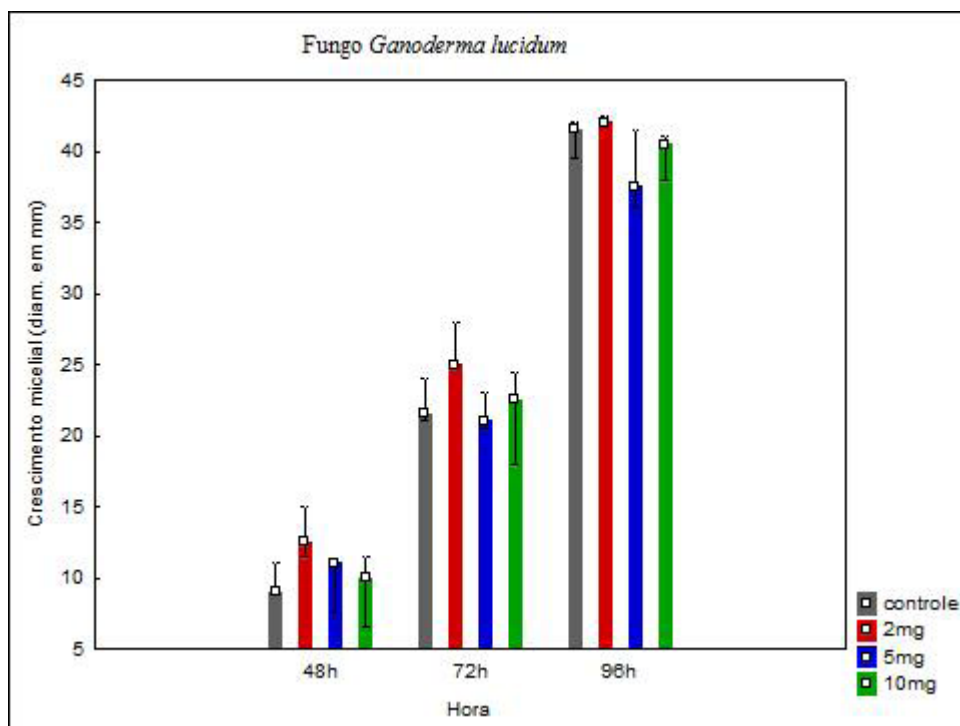


Figura 4 - Crescimento de *G. lucidum* em placa de Petri contendo solução mineral suplementada com ágar (1,8%) e glicose (1%) e solo (8%).

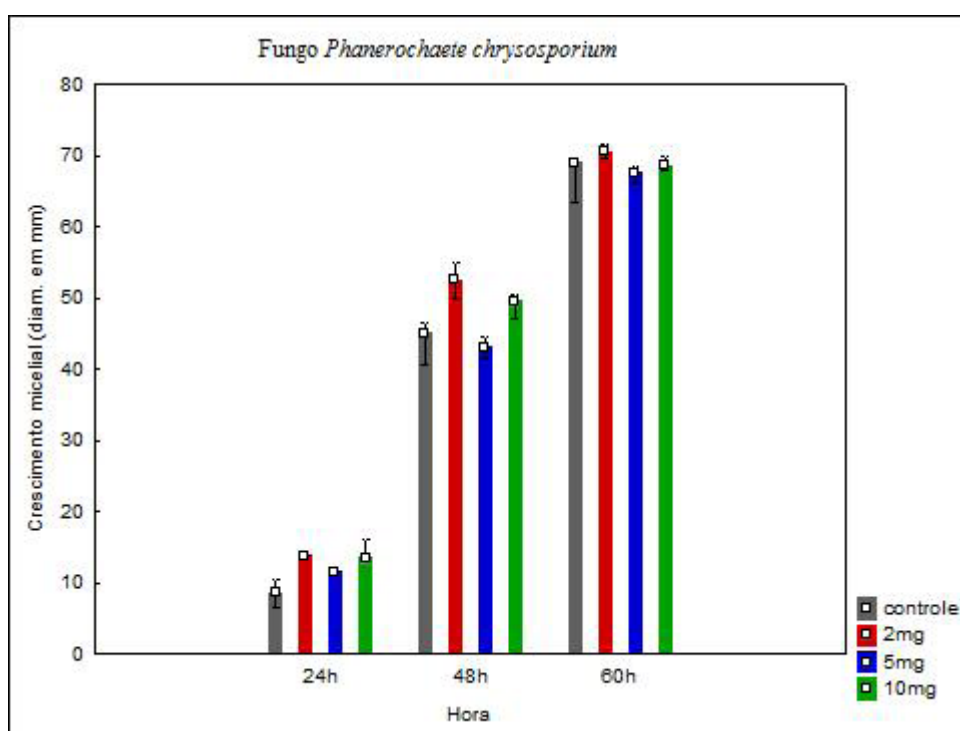


Figura 5 - Crescimento de *P. chrysosporium* em placa de Petri contendo solução mineral suplementada com ágar (1,8%) e glicose (1%) e solo (8%).

*Phanerochaete chrysosporium* é considerado um fungo modelo em estudos de biorremediação e os testes mostraram um crescimento mais rápido do que os outros fungos testados, este fato pode ser demonstrado, visto que após 24 horas de cultivo já foi possível realizar as medições do micélio (figura 5), enquanto que para *G. lucidum*, figura 4, e *P. pulmonarius*, figura 3, a primeira medida pôde ser realizada somente

após 48 horas. Por este motivo, *P. chrysosporium* foi escolhido para experimentos subsequentes com glifosato. Em um deles, as concentrações do herbicida foram aumentadas para 50 mg/kg de solo, 100 mg/kg de solo e 200 mg/kg de solo. O crescimento do fungo não foi inibido por estas concentrações de glifosato, o que sugere que este fungo pode facilmente crescer em um meio suplementado com o herbicida sem sofrer nenhum efeito tóxico. Surpreendentemente, o crescimento foi estimulado pela adição do herbicida (Tabela 1). Enquanto que o controle atingiu a borda da placa de Petri após 60 horas, os cultivos contendo glifosato cresceram rapidamente, atingindo o mesmo nível após 48 horas (50 mg/kg de solo) e 36 horas (100 e 200 mg/kg de solo). Adicionalmente, no tempo de 24 horas é possível observar que na presença de glifosato o crescimento foi cerca de 3,5 vezes maior comparado ao controle.

Glifosato/kg de solo	Crescimento micelial (mm)			
	24 hs	36 hs	48 hs	60 hs
0 (controle)	8,5 ± 2,0	ND	44 ± 3,1	67,1 ± 3,1
50 mg	27,6 ± 0,7*	46,0 ± 0,5	64,1 ± 1,2*	**
100 mg	32,5 ± 3,4*	56,8 ± 4,2	**	**
200 mg	25,5 ± 4,9*	59,2 ± 1,0	**	**

Tabela 1. Crescimento de *P. chrysosporium* em meio sólido contendo diferentes concentrações de glifosato

Asterisco sobrescrito indica os tratamentos de diferem significativamente do controle ( $P < 0,05$ ) quando analisados pelo teste de Tukey.

ND: não determinado

\*\* Não determinado devido ao micélio já ter atingido o limite da placa de Petri.

A possível utilização de glifosato como única fonte de fósforo ou nitrogênio por *P. chrysosporium* também foi analisada em meios líquido sem adição de solo. O cultivo controle apresentou um ligeiro crescimento, atingindo uma biomassa seca de 60 mg após 7 dias de cultivo, a qual praticamente não se alterou após 14 dias de cultivo. Contrariamente, na presença de glifosato como única fonte de nitrogênio ou fósforo, o fungo *P. chrysosporium* não apresentou nenhum desenvolvimento micelial.

## 4 | DISCUSSÃO

A tolerância *in vitro* de fungos da podridão branca a pesticidas potencialmente tóxicos tem sido reportada com frequência na literatura (Fratila-apachitei *et al.*, 1999, Torres-Duarte *et al.*, 2009; Coelho *et al.*, 2010). Contudo, estudos envolvendo o solo adicionado aos meios de cultivo são escassos, porém não menos importantes, visto que permitem a extrapolação do potencial de crescimento fúngico em determinados ambientes, sendo este um dos requisitos para a biorremediação de sítios contaminados. Sucessivas aplicações de glifosato na mesma área diminui o potencial de degradação dos micro-organismos nativos do solo, resultando em poluição devido a uma dificuldade



de metabolizar a molécula (Andrea *et al.*, 2003).

Neste estudo foi possível demonstrar a tolerância de três espécies de fungos ligninolíticos (*Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus pulmonarius* e *Ganoderma lucidum*) ao herbicida glifosato adicionado aos meios de cultivo contendo solo, com o objetivo de se aproximar o máximo do ambiente natural onde estes fungos poderiam ser utilizados como agentes de biorremediação.

Grande parte dos trabalhos evidencia a degradação de glifosato por bactérias (Kryuchkova *et al.*, 2014, Sharifi *et al.*, 2015), sendo a utilização de fungos em estudos muito escassa. Contudo alguns trabalhos demonstraram a utilização de fungos, na maioria das vezes em cultivos líquidos, não envolvendo meios adicionados de solo (Eman *et al.*, 2013).

Araújo *et al.* (2003) observaram que solos tratados constantemente com glifosato (2,16 mg/kg de solo) têm sua população de fungos aumentada. Os resultados com *P. chrysosporium* mostraram que o crescimento micelial é estimulado na presença de glifosato, o que também está de acordo com estudos realizados com os fungos *Trichoderma viridae*, *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporum* em cultivos líquidos sob agitação (Adelowo *et al.*, 2014). Uma possível razão para isto pode ser a utilização do glifosato como fonte de nutrientes, como fósforo e nitrogênio, como já demonstrado em estudos com fungos filamentosos (Adelowo *et al.*, 2014) e a bactéria *Enterobacter cloacae*, que utiliza glifosato como fonte de fósforo (Kryuchkova *et al.*, 2014). Um dos caminhos possíveis para realizar este processo é pela quebra da ligação C-P ou C-N da molécula do herbicida pelo micro-organismo.

Nos experimentos em líquido, onde se utilizou a molécula de glifosato como única fonte de fósforo ou nitrogênio, não houve crescimento de *P. chrysosporium*, demonstrando que a molécula do herbicida não pode ser primariamente catabolizada pelo fungo. A partir destes resultados, parece provável que esteja ocorrendo um processo de degradação muito comum entre micro-organismos, no qual a biotransformação de uma molécula depende da presença de substratos capazes de suportar o crescimento microbiano, processo chamado de cometabolismo. Caso não haja o substrato principal, a degradação mediada pelos micro-organismos não ocorre para uma dada molécula, neste caso, o herbicida. Por outro lado, na presença destas fontes, a metabolização do substrato primário poderá gerar enzimas capazes de atuar na degradação do contaminante de interesse. Em comunidades microbianas no solo, o produto da quebra por cometabolismo pode ser utilizado por outras espécies, levando a uma completa degradação (mineralização) do composto (Vidali, 2001).

Um dos grandes objetivos de estudos sobre a tolerância de micro-organismos a poluentes presentes no solo é a aplicação nestes organismos na técnica bioaugmentação, onde ocorre um aumento da microbiota através da inoculação de micro-organismos alóctones (exógenos) no sítio contaminado (Vidali, 2001). Segundo Andrade *at al.* (2010), o emprego da bioaugmentação depende, primeiramente, da concordância e da autorização de órgãos governamentais e de agências de fiscalização ambiental.

## 5 | CONCLUSÃO

O estudo do crescimento fúngico em meios contendo solo é muito importante para a extrapolação do potencial de colonização destes micro-organismos em ambientes contaminados. Os resultados observados neste trabalho mostraram que *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus pulmonarius* e *Ganoderma lucidum* foram tolerantes à faixa de concentração do herbicida testado. O herbicida glifosato pode ser utilizado por *P. chrysosporium* como fonte de nutrientes, já que estimulou o crescimento do fungo. Contudo, este processo não foi observado quando se cultivou o fungo na presença de glifosato como única fonte de nitrogênio ou fósforo. É possível que o fungo necessite da adição de substratos para suportar seu crescimento e, posteriormente, transforme glifosato por co-metabolismo. Contudo, mais experimentos devem ser realizados a fim de confirmar estas hipóteses.

## REFERÊNCIAS

ADELOWO, F.E.; OLU-AROTIOWA O.A, AMUDA, O.S. **Biodegradation of Glyphosate by Fungi Species.** *Advances in Bioscience and Bioengineering* ISSN 2201-8336 v.2, n.1, 2014, p. 104-118

ALVES, M.C. **Recuperação dos solos degradados pela agricultura.** In: *Encontro Nacional sobre Educação Ambiental na Agricultura*, v.5, 2006, Campinas. Anais. Campinas: Instituto Agrônomo, 2006. 1-CD-ROM.

AMARANTE JR., O. P. et al. *Química Nova*, São Paulo, v.25, n.3, 2002 (adaptado).

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. **Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados.** *Eclética Química*, São Paulo, v.35, n.3 – setembro, 2010.

ANDREA MM, PERES TB, LUCHINI LC, BAZARIN S, PAPINI S, MATALLO MB, et al. **Influence of repeated application of glyphosate on its persistence and soil bioactivity.** *Pesq Agropec Bras* 2003; 38:1329–35.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Agrotóxicos e toxicologia: programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos.** Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/resultados\\_PARA\\_2008.pdf](http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/resultados_PARA_2008.pdf) Acesso em 17 de outubro de 2009.

ANVISA & UFPr. **Seminário de mercado de agrotóxico e regulação.** ANVISA, Brasília, 11 abril de 2012.

ARAÚJO, A. S. F. **Biodegradação, extração e análise de glifosado em dois tipos de solos.** 2002. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura de Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

ARAÚJO A.S.F., MONTEIRO R.T.R, ABARKELI R.B. **Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils.** *Chemosphere* 52 (2003) p. 799–804.

BARJA, B. C.; AFONSO, M. S. **Aminomethylphosphonic acid and glyphosate adsorption onto goethite: a comparative study.** *Environmental Science & Technology, Iowa*, v.39, n.2, p.585-592, 2005.

BARR DP AND AUST SD. **Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants** (1994). *Environment Science Technology*, v.28 n.2, p. 79-87.

- CAMERON, M.D.; TIMOFEEVSKI, S.; AUST, S.D. **Enzimology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics.** *Applied Microbiology Biotechnology*, v.54, p.751-758, 2000.
- COELHO JS, SOUZA CGM, OLIVEIRA AL, BRACHT A, COSTA MAF, PERALTA RM. **Comparative Removal of Bentazon by *Ganoderma lucidum* in Liquid and Solid State Cultures.** *Current Microbiology* (2010) v.60 p .350–355
- DICK, R. E.; QUINN, J. P. **Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation.** *Applied Microbiology Biotechnology*, Berlin, v.43, n.3, p.545-550, 1995.
- EMAN A, ABDEL-MEGEED A, SULIMAN AA, SADIK MW, SHOLKAMY E. **Biodegradation of Glyphosate by fungal strains isolated from herbicides polluted-soils in Riyadh area.** *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*. v.2, n.8, (2013) p. 359-381
- FRATILA-APACHITEI LE, HIRST JA, SIEBEL MA, GIJZEN HJ. **Diuron degradation by *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 in synthetic and natural media.** *Biotechnology Letters* 1999 v.21, p. 147-154.
- HARMS H, SCHLOSSER D, WICK LY. 2011. **Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals.** *Nature Reviews Microbiology*, v.9 n.3, p. 177-192.
- HIRATSUKA N, WARIISHI N, TANAKA H. **Degradation of diphenyl ether herbicides by the lignin-degrading basidiomycete *Coriolus versicolor*** (2001). *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.57, p. 563–571.
- INCA. **Posicionamento do instituto nacional de câncer José Alencar Gomes da Silva acerca dos agrotóxicos** (2015). [http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento\\_do\\_inca\\_sobre\\_os\\_agrotoxicos\\_06\\_abr15.pdf](http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr15.pdf). Acesso em 26 de março de 2015.
- KRYUCHKOVA YV, BURYGINA GL, GOGOLEVAB NE, GOGOLEVB YV, CHERNYSHOVA MP, MAKAROVA OE, FEDOROVA EE, TURKOVSKAYA OV. **Isolation and characterization of a glyphosate-degrading rhizosphere strain, *Enterobacter cloacae* K7.** *Microbiological Research* 169 (2014), p. 99– 105.
- MANY, L.; BARRIUSO, E. **Glyphosate adsorption in soil compared to herbicides replaced with the introduction of glyphosate resistant crops.** *Chemosphere*, Oxford, v.61, n.6, p.844-855, 2005.
- MASAPHY S, LEVANON D, HENIS Y. **Degradation of atrazine by the lignocellulolytic fungus *Pleurotus pulmonarius* during solid-state fermentation** (1996). *Bioresource Technology*, p. 56, 207-214.
- PRAMER, D., BARTHA, R. **Preparation and Processing of Soil Samples for Biodegradation Studies** (1972). *Environmental Letters*, v.2, p. 217-224.
- REDDY, K. N.; RIMANDO, A. M.; DUKE, S. O. **Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, California, v.52, n.16, p.5139-5143, 2004.
- RUEPPEL, M. L.; BRIGHTWELL, B. B.; SCHAEFER, J.; MARVEL, T. T. **Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, California, v.25, n.3, p.517-528, 1977.
- RUGGABER TM, ASCE M, TALLEY JW. **Enhancing bioremediation with enzymatic processes: a review (2001).** *Practice periodical of hazardous, toxic and radioactive waste management*, v.10 n.2, p. 73-85.

- SHARIFI Y, POURBABAEI AA, JAVADI A, ABDOLMOHAMMADI MH, SAFFARI M, MOROVVATI A. **Biodegradation of Glyphosate by fungal strains isolated from herbicides polluted-soils in Riyadh área.** *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* (2013) v.2 n.8, p. 359-381.
- SHARIFI Y, POURBABAEI AA, JAVADI A, HOSSEIN M, ABDOLMOHAMMADI MH, SAFFARI M, MOROVVATI A. **Biodegradation of glyphosate herbicide by *Salinicoccus* spp isolated from Qom Hoze-soltan lake, Iran.** *Environmental Health Engineering and Management Journal* 2015, v.2 n.1, p. 31–36.
- SOLOMON, K. R.; THOMPSON, D. G. **Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate.** *Journal of Toxicology and Environmental Health B*, Philadelphia, v.6, n.3, p.211-246, 2003.
- TORRES-DUARTE C, ROMAN R, TINOCO R, VAZQUEZ-DUHALT R. **Halogenated pesticide transformation by a laccase-mediator system.** *Chemosphere* 2009 p. 77,687-692.
- UHNÁKOVÁ B, PETŘÍČKOVÁ A, BIEDERMANN D, HOMOLKA L, VEJVODA V, BEDNÁŘ P, PAPOUŠKOVÁ B, SULC M, MARTÍNKOVÁ L. **Biodegradation of brominated aromatics by cultures and laccase of *Trametes versicolor*** (2009). *Chemosphere*, v.79 n.6, p. 826-832.
- VIDALI M. **Bioremediation. An overview** (2001). *Pure Applied Chemical*. v.73 n.7, p.1163-1172.
- VOGEL HA (1956) **A convenient growth medium for *Neurospora crassa*.** *Microb Genet Bull* v.13, p.42–43
- ZOUARI, H.; LABAT, M.; SAYADI, S. **Degradation of 4-chorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in free and immobilized cultures.** *Bioresource Technology*, v.84, p.145-150, 2002.

## IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA DE ISOLADOS CLÍNICOS DO COMPLEXO *Candida Parapsilosis*

### **Carolina Maria da Silva**

Universidade de Pernambuco - UPE  
Serra Talhada – PE

### **Ana Maria Rabelo de Carvalho**

Centro Universitário do Vale Ipojuca  
UNIFAVIPIWYDEN  
Caruaru – PE

### **Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo**

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE  
Recife – PE

### **Cícero Pinheiro Inácio**

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE  
Recife – PE

### **Reginaldo Gonçalves de Lima Neto**

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE  
Recife – PE

### **Rejane Pereira Neves**

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE  
Recife – PE

**RESUMO:** A ocorrência de infecções fúngicas, sobretudo as invasivas, por espécies do Gênero *Candida* tem se tornado alarmante em todo mundo. Apesar de *C. albicans* permanecer como a levedura mais frequentemente isolada nos mais diversos casos de candidíases, espécies de *Candida* não - *C. albicans* têm emergido, a exemplo *C. parapsilosis* citada como importante causa de infecção no ambiente hospitalar, exibindo impacto clínico relevante

com graus elevados de resistência às drogas comercialmente disponíveis. Atualmente, sabe-se que na verdade *C. parapsilosis* constitui um complexo formado por três espécies fenotipicamente distintas, *C. parapsilosis* (*stricto sensu*), *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Estas leveduras, apesar das semelhanças fenotípicas, possuem diferenças genotípicas e em relação à virulência, sendo correlacionadas com características epidemiológicas. Diante deste contexto, um dos grandes desafios tem sido obter uma correta distinção entre as espécies que compõem o complexo, visto que a caracterização fenotípica e bioquímica apenas garante um direcionamento taxonômico, sem, entretanto, diferenciar com precisão os representantes do Complexo. Neste panorama, a proposta de uma identificação polifásica, baseada na taxonomia clássica (fenotípica e bioquímica), proteômica e métodos moleculares tem sido de grande relevância para correta identificação das espécies, conseqüentemente permitindo uma melhor definição de perfis epidemiológicos, bem como definição de prognóstico e tratamento dos pacientes.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Candida parapsilosis*; Infecção fúngica; Taxonomia.

**POLYPHASIC IDENTIFICATION OF *Candida Parapsilosis* COMPLEX CLINICAL ISOLATES**

**ABSTRACT:** The occurrence of fungal

infections, especially invasive ones, by species of the genus *Candida* has become alarming worldwide. Although *C. albicans* remains the most frequently isolated yeast in the most diverse cases of candidiasis, non - *C. albicans* *Candida* species have emerged, such as *C. parapsilosis*, which is cited as a major cause of infection in the hospital environment, showing relevant clinical impact with high degrees of resistance to commercially available antifungal drugs. Actually, it is known that in fact *C. parapsilosis* constitutes a complex formed by three phenotypically distinct species, *C. parapsilosis* (sensu stricto), *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*. Despite their phenotypic similarities, these yeasts have genotypic and virulence differences and are correlated with epidemiological characteristics. Given this context, one of the great challenges has been to obtain a correct distinction between the species from the complex, since the phenotypic and biochemical characterization only guarantees a taxonomic direction, without, however, accurately differentiating the species from the Complex. In this scenario, the proposal of a polyphasic identification, based on classical taxonomy (phenotypic and biochemical), proteomics and molecular methods has a great relevance for the correct identification of species, thus allowing a better definition of epidemiological profiles, as well as definition of prognosis and treatment of patients.

**KEYWORDS:** *Candida parapsilosis*; Fungal infection; Taxonomy.

## 1 | INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas invasivas sempre foram foco de preocupação nos centros médicos, pelo seu caráter oportunista, pela estreita associação com pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva, pelo potencial lesivo e letal destas infecções e crescentes índices de resistência aos fármacos antifúngicos utilizados. Neste grupo de infecções, destacam-se os casos de candidíase, especialmente as de caráter invasivo (candidemia), frequentemente relacionada ao uso de cateteres intravasculares de demora. A capacidade desses microrganismos em colonizar as mãos dos profissionais de saúde e formar biofilmes em dispositivos tem sido associada à ocorrência de surtos hospitalares e altas taxas de mortalidade (ARASTEHFAR et al., 2019).

O perfil das espécies de *Candida* diagnosticadas destes casos clínicos tem sofrido intensa mudança epidemiológica em diferentes partes do mundo, fruto de pressões seletivas, mutações intraespecíficas e adaptações que o próprio ambiente e o amplo uso de antifúngicos conferiram a estes microrganismos, com o passar dos anos (ARASTEHFAR et al., 2019).

Embora a incidência de candidemia por *C. albicans* esteja diminuindo, esta espécie ainda permanece sendo a mais frequente, seguida por *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (DA MATTA et al., 2017; LAMOTH et al., 2018). Recentemente, casos mundialmente emergentes de infecção por *C. auris*, espécie multirresistente

extremamente virulenta, tem sido descrita (ANVISA, 2017).

Neste contexto, as leveduras do complexo *Candida parapsilosis* têm sido amplamente citadas como importante causa de infecção, exibindo impacto clínico relevante com graus elevados de resistência às drogas comercialmente disponíveis. Dentro deste complexo, as três espécies crípticas apresentam real potencial patogênico, como *C. parapsilosis* (*stricto sensu*), *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (TAVANTI et al., 2005; ARASTEHFAR et al., 2019). Estas leveduras demonstram semelhanças fenotípicas; no entanto, possuem diferenças em relação à virulência, sendo correlacionada com características epidemiológicas. Dessa maneira, o complexo *Candida parapsilosis* tem sido uma das principais espécies em estudos epidemiológicos e análises baseadas em DNA, os quais mostram que 1-10 % das infecções e colonizações são causadas por *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*. Dentre os estudos que avaliam a virulência do complexo, observa-se que *C. metapsilosis* tem sido a espécie que possui menor invasão e a menor prevalência em infecções humanas, enquanto que *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis* (*strictu sensu*) são capazes de invadir, colonizar e de infectar de forma mais grave o hospedeiro. Das três espécies, *Candida parapsilosis* é o patógeno mais frequente em infecções invasivas. É importante ressaltar que o complexo *C. parapsilosis* é considerado o segundo agente de candidemia mais importante na América Latina (GONÇALVES et al., 2010; BERTINI et al., 2013; CORDEIRO et al., 2014).

Neste sentido, diversos trabalhos relatam a dificuldade para identificar cepas de leveduras, em nível de espécie, por métodos convencionais, uma vez que são dependentes de variáveis como crescimento em meios de cultivo e temperatura de incubação e em alguns casos, a interpretação pode ser considerada subjetiva (PUTIGNANI et al., 2011). Segundo Lima-Neto et al. (2014), a identificação das leveduras do gênero *Candida* representa um grande desafio, especialmente quando as cepas-referência ainda não estão inclusas na base de dados dos sistemas de identificação semi automatizados ou automatizados. Assim, estas dificuldades fazem tanto da biologia molecular como das abordagens espectrais, cruciais para um diagnóstico preciso.

## 2 | IMPORTÂNCIA CLÍNICA DO COMPLEXO *Candida Parapsilosis*

Dentre os agentes etiológicos de infecções por leveduras, destaca-se a espécie *C. albicans* (ELIAKIM-RAZ et al., 2016). Embora a *C. albicans* seja a causa mais comum, infecções causadas por espécies de *Candida* não *C. albicans* estão aumentando. Dentro deste contexto, como visto anteriormente, o complexo *C. parapsilosis* emergiu como um importante patógeno fúngico e se tornou uma das principais causas de fungemia (BARCHIESI et al., 2016).

O complexo *C. parapsilosis* possui taxa de mortalidade menor quando

comparado a infecções por outras espécies de *Candida*. Porém, possui características favoráveis ao processo infeccioso como a sua capacidade de desenvolver biofilmes em dispositivos intravasculares, alta afinidade pela nutrição parenteral e uma baixa suscetibilidade intrínseca às equinocandinas (BORGHI et al., 2011).

Essas leveduras são relatadas como as mais envolvidas em infecções da corrente sanguínea em neonatos, envolvidas em aproximadamente 83% dos casos. Esse dado reflete está associado aos fatores descritos anteriormente e ainda a serem comensais da pele, favorecendo a transmissão horizontal através das mãos (LOVERO et al., 2016).

Embora o potencial patogênico das três espécies seja caracterizado, pouco se sabe sobre as possíveis diferenças de sua virulência. Estudos anteriores relataram que *C. metapsilosis* apresenta menor virulência (GAGO et al., 2014). No entanto, as três espécies do grupo *C. parapsilosis* possuem um potencial patogênico similar como agentes de candidíase disseminada (TREVINO-RANGEL et al., 2014).

*C. parapsilosis sensu stricto* apresenta uma maior incidência em todo o mundo, sendo uma da espécie mais isolada de infecções hematogênicas, no entanto a distribuição de *C. orthopsilosis* e *C. methapsilosis* é bastante heterogêneo, o que varia de acordo com o regiões, locais clínicos e sítios anatômicos (GE et al., 2012). *C. parapsilosis sensu stricto* é a segunda espécie mais frequentemente isolada do sangue na Ásia, América Latina e alguns países europeus, superando a frequência de *C. albicans* em alguns países (RUIZ et al., 2013).

A alta frequência dessa espécie em amostras de sangue em pacientes gravemente enfermos pode ser explicada por vários fatores, incluindo a alta afinidade dessas espécies para dispositivos vasculares e instrumentação médica e sua capacidade de colonização nas mãos de profissionais de saúde (GONZÁLEZ et al., 2013; DELFINO et al., 2014).

Vários estudos encontraram variações nas frequências de *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* em casos de candidemia. Na Espanha, entre as 171 cepas identificadas como parte do complexo *C. parapsilosis*, 2,4% mostraram-se *C. orthopsilosis* e 1,2% mostraram-se *C. metapsilosis* (MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014). No Brasil, um estudo de Ruiz et al. (2013) apresentaram frequências de 10,2% para *C. orthopsilosis* e 6,1% para *C. metapsilosis* em cepas isoladas de sangue. Uma possível explicação para a baixa frequência ou ausência de *C. metapsilosis* como causa de candidemia é a sua baixa capacidade de expressar fatores de virulência (ORSI et al., 2010).

Esse complexo também vem sendo frequentemente isolado em infecções da cavidade oral, sendo a *C. parapsilosis sensu stricto* e *C. metapsilosis* as mais representativas em pacientes imunossuprimidos e a colonização da cavidade oral por espécies de *Candida* é reconhecida como um fator predisponente a ocorrência de candidemia (RODRÍGUEZ; JEWUCHOWICZ, 2016). Dessa forma, *C. parapsilosis sensu stricto* também adquiriu importância no campo da estomatologia. Alguns estudos relataram esta espécie como a segunda levedura mais frequentemente isolada da



cavidade oral, após *C. albicans* (RODRÍGUEZ et al., 2018).

### 3 | IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA DO COMPLEXO CANDIDA PARAPSILOSIS

Uma identificação precisa, rápida e econômica de espécies de fungos tem sido um dos principais objetivos na micologia, especialmente quando complexos de espécies estão envolvidos, pois a identificação baseada em características fenotípicas e bioquímicas é frequentemente inconclusiva, servindo como uma forma de direcionamento para a conclusão da taxonomia por meio de outras técnicas, tais como a espectrometria de massa e métodos moleculares (BARBEDO et al., 2016).

#### 3.1 Taxonomia Clássica

A identificação do gênero *Candida* através da taxonomia clássica, apesar de possuir boa sensibilidade, permanece como um método trabalhoso e demorado e não permite a distinção de espécies próximas como é o caso das leveduras do complexo *C. parapsilosis* (YAMAN, AKIAR, CAN, 2012).

Entretanto, outras abordagens de diagnóstico e taxonomia estão disponíveis tais como novos métodos moleculares os quais requerem uma considerável experiência do manipulador e não são muito aplicados para diagnóstico de rotina; e a espectrometria de massa por ionização de dessorção a laser assistida por de tempo-de-voe (MALDI-TOF MS), que emergiu como uma ferramenta poderosa para melhorar a qualidade de identificação microbiológica (PUTIGNANI et al., 2011). Por este motivo, para a identificação de *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. parapsilosis* é necessária uma abordagem polifásica (ASADZADEH et al., 2015).

#### 3.2 Identificação Molecular

Diversos métodos genotípicos, como análise de polimorfismo de DNA (RAPD), análise de padrão de polimorfismo do comprimento de fragmento de restrição (RFLP), PCR em tempo real, PCR uniplex e multiplex, sequenciamento de regiões específicas, têm sido utilizados para a identificação molecular e diferenciação de espécies do complexo *C. parapsilosis* (BARBEDO et al., 2017).

Tecendo um breve histórico, os primeiros métodos utilizados na diferenciação de levedura consistiram na determinação do percentual do conteúdo de guanina e citosina presente no DNA. Nesse aspecto, foi verificado que as leveduras apresentam uma ampla variação no conteúdo Citosina/Guanina (CG), entre 26 a 64%. Essa caracterização possibilitou entender que o filo Ascomycota possui de 28 a 50% de CG no DNA nuclear. Por outro lado, o perfil do DNA (CG  $\approx$  50-70%) de leveduras Basidiomycotas é visivelmente diferente (NAKASE e KOMAGATA, 1968; PRICE et al., 1978). O conhecimento do percentual de CG foi muito útil no passado. Entretanto, a necessidade de identificações mais refinadas e precisas suscitaram o desenvolvimento

de métodos genômicos mais acurados na taxonomia de leveduras, como a análise dos pares de bases que formam o DNA através do sequenciamento.

Posteriormente, o desenvolvimento de técnicas de sequenciamento do material genético possibilitou a criação de um banco de dados para identificação de diferentes espécies de leveduras (FELL et al., 2000). Diante disso, o sequenciamento parcial do rDNA tem sido considerado como padrão ouro na identificação de espécies de leveduras, incluindo as pertencentes ao Complexo *C. parapsilosis*. Trabalhos prévios relacionados a cruzamentos genéticos e de reassociação do DNA, demonstraram que o domínio D1/D2 da subunidade LSU, do RNA ribossomal foi muito útil na diferenciação de espécies próximas (PETERSON e KURTZMAN 1991). Outra região de interesse na identificação de leveduras consiste de regiões não codificantes presentes entre o domínio D1/D2, as regiões ITS1-2 do rDNA, e separadas pelo gene 5.8S rRNA. A região ITS, mostra-se muito conservada e, por isso, tem sido muito empregada para diferenciar espécies, sobretudo em conjunto com informações do domínio D1/D2 (SCORZETTI et al. 2002). (Figura 1).

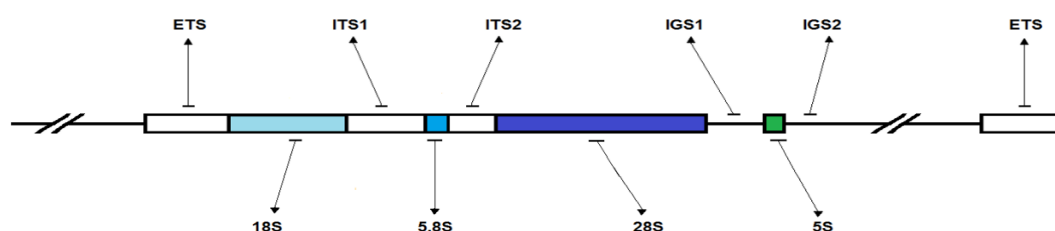


Figura 1: Visão esquemática do rDNA, exibindo o espaçador externo (*External transcribed spacer-ETS*), domínio D1/D2 (*Small subunit-SSU/18s, 5.8s e large subunit-LSU/28s*), região ITS 1 e 2, região IGS 1 e 2 e rDNA 5S.

Uma outra possibilidade que tem despertado interesse consiste na utilização de *primers* espécie-específicos para identificações baseadas na realização de PCR e interpretação do padrão de bandas no gel. O método em questão é versátil e de fácil interpretação, havendo a possibilidade de realização de PCRs convencionais ou de PCR multiplex. Essa última possui uma vantagem maior, tendo em vista que garante a identificação de várias espécies, simultaneamente, baseados apenas na interpretação do padrão de bandas obtidas no gel de agarose (FERNANDES et al., 2016).

Tecnologias de detecção rápidas, tendo como alvo o DNA, utilizando sondas de DNA marcadas através de hibridação fluorescente in situ (FISH) também são uma realidade. Possuem uma finalidade específica de detecção de microrganismos a partir de amostras de alimentos e espécimes clínicos (PATEL et al., 2019). Porém, possuem a desvantagem de serem utilizadas isoladamente na pesquisa de uma espécie em questão, uma vez que quando o marcador reage com a célula alvo haverá a emissão

de fluorescência (STENDER et al. 2001; RIGBY et al. 2002). Uma alternativa ao método consiste no uso de sondas de captura que após a ligação ao alvo são diferenciadas através da excitação por um feixe de laser de 635 nm e análise por citometria de fluxo (PAGE e KURTZMAN, 2005).

### 3.3 Identificação Proteômica

O espectrômetro de massa é um instrumento analítico capaz de converter moléculas neutras em íons na forma gasosa e separá-las de acordo com a sua razão massa/carga ( $m/z$ ), utilizando para isso campos eletromagnéticos. Esse equipamento atua como uma balança de íons de altíssima precisão e, em sua grande maioria, é composto por uma fonte ionizante, analisador(es) e detector(es). Como resultado é emitido um gráfico onde o eixo y representa a intensidade do sinal dos íons e o eixo x, a razão  $m/z$  destes (CROTTI, 2006).

*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) é uma técnica espectrométrica físico-química, rápida e reproduzível, utilizada para análise de massas em moléculas orgânicas. Esta técnica vem sendo crescentemente utilizada na última década como uma abordagem fenotípica para a identificação de fungos. Neste caso, o interesse da técnica em questão é a análise das células intactas ou extrato proteico a partir da lise celular com ácido fórmico, onde o espectro gerado é interpretado como um *fingerprint* da amostra que está sendo analisada (SANTOS et al., 2011; LIMA-NETO et al., 2014).

Dentro deste contexto da identificação polifásica, o MALDI-TOF MS tem sido introduzido em procedimentos laboratoriais de rotina para identificação de leveduras clínicas (VEEN et al., 2010; PUTIGNANI et al., 2011). Nos laboratórios de análises clínicas, a identificação rápida e confiável das espécies de *Candida* é essencial para o tratamento antifúngico, no qual os métodos bioquímicos convencionais de diagnóstico são morosos (QIAN et al., 2008). A identificação microbiana com base nos espectros espécie-específicos de peptídeos e proteínas por espectrometria de massas é notavelmente reproduzível, e explicada através da mensuração de proteínas altamente abundantes e expressas constantemente. Entre tais moléculas, encontram-se as de origem ribossomal que apresentam massa molecular entre 2000 e 20000 Da, além de poucos metabólitos secundários, possibilitando facilmente sua utilização como biomarcadores (VEEN et al., 2010).

Diante do exposto, a técnica de MALDI-TOF MS é bastante confiável para identificação de fungos até ao nível de espécie, e, portanto, auxilia os laboratórios de microbiologia médica a reduzir custos, bem como auxiliará em um futuro próximo a minimizar a emergência de isolados resistentes aos antifúngicos comercialmente disponíveis. Em alguns casos, é possível a diferenciação desses microrganismos até ao nível de variedade ou de espécies dentro de um complexo. Esta técnica tem se mostrado de grande relevância para a investigação nas diferentes vertentes da micologia. Adicionalmente, trata-se de uma técnica simples, económica, rápida (cerca

de 2 min/amostra) e de elevada eficácia. Mas é de fundamental importância ter em consideração que a técnica de MALDI-TOF MS é uma abordagem entre muitas e deve, por isso, ser usada como uma ferramenta de apoio dentro de uma abordagem polifásica no processo de diagnóstico e identificação fúngica (SANTOS et al., 2011; LIMA-NETO et al., 2014).

Como foi visto, o diagnóstico laboratorial da candidemia é feito rotineiramente através do isolamento e identificação bioquímica e/ou molecular das leveduras em hemoculturas, que embora auxiliem no diagnóstico e tratamento, apresentam sensibilidade apenas de 50% (CLANCY e NGUYEN, 2013). Atualmente, esse procedimento vem sendo complementados nos laboratórios de microbiologia clínica por métodos proteômicos, como estratégia de diagnóstico rápido e confiável. Nos últimos anos, vários pesquisadores tem destacado a contribuição que a espectrometria de massas, através da técnica de MALDI-TOF MS trouxe a cerca da correta distinção entre espécies crípticas e complexo de espécies como o complexo *C. parapsilosis lato sensu* em *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (RUIZ et al., 2013), o complexo *C. rugosa lato sensu* em *C. rugosa stricto sensu*, *C. pseudorugosa*, *C. neorugosa* e *C. mesorugosa* (PADOVAN et al., 2013) e o complexo *Candida haemulonii lato sensu* em *Candida haemulonii stricto sensu*, *C. duobushaemulonii*, *C. pseudohaemulonii* e *C. haemulonii var. vulnera* (SILVA et al., 2015), anteriormente identificados apenas por técnicas genômicas. Devido a essa aplicação meritariamente discriminativa, o MALDI-TOF MS foi elencado para diagnosticar isolados clínicos emergentes de *C. auris*, uma levedura multirresistente que ganhou destaque mundial em 2016 quando a Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (PAHO/WHO, 2016) publicou um alerta epidemiológico em outubro de 2016, reiterado pelo Ministério da Saúde no Brasil (ANVISA, 2017), em função dos relatos de surtos em serviços de saúde da América Latina, recomendando aos Estados-membros a adoção de medidas de prevenção e controle de surtos decorrentes deste patógeno.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). COMUNICADO DE RISCO No 01/2017 - GVIMS/GGTES/ANVISA. **Relatos de surtos de *Candida auris* em serviços de saúde da América Latina**. Março de 2017.

ARASTEHFAR, Amir et al. Molecular identification, genotypic diversity, antifungal susceptibility, and clinical outcomes of infections caused by clinically underrated yeasts, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*: An Iranian multicenter study (2014-2019). **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 264, 2019.

ASADZADEH, Mohammad et al. Simple, low-cost detection of *Candida parapsilosis* complex isolates and molecular fingerprinting of *Candida orthopsilosis* strains in Kuwait by ITS region sequencing and amplified fragment length polymorphism analysis. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0142880, 2015.

BARBEDO, Leonardo Silva et al. The identification and differentiation of the *Candida parapsilosis* complex species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the internal transcribed spacer region of the rDNA. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 4, p. 267-

270, 2016.

BARBEDO, Leonardo Silva et al. Comparison of four molecular approaches to identify *Candida parapsilosis* complex species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p. 214-219, 2017.

BARCHIESI, Francesco et al. Factors related to outcome of bloodstream infections due to *Candida parapsilosis* complex. **BMC infectious diseases**, v. 16, n. 1, p. 387, 2016.

BARNETT, J.A.; PAINE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification**. Cambridge, Cambridge University Press, 2000.

BERTINI, Alessia et al. Comparison of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* adhesive properties and pathogenicity. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 2, p. 98-103, 2013.

BORGHI, E. et al. Characterization of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from invasive fungal infections. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 30, n. 11, p. 1437, 2011.

CLANCY, C. J.; NGUYEN, M. H. Finding the “missing 50%” of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. **Clinical infectious diseases**, v. 56, n. 9, p. 1284-1292, 2013.

CORDEIRO, Rossana et al. The calcineurin inhibitor cyclosporin A exhibits synergism with antifungals against *Candida parapsilosis* species complex. **Journal of medical microbiology**, v. 63, n. 7, p. 936-944, 2014.

CROTTI, A. E. M., et al. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química nova**, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006.

DA MATTA, Daniel; SOUZA, Ana; COLOMBO, Arnaldo. Revisiting species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates from Latin American medical centers. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 2, p. 24, 2017.

DELFINO, Demetrio et al. Potential association of specific *Candida parapsilosis* genotypes, bloodstream infections and colonization of health workers' hands. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 11, p. O946-O951, 2014.

ELIAKIM-RAZ, Noa et al. Epidemiology, microbiology, clinical characteristics, and outcomes of candidemia in internal medicine wards—a retrospective study. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 52, p. 49-54, 2016.

FELL, J.W., et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.50, p. 1351-1372, 2000.

FERNANDES, J.A., et al. Evolution and Application of Inteins in *Candida* species: A Review. **Front Microbiol**, v.10, n.7, p:1585, 2016.

GAGO, Sara et al. *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* virulence in the non-conventional host *Galleria mellonella*. **Virulence**, v. 5, n. 2, p. 278-285, 2014.

GONÇALVES, S. S. et al. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. **Clinical microbiology and infection**, v. 16, n. 7, p. 885-887, 2010.

- GONZÁLEZ, Gloria M. et al. Species distribution and antifungal susceptibility of bloodstream fungal isolates in paediatric patients in Mexico: a nationwide surveillance study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2847-2851, 2013.
- KURTZMAN, C.P., ROBNETT, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.73, p. 331-371, 1998.
- LAMOTH, Frederic et al. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. suppl\_1, p. i4-i13, 2018.
- LIMA-NETO, R., et al. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolates culture collection. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 515-522, 2014.
- LOVERO, G. et al. Epidemiology of candidemia in neonatal intensive care units: a persistent public health problem. **Ann Ig**, v. 28, p. 282-287, 2016.
- MARCOS-ZAMBRANO, Laura Judith et al. Antifungal resistance to fluconazole and echinocandins is not emerging in yeast isolates causing fungemia in a Spanish tertiary care center. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4565-4572, 2014.
- MARINACH-PATRICE, C., et al. Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e8862, 2010.
- NAKASE, T., KOMAGATA, K. Taxonomic significance of base composition of yeast DNA. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v.14, p. 345-357, 1968.
- ORSI, Carlotta Francesca; COLOMBARI, Bruna; BLASI, Elisabetta. *Candida metapsilosis* as the least virulent member of the 'C. parapsilosis' complex. **Medical mycology**, v. 48, n. 8, p. 1024-1033, 2010.
- PAGE, B.T.; KURTZMAN, C.P. Rapid identification of *Candida* and other clinically important yeast species by flow cytometry. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p. 4507-4514, 2005.
- PADOVAN, A. C. B.; DE AZEVEDO MELO, A. S.; COLOMBO, A. L. Systematic review and new insights into the molecular characterization of the *Candida rugosa* species complex. **Fungal Genetics and Biology**, v. 61, p. 33-41, 2013.
- PAHO, Pan American Health Organization; WHO, World Health Organization. **Epidemiological Alert. *Candida auris* outbreaks in health care services**. published on 3 October 2016. Disponível em: <[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&Itemid=270&gid=36354&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=36354&lang=en)>
- PATEL, N.A., et al. Novel Use of Fluorescence In Situ Hybridization for the Rapid Identification of Microorganisms in Endophthalmitis and Keratitis. **Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina**, v.50, n. 5, p. S9-S12, 2019.
- PETERSON, S.W.; KURTZMAN, C.P. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. **Syst. Appl. Microbiol.**, v.14, p. 124-129, 1991.
- Price, C.W., Fuson, G.B., Phaff, H.J. Genome comparison in yeast systematics: delimitation of species within the genera *Schwanniomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces* and *Pichia*. **Microbiol. Rev.**, v.42, p. 161-193, 1978.
- PUTIGNANI, L., et al. MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi. **Molecular BioSystems**, v. 7, n. 3, p. 620-629, 2011.
- QIAN, J., et al. MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 392, n. 3, p. 439-

449, 2008.

RIGBY, et al. Fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for rapid identification of *Candida albicans* directly from blood culture bottles. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 2182-6, 2002.

RODRÍGUEZ, M. L. et al. Oral mucosa as a potential source of candidemia by *Candida parapsilosis* sensu stricto, under pathological conditions SOJ Microbiol Infect Dis 6 (1): 1-10. **Oral mucosa as a potential source of candidemia by *Candida parapsilosis* sensu stricto, under pathological conditions**, 2018.

RUIZ, Luciana et al. Candidemia by species of the *Candida parapsilosis* complex in children's hospital: prevalence, biofilm production and antifungal susceptibility. **Mycopathologia**, v. 175, n. 3-4, p. 231-239, 2013.

SANTOS, C., et al., Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight intact cell mass spectrometry to detect emerging pathogenic *Candida* species. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 71, n. 3, p. 304-308, 2011.

SCORZETTI, G., et al. *Cryptococcus adeliensis* sp. nov., a xylanase producing basidiomycetous yeast from Antarctica. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.77, p. 153-157, 2000.

SILVA, C. M., et al. Neonatal candidemia caused by *Candida haemulonii*: case report and review of literature. **Mycopathologia**, v. 180, n. 1-2, p. 69-73, 2015.

STENDER, H., et al. Identification of *Dekkera bruxellensis* (Brettanomyces) from wine by fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.67, p. 938–941, 2001.

TAVANTI, Arianna et al. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 1, p. 284-292, 2005.

TREVIÑO-RANGEL, Rogelio de J. et al. Evaluation of in vivo pathogenicity of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* with different enzymatic profiles in a murine model of disseminated candidiasis. **Medical mycology**, v. 52, n. 3, p. 240-245, 2014.

VAN VEEN, S. Q.; CLAAS, E. C. J.; KUIJPER, E. J. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 3, p. 900-907, 2010.

YAMAN, G., AKYAR, I., CAN, S. Evaluation of the MALDI TOF-MS method for identification of *Candida* strains isolated from blood cultures. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 1, p. 65–67, 2012.

## SUSTENTABILIDADE AGRÍCOLA COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

### **Richard Henrique Siebra Bergamo**

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Laboratório de Controle Biológico, Morfologia e Citogenética de Insetos, Maringá, Paraná, Brasil.

### **Bruno Vinicius Daquila**

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Laboratório de Controle Biológico, Morfologia e Citogenética de Insetos, Maringá, Paraná, Brasil.

### **Helio Conte**

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Laboratório de Controle Biológico, Morfologia e Citogenética de Insetos, Maringá, Paraná, Brasil.

**RESUMO:** Nos últimos anos, o Brasil vem registrando crescimento no uso dos agrotóxicos. Estes produtos são geralmente formulados com xenobióticos que contaminam o meio ambiente, resultando em riscos para os seres vivos. Diante deste impasse, a sociedade tem se mobilizado pela adoção das técnicas de controle sustentáveis, pressionando indústrias alimentícias e agricultores a investirem em pesquisas que utilizem meios alternativos e ecologicamente corretos. Entre as culturas brasileiras, a cana-de-açúcar possui uma das maiores áreas de plantio, tornando-se alvo de diversas pragas. A broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*) é um inseto facilmente

encontrado em canaviais brasileiros, sendo considerada uma das principais pragas desta cultura. Devido seu hábito alimentar mastigador, a fase larval deste lepidóptero, causa prejuízos de forma direta e indireta. Atualmente, seu controle é realizado utilizando-se de agrotóxicos e queimadas. Com a pressão social, as indústrias sucroalcooleiras buscam tecnologias capazes de reduzir as perdas econômicas bem como as contaminações no meio ambiente. Uma das técnicas que estão adotando é o controle biológico, utilizando-se macro e microrganismos, entre eles o fungo *Metarhizium anisopliae*, facilmente encontrado no ambiente. No Brasil, sua utilização como agente entomopatogênico é considerada segura e economicamente viável, limitando-se a insetos suscetíveis, seja na agricultura ou saúde pública. Após aplicação de *M. anisopliae*, os conídios germinam sobre a cutícula do inseto, penetram a epiderme e atingem a hemocele, via de disseminação no hospedeiro, onde são liberadas toxinas e enzimas. Pela hemocele, o fungo se espalha atingindo órgãos e sistemas, gerando um quadro de septicemia que resulta na morte do inseto.

**PALAVRAS-CHAVE:** Culturas. Tecnologia. Controle-Biológico. Meio-Ambiente.



**ABSTRACT:** In recent years, Brazil has shown growth in the registration of pesticides. These products are generally formulated with xenobiotics, which contaminate the environment, endangering living beings. With this, society has mobilized for sustainable control techniques, putting pressure on food industries and farmers, forcing them to invest in research aimed at sustainable means of control. Among Brazilian crops, sugarcane has one of the largest planting areas, making this crop the target of several pests. Sugarcane borer (*Diatraea saccharalis*) is an insect easily found in Brazilian sugarcane plantations, considered one of the main pests of this culture. Due to the feeding habit, the larval phase of this lepidopteran causes direct and indirect damage. Currently, its control is made using pesticides and burned. With social pressure, the sugar and alcohol industries seek sustainable control techniques, avoiding the contamination of the environment and living organisms. Among the techniques employed, we can highlight the biological control, which uses macro and microorganisms, among them, the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*, fungus easily found in the environment. In Brazil, its use as an entomopathogenic agent is considered safe and economically feasible, limited to susceptible insects, whether in agriculture or public health. After application of *M. anisopliae*, the conidia germinate on the cuticle of the insect, penetrate the epidermis and reach the hemocele, which becomes a way of dissemination, where toxins and enzymes are released. By the hemocele, the fungus spreads reaching to organs and systems, generating a picture of generalized infection that results in the death of the insect.

**KEYWORDS:** Cultures. Technology. Biological control. Environment.

### 1 | INTRODUÇÃO

O aumento e abastecimento na produção alimentícia são as principais preocupações no século XXI. Considerado país com maior potencial agrícola no mundo, o Brasil tem seu modelo de produção baseado na “revolução verde”, onde a produtividade é elevada pelo uso de fertilizantes e agrotóxicos (FREITAS e MENDONÇA, 2016).

Outra prática ainda amplamente utilizada na agricultura, contrariando o artigo 38 da Lei n. 12.651/12, são as queimadas, que trazem grandes riscos aos ecossistemas, resultando em alterações nas condições ambientais. Sua prática é permitida somente em três situações: em locais cujas peculiaridades justifiquem o emprego do fogo, mas ambas com autorização do órgão ambiental; em unidades de conservação para manter a vegetação nativa quando suas características são associadas à ocorrência de fogo e em atividades científicas (BRASIL, 2012; ARAÚJO et al., 2005).

Movimentos em busca da agricultura sustentável surgiram no Brasil como resposta socioambiental aos problemas provenientes da “revolução verde” e

ganharam espaço assumindo expressão mais visível no início da década de 90, período de grande sensibilidade ecológica/preservacionista. (SANTOS et al., 2014; ASSAD e ALMEIDA, 2004).

As vinculações conceituais da “agricultura sustentável” com ideais político-ideológicos dificultaram o avanço do movimento no país, que passou a ser caracterizado como político-partidário ou ligado a grupos políticos específicos, não sendo vista por muitos, como uma política pública que visa benefícios a toda população (ASSAD e ALMEIDA, 2004).

Para os grandes produtores, a lógica produtiva é baseada na maximização da produção, ignorando aspectos ambientais e sociais das famílias presentes nos locais, que por muitas vezes, são obrigadas a abandonar suas terras para o avanço agrícola. As práticas agroecológicas surgem em contrapartida a essa lógica, objetivando-se na permanência das famílias no campo, o manejo sustentável, a conservação dos recursos naturais e a independência dos pequenos agricultores (SANTOS et al., 2014).

Utilizados de forma indiscriminada sem a devida conscientização, os agrotóxicos vêm causando inúmeros problemas tanto ambientais como e na saúde humana. Estudos voltados para os malefícios recorrentes de tais aplicações irregulares são diversos. Estes compostos formulados com moléculas artificiais, são resistentes a degradação, acumulando-se no solo e originando moléculas com capacidade nociva para os organismos vivos (DAQUILA, 2019; LOPES, 2016).

Alguns estudos indicam que a utilização incorreta destes controladores em culturas canavieiras, resultam na contaminação do ar, solo e corpos d’água. Diante disso, a sociedade têm demonstrado preocupação, e incentivado buscas por alternativas corretas para preservação ambiental. Por isso, na década de 70, meios de controle alternativos e sustentáveis foram amparados por movimentos sociais, sendo caracterizados como “agricultura alternativa” (SILVA e BRITO, 2015; GOMES e BARIZON, 2014; MENEZES, 2003; SANTOS et al., 2014; ASSAD e ALMEIDA, 2004).

As grandes indústrias do setor sucroalcooleiro estão investindo em tecnologias que implementem os sistemas de produção agrícola, com enfoques na lucratividade, sociedade e meio ambiente. Entre estas tecnologias encontra-se o controle biológico, método natural para reduzir populações de pragas, alguns deles utilizando-se de inimigos naturais, sejam patógenos, parasitas ou predadores (SAEED et al., 2019; NASCIMENTO e MELNYK, 2016; CALTAGIONE, 1988; BOSCH et al., 1982).

No meio agrícola, técnicas de controle biológico vem sendo amplamente utilizadas com sucesso. Nesse contexto, destaca-se o fungo *Metarhizium anisopliae*, devido seu potencial entomopatogênico, que interfere com eficiência no desenvolvimento de diversos insetos pragas, como lepidópteros e coleópteros (SOLIMAN et al., 2019; SIMI et al., 2018).

## 2 | CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp.*)

Inserida no Brasil durante a colonização, acredita-se que a origem desta Poacea seja a Polinésia, e que posteriormente foi introduzida em outros países pelas conquistas árabes. Subprodutos da cana-de-açúcar, constituem hoje uma das principais bases da economia brasileira, principalmente quando tratamos de energia limpa e renovável, como o etanol (BRAIBANTE et al., 2013).

Atividades envolvendo o setor sucroalcooleiro beneficiaram a economia brasileira, principalmente durante o ciclo da cana, em meados dos Séc. XVI e XVII. Atualmente, o Brasil é o país que detém o sistema mais eficiente para produção da cana-de-açúcar, respondendo por 45 % da exportação mundial (UNICA, 2019).

Caracterizada como uma das principais culturas agrícolas de regiões tropicais, os canaviais correspondem a terceira maior área de cultivo brasileiro (estando atrás da soja e milho). Somente em 2016, a estimativa de ocupação canavieira no país foi de 13,5 %, representando aproximadamente R\$ 152,3 bilhões, 1/5 do PIB (Produto Interno Bruto) brasileiro, isso apenas no terceiro trimestre do mesmo ano (IBGE, 2017).

Embora seja considerada uma das maiores culturas do país, as lavouras de cana-de-açúcar sofrem com a redução em sua produtividade, seja por fatores bióticos ou abióticos, colocando em risco não somente a produção, mas também a qualidade do produto (SILVA e SILVA, 2012; VACARI et al., 2012).

### 2.1 Pragas da cultura canavieira

Anualmente a produtividade da cultura canavieira é prejudicada pela ação de pragas, entre elas lepidópteros, coleópteros, hemípteras e nematoides.

No Brasil, destacam-se três espécies de nematoides pragas, o *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne incognita* e o *Pratylenchus zaeae*, que possuem ação restrita ao sistema radicular das plantas. Os nematoides liberam toxinas que interferem no desenvolvimento correto das raízes, com isso, a absorção de nutrientes necessários para crescimento e desenvolvimento das plantas é comprometido, causando alterações morfológicas, necrose tecidual e enraizamento aéreo (DINARDO-MIRANDA, 2005).

Os prejuízos causados por *M. incognita* na cultura canavieira chegam a 40 %, enquanto *M. javanica* e *P. zaeae* podem causar redução de produtividade entre 20 % e 30 %, em alguns casos, as variedades da cana-de-açúcar com maior susceptibilidade e acometidas por altos níveis de infestação, podem ter redução de até 50 % (DINARDO-MIRANDA, 2005).

Outra praga da cultura canavieira é a *Mahanarva fimbriolata* (cigarrinha-das-raízes). Em sua fase juvenil, este hemíptera possui maior atividade, prejudicando de forma direta o sistema radicular, sugando água e nutrientes das plantas. Os adultos também causam prejuízos, ao se alimentarem de seiva folear, liberam secreções salivares, responsáveis pela necrose tecidual da epiderme vegetal. Com isso, o potencial fotossintético da planta é alterado, refletindo diretamente no percentual

de sacarose armazenada, reduzindo sua produtividade em até 50 % (DINARDO-MIRANDA, 2005).

*Sphenophorus levis* (bicudo da cana-de-açúcar), é um coleóptero que ataca as raízes da planta, tendo sua fase larval como a mais prejudicial para este vegetal. Ao se alimentarem, as larvas broqueiam os rizomas e galerias são formadas, as quais se estendem por toda base da brotação, resultando no amarelamento das folhas e morte do perfilho (TAVARES et al., 2007; DINARDO-MIRANDA, 2005).

Outro coleóptero, *Migdolus fryanus* (broca-de-rizomas) também afeta áreas de cultura canavieira, pois suas larvas alimentam-se das raízes e rizomas ocasionando morte do colmo e conseqüentemente redução da produtividade (DINARDO-MIRANDA, 2005).

Nativa do hemisfério ocidental, a *Diatraea saccharalis* (broca-da-cana), pode ser encontrada em todo território nacional, sendo considerada uma das pragas mais prejudiciais deste agroecossistema. Responsável por danos diretos e indiretos. Estima-se que para cada 1 % de intensidade de infestação (I.I.) da *D. saccharalis*, há perda de 0,25 % na produção de açúcar por tonelada e 0,20 % na produção de álcool em litros por tonelada (SIMÕES et al., 2015; ALMEIDA et al., 2008; GUAGLIUMI, 1972/73).

Através das perfurações causadas pela broca-da-cana, fungos das espécies *Fusarium moniliforme* e *Colletotrichum falcatum* penetram nos colmos, ocasionando a inversão da sacarose armazenada e reduzindo a pureza do caldo, além de competir com os microrganismos utilizados no processo de fermentação pela indústria (BORTOLI et al., 2017).

### 3 | CONTROLE BIOLÓGICO

Contraopondo estes métodos não sustentáveis, está o controle biológico, método que consiste na utilização organismos vivos, como agentes no controle das populações de pragas em desequilíbrio nos agro e ecossistemas, reduzindo as densidades populacionais (PARRA et al., 2002).

O controle biológico pode ser usado das seguintes formas: natural, clássico e aplicado. O controle natural consiste na atração e conservação das populações de inimigos naturais dos organismos alvos, já o clássico, corresponde na inserção dos agentes controladores, equilibrando as populações nativas, sendo esta, uma medida de longo prazo. Por sua vez, o controle biológico aplicado consiste em liberações inundativas de biocontroladores, que são produzidos em biofábricas. Atualmente, o controle biológico aplicado é amplamente utilizado no setor agrícola, graças aos investimentos tecnológicos deste setor (BERTI-FILHO e MACEDO, 2010).

## 4 | MODO DE AÇÃO DOS FUNGOS ENTOMOPATÓGENOS

Considerados microorganismos versáteis e seguros ao meio ambiente, os fungos são responsáveis por aproximadamente 80 % das doenças entomopatológicas em insetos (AGALE et al., 2018; ROBBS e BITTENCOURT, 1998).

O processo de infecção tem início com a adesão dos conídios e esporos na epicutícula do inseto alvo, seguido pela formação de apressórios e do grampo de penetração tegumentar, após penetração, o fungo sofre uma transição dimórfica produzindo hifas, que serão levadas pela hemolinfa, invadindo o sistema de defesa humoral dos insetos (hemócitos). Além disso, enzimas e toxinas com capacidade paralisante são liberadas. Na hemocele, disseminam-se rapidamente, colonizando órgãos internos, acelerando o processo de morte (fig. 1) (KEYHANI, 2018; SILVA, 2012).

O sucesso da infecção é garantido com a secreção enzimática, lipases, proteases e quitinases, que permitem a passagem das hifas pela epicutícula, procutícula e pelas células que formam a epiderme, sendo influenciada por fatores ambientais como a temperatura e umidade relativa do ar. Já o processo de infecção e colonização, ocorrem em tempos distintos, pois são dependentes do hospedeiro em questão (KORDI et al., 2015; KIM et al., 2013; KIM et al., 2010).

O crescimento dos conídios no corpo do inseto, é interligado com o percentual de substrato lipídico disponível, onde, ácido oleico e lipídio cuticular (contendo alcanos) são os principais fatores, sendo utilizados pelos fungos como fonte de carbono. Por outro lado, os lipídios cuticulares, são sintetizados em conjunto aos antimicrobianos e transportados para as camadas cuticulares dos insetos, facilitando ou impedindo o crescimento fúngico. Algumas das enzimas liberadas pelos fungos para degradação cuticular (proteases, quitinases, lipases e fosfolipases), atuam de forma conjunta com enzimas do citocromo P450 na assimilação de substratos lipídicos internos e externos. Após essa assimilação inicia-se a degradação cuticular. A quitina presente no exoesqueleto do hospedeiro não é utilizada inicialmente pelo fungo, mas sim para os processos de crescimento e esporulação sobre o cadáver (KEYHANI, 2018).

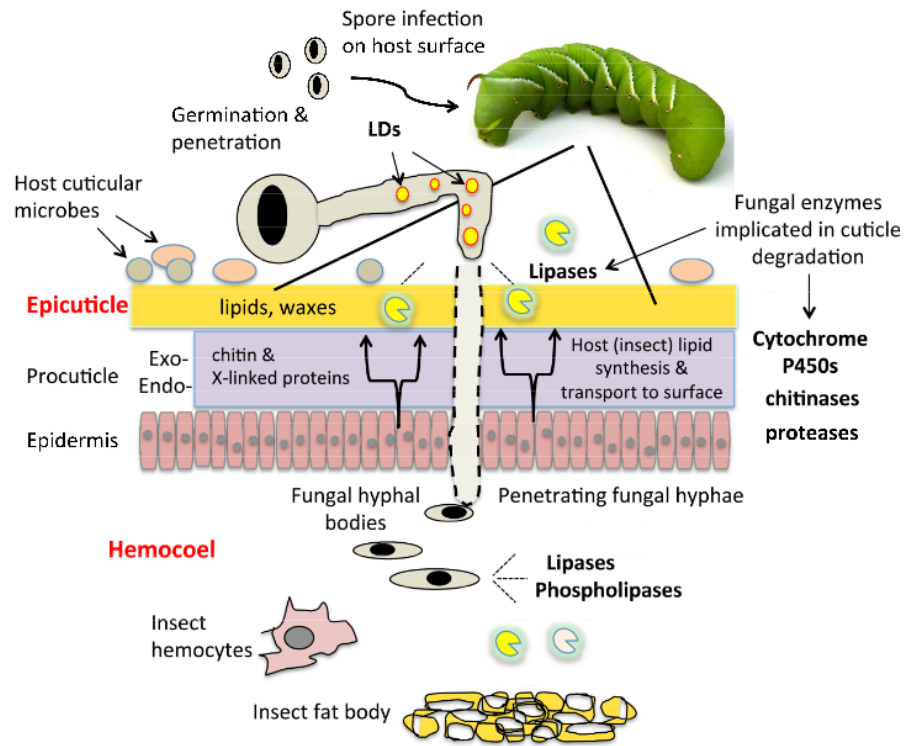


Figura 1. Processo de infecção de fungos entomopatogênicos e sua relação lipídica (Fonte: KEYHANI, 2018).

Com a morte dos insetos e condições ambientais favoráveis, ocorrem exteriorizações de estruturas fúngicas, o fungo cresce sobre o hospedeiro, que servirá de fonte nutricional para seu desenvolvimento. No meio externo, o fungo passa por conidiogênese (esporulação), se espalhando pelo meio ambiente (SILVA, 2012).

Efeitos secundários podem ser observados pós-tratamentos com fungos. Alguns estudos relatam a redução no número e na viabilidade das posturas feitas por fêmeas contaminadas por *M. anisopliae*. Isso ocorre, porque a colonização fúngica iniciada no sistema tegumentar, se espalha pelos sistemas circulatório, reprodutor, respiratório, digestivo, nervoso e imunológico, causando distúrbios físicos, interferindo até mesmo na reprodução dos insetos. (SCHNEIDER et al., 2013; FINKLER, 2011/12).

## 5.1 METARHIZIUM ANISOPLIAE (METSCHNIKOFF) SOROKIN

Responsável por patogenias em aproximadamente 200 espécies de insetos, os fungos do Gênero *Metarhizium* são entomopatogênicos amplamente utilizados como agentes no controle de pragas, principalmente das ordens Lepidoptera, Hemiptera, Dermaptera e Orthoptera (AGALE, 2018).

Descrito pela primeira vez em 1879 por Metschnikoff, este fungo foi isolado nas fases larvais de coleópteros que acometiam culturas de trigo, sendo nomeado inicialmente como *Entomophthora anisopliae*. Posteriormente, em 1883, foi inserido no gênero *Metarhizium*, sendo renomeado como *Metarhizium anisopliae* pelo pesquisador Sorokin (WAYAL et al., 2018; LACEY e KAYA, 2007; TULLOCH, 1976).

Trata-se de um parasita facultativo, cosmopolita, que pode sobreviver sem um hospedeiro vivo, possuindo ou não condições climáticas favoráveis para seu desenvolvimento, este microrganismo necessita basicamente de carbono e nitrogênio, nutrientes essenciais para seu crescimento e reprodução (AGALE et al., 2018).

O ciclo de vida de *M. anisopliae* em insetos tem início com a adesão dos conídios na cutícula do hospedeiro, seguido por sua germinação, posteriormente invasão e disseminação pelos sistemas e órgãos do hospedeiro. Toxinas e enzimas são liberadas pelo fungo, ocasionando a morte do inseto, tornando o ambiente propício a extrusão do patógeno e conidiogênese (fig. 2).

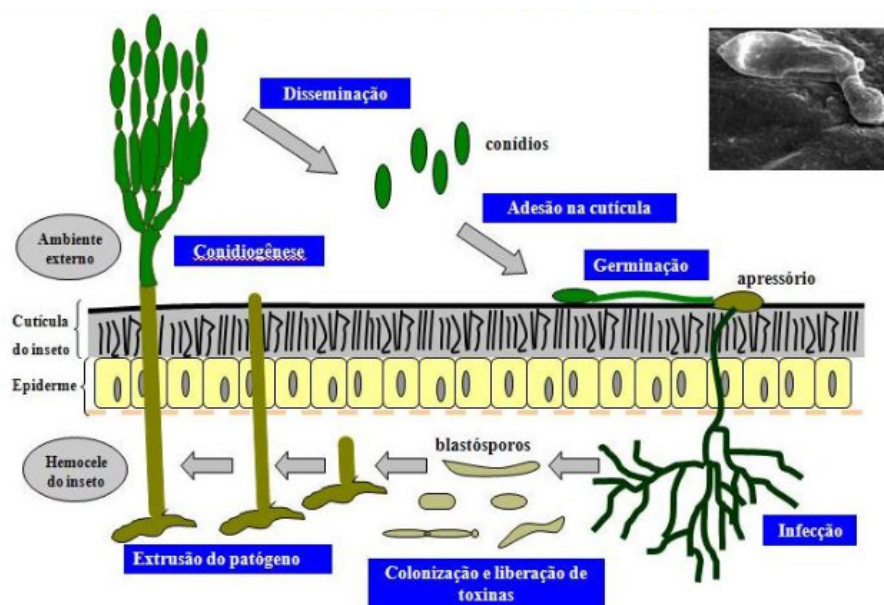


Figura 2. Ciclo de vida de *M. anisopliae* em insetos hospedeiros. Deposição do conídio sobre a cutícula do hospedeiro (adesão), seguida pela germinação do conídio (germinação), penetração através da cutícula por ação mecânica e processo enzimático (formação de apressórios e grampo de penetração), invasão, colonização do corpo do inseto, produção de toxinas, exteriorização das estruturas fúngicas, produção de conídios sobre a carcaça do hospedeiro e disseminação (Fonte: SILVA, 2012).

Em ambiente laboratorial, *M. anisopliae* tem tempo de meia vida estimado em 10 dias, no entanto, a inserção de adjuvantes como o óleo de Neem, aumentam sua longevidade e virulência, tornando-o um excelente biocontrolador (PAULA et al., 2019).

No parâmetro comercial brasileiro, produtos contendo *M. anisopliae* como princípio ativo, são os mais registrados no Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária (MAPA). Estudos com este entomopatógeno se intensificaram no país, principalmente com a possibilidade da sua utilização como controlador das larvas do *Aedes aegypti*, transmissor de diversas doenças que causam preocupações na saúde pública (GOMES et al., 2015; PEREIRA et al., 2009).

## 6 | CONCLUSÕES

Entre os meios de controle biológico, o *M. anisopliae*, atua sobre o crescimento

das populações de insetos-pragas específicos, reduzindo riscos de possíveis danos ambientais. Considerando o grande número de pragas nas culturas brasileiras, a utilização dos fungos entomopatogênicos vem se estabilizando como estratégia sustentável, gerando aumentos na produtividade com resultados rentáveis. No entanto, é preciso reforçar que o sucesso deste procedimento está condicionado ao Manejo Integrado de Pragas, e aos estudos relacionados a especificidade das espécies pragas que se deseja controlar.

## REFERÊNCIAS

- AGALE, S.V.; GOPALAKRISHNAN, S.; AMBHURE, K.G.; CHANDRAVANSI, H.; GUPTA, R.; WANI, S.P. 2018. **Mass Production of Entomopathogenic Fungi (*Metarhizium anisopliae*) using Different Grains as a Substrate**. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. Doi: 10.20546/ijcmas.2018.701.268.
- ARAÚJO, R.A.; ARAÚJO, M.S.; GONRING, A.H.; GUEDES, R.N. 2005. **Impacto da Queima Controlada da Palhada da Cana-de-açúcar Sobre a Comunidade de Insetos Locais**. Neotropical Entomology. Doi: 10.1590/S1519-566X2005000400016.
- ASSAD, M.L.L.; ALMEIDA, J. 2004. **Agricultura e sustentabilidade: Contexto, Desafios e Cenários**. Ciência & Ambiente, 29:15-30.
- BERTI-FILHO, E.; MACEDO, L.P.M. 2010. **Fundamentos do controle biológico de insetos-praga**. Natal: Editora IFRN, 1-108.
- BORTOLI, S.A.; POLANCZYK, R.A.; VACARI, A.M.; DE BORTOLI, C.P.; DUARTE, R.T. 2017. **Efeito do aquecimento global sobre as pragas da cana-de-açúcar**. Aquecimento Global e Problemas Fitossanitários, 348-379.
- BOSCH, R.V.D.; MESSENGER, P.S.; GUTIERREZ, A.P. 1982. **An introduction to biological control**. New York: Plenum Press, 1-247.
- BRAIBANTE, M.E.F.; PAZINATO, M.S.; ROCHA, T.D.; FRIEDRICH, L.D.S.; NARDY, F.C. 2013. **A cana-de-açúcar no Brasil sob um olhar químico e histórico: uma abordagem interdisciplinar**. Química nova na escola, 35 (1): 3-10.
- BRASIL. 2012. **Lei nº 12.651, de 25 de maio de 2012. Capítulo IX Da proibição do uso de fogo e do controle de incêndios. Art. 38**. Disponível em: <<https://presrepublica.jusbrasil.com.br/legislacao/1032082/lei-12651-12>>. Acesso em: 26 de junho de 2019.
- CALTAGIONE, L.E. 1988. **Definitions and principles of biological control**. In. **2nd International short course in biological control**, Anais... Berkeley.
- DAQUILA, B.V. 2019. **Histopatologia do intestino médio em larvas da *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1794 (Lepidoptera: Crambidae) tratadas com *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae)**. Maringá: UEM, 2019, 78p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Ambiental, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- DINARDO-MIRANDA, L.L. 2005. **Nematóides e pragas de solo em cana-de-açúcar**. Informações agronômicas, 110 (1): 25-32.
- FINKLER, C.L.L. 2011/12. **Controle de insetos: uma breve revisão**. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônoma. 8/9: 169-189.



- FREITAS, R.E.; MENDONÇA, M.A.A. 2016. **Expansão Agrícola no Brasil e a Participação da Soja: 20 anos**. Rev. Econ. e Soc. Rural. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1234-56781806-94790540306>.
- GOMES, M.A.F.; BARIZON, R.R.M. 2014. **Panorama da Contaminação Ambiental por Agrotóxicos e Nitrato de origem Agrícola no Brasil: cenário 1992/2011**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 35.
- GOMES, S.A.; PAULA, A.R.; RIBEIRO, A.; MORAES, C.O.; SANTOS, J.W.; SILVA, C.P.; SAMUELS, R.I. 2015. **Neem oil increases the efficiency of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae**. Doi: 10.1186/s13071-015-1280-9.
- GUAGLIUME, P. 1972/73. **Pragas da cana-de-açúcar**. Rio de Janeiro: FAIO-IAA, 622.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2017. **A Geografia da Cana-de-açúcar**. Rio de Janeiro, 172.
- KEYHANI, N.O. 2018. **Lipid biology in fungal stress and virulence: entomopathogenic fungi**. Fungal biology. Doi: 10.1016/j.funbio.2017.07.003.
- KIM, J. S.; JE, Y. H.; WOO, E. 2010. **Roles of adjuncts in aphicidal activity of enzymes from *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) SFB-205 supernatant**. Journal of Asia Pacific Entomology, 13(4): 345-350.
- KIM, J.J.; JEONG, G.; HAN, J.H.; Lee, S. 2013. **Biological Control of Aphid Using Fungal Culture and Culture Filtrates of *Beauveria bassiana***. Mycobiology. Doi: 10.5941/MYCO.2013.41.4.221.
- KORDI, M.K.; FARROKHI, N.; MASOUDI, A.; SHADMEHRI, A.D.; SHAHROKH, G. 2015. **Expression analyses of some *Beauveria bassiana* genes in response to cuticles of four different insects**. Journal of Crop Protection, 4: 675-690.
- LACEY, L.A.; KAYA, H.K. 2007. **Field manual of techniques in invertebrate pathology: application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests**. 2 ed. Dordrecht, Springer Scientific Publishers, 855.
- LOPES, I.C. 2016. **Produção de conídios do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em diferentes condições de cultivo e em biorreator de bandeja**. São José do Rio Preto: UNESP, 2016, 59p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto.
- MACEDO, I.C. **Situação atual e perspectivas do etanol**. 2007. Revista Estudos Avançados, 21(59): 157-165.
- MENEZES, E.L.A. 2003. **Controle Biológico de Pragas: Princípios e Estratégias de Aplicação em Ecossistemas Agrícolas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 44.
- NASCIMENTO, L.; MELNYK, A. 2016. **A química dos pesticidas no meio ambiente e na saúde**. Mangaio Acadêmico, 1(1): 54-61.
- PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORREIA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. 2002. **Controle Biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. Barueri: Manole, 1-17.
- PAULA, A. R.; RIBEIRO, A.; LEMOS, F. J. A.; SILVA, C. P.; SAMUELS, R. I. 2019. **Neem oil increases the persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae**. Parasites & vectors. Doi: 10.1186/s13071-019-3415-x.

PEREIRA, C. R.; PAULA, A. R.; GOMES, S. A.; PEDRA JR, P. C. O.; SAMUELS, R. I. 2009. **The potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae.** Biocontrol Science and Technology. Doi: 10.1080/09583150903147659.

ROBBS, C.F.; BITTENCOURT, A.M. 1998. **O controle biológico de insetos nocivos à agricultura com o emprego de fungos imperfeitos ou hifomicetos.** Biotecnologia, 6:10-12.

SAEED, Q.; AHMAD, F.; LQBAL, N.; ZAKA, S.M. 2019. **Chemical control of polyphagous pests on their auxiliary hosts can minimize insecticide resistance: A case study of *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) in cotton agroecosystem.** Ecotoxicology and Environmental Safety. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.01.038.

SANTOS, C.F.D.; SIQUEIRA, E.S.; ARAÚJO, I.T.D.; MAIA, Z.M.G. 2014. **A agroecologia como perspectiva de sustentabilidade na agricultura familiar.** Ambiente & Sociedade. Doi: 10.1590/S1414-753X2014000200004.

SCHNEIDER, L. C. L.; SILVA, C. V.; CONTE, H. 2013. **Infection, colonization and extrusion of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in pupae of *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae).** Journal of Entomology and Nematology. Doi: 10.5897/JEN12.015.

SILVA, A.B.; BRITO, J.M. 2015. **Controle biológico de insetos-praga e suas perspectivas para o futuro.** AGROTEC, 248-258.

SILVA, J.P.N.D.; SILVA, M.R.N.D. 2012. **Noções da cultura da cana-de-açúcar.** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás. Inhumã, Goiás. 105.

SILVA, R.A. 2012. **Estudo de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok: Toxicidade a compostos extraídos de *Tibraca limbativentris* Stal (Heteroptera: Pentatomidae), efeitos de agroquímicos utilizados na cultura do arroz e aumento da patogenicidade a *T. limbativentris* com doses subletais de inseticidas químicos.** Goiânia: UFG, 2012, 148p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia.

SIMI, L.D.; LEITE, L.G.; TREVISAN, O.; COSTA, J.N.M.; OLIVEIRA, L.E.; SCHMIDT, F.S.; BUENO, R.N.S.; BATISTA-FILHO, A. 2018. **Mortality of *Conotrachelus humeropictus* in response to combined application of the nematode *Steinernema brazilense* and the fungus *Beauveria bassiana*.** Arquivos do Instituto Biológico. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657000092016>.

SIMÕES, R.A.; FELICIANO, J.R.; SOLTER, L.F.; DELALIBERA JR, I. 2015. **Impacts of *Nosema* sp. (Microsporidia: Nosematidae) on the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae).** Journal of invertebrate pathology. Doi: 10.1016/j.jip.2015.05.006.

SOLIMAN, E.P.; CASTRO, B.M.C.; WILCKEN, C.F.; FIRMINO, A.C. DAL-POGETTO, M.H.F.A.; BARBOSA, L.R.; ZANUNCIO, J.C. 2019. **Susceptibility of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), a *Eucalyptus* pest, to entomopathogenic fungi.** Scientia Agricola. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-992x-2017-0043>.

TAVARES, F.M.; BATISTA FILHO, A.; LEITE, L.G.; ALMEIDA, L.C.; SILVA, A.C.; AMBRÓS, C.M. 2007. **Efeito de *Heterorhabditis indica* e *Steinernema* sp. (Nemata: Rhabditida) sobre larvas do bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae), em laboratório e casa-de-vegetação.** Nematologia Brasileira, 31 (1): 12-19.

TULLOCH, M. 1976. **The genus *Metarhizium*.** Transactions of the British Mycological Society, 66(3): 407-411.

UNICA. **Cana-de-açúcar.** Disponível em: <<https://www.unica.com.br/setor-sucroenergetico/acucar/>>. Acesso em: 18 de junho de 2019.

VACARI, A.M.; GENOVEZ, G.D.S.; LAURENTIS, V. L.D.; BORTOLI, S.A.D. 2012. **Fonte proteica na criação de *Diatraea saccharalis* e seu reflexo na produção e no controle de qualidade da *Cotesia flavipes*.** *Bragantia*, 71(3): 355-361.

WAYAL, N.D.; MEHENDELE, S.K.; GOLVANKAR, G.M.; DESAI, V.S.; NAIK, K.V. 2018. **Bioefficacy of *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin culture filtrates from different liquid media against *Aphis craccivora* (Koach) under laboratory condition.** *International Journal of Chemical Studies*, 6(6): 1935-1939.

## TESTE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PROTEASE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Euphorbia tirucalli* L.

### **Lívio Carvalho de Figueirêdo**

Universidade Federal Rural do Semi-Árido,  
Departamento de Biociências  
Mossoró – RN

### **Francisca das Chagas da Silva Paula Neta**

Universidade Federal Rural do Semi-Árido,  
Departamento de Biociências  
Mossoró – RN

### **Luana Kelly Carvalho da Silva**

Universidade Federal Rural do Semi-Árido,  
Departamento de Biociências  
Mossoró – RN

### **Pablo Igor Lima Vieira**

Universidade Federal Rural do Semi-Árido,  
Departamento de Biociências  
Mossoró – RN

### **Daniela Rayane da Silva Moraes**

Universidade Federal Rural do Semi-Árido,  
Departamento de Biociências  
Mossoró – RN

### **Ana Letícia Holanda Moraes**

Universidade Federal Rural do Semi-Árido,  
Departamento de Biociências  
Mossoró – RN

vegetal. Também apresentam alta capacidade de produção de enzimas extracelulares de interesse biotecnológico podendo servir como bioindicadores, controladores de pragas e doenças e ainda serem usados para biorremediação, o que os tornam amplamente aplicáveis na indústria têxtil, de alimentos e fármacos. Este trabalho teve como objetivo analisar a atividade enzimática de protease pelos fungos endofíticos isolados de avelós (*Euphorbia tirucalli* L.). Em trabalho realizado anteriormente, foram isolados 10 fungos endofíticos de espécimes de Avelós na cidade de Mossoró, Rio Grande do Norte. Esses fungos foram previamente cultivados em meio BDA (batata dextrose ágar) a 28°C em câmara BOD para crescimento por sete dias. Posteriormente, os fungos foram incubados em meio específico. Os testes foram realizados com quatro repetições. No oitavo dia de crescimento dos microrganismos em laboratório, foram observados e os diâmetro da colônia e do halo de degradação foram medidos, para determinar o índice enzimático (IE). Apenas o isolado nomeado ETT8 apresentou atividade proteolítica tendo um índice enzimático igual a 7,5. As proteases podem ser aplicadas em diversos alvitres, especialmente em detergentes, indústria de couro, biorremediação de efluentes, fármacos e indústria alimentícia. É possível concluir que dentre os fungos

**RESUMO:** Um fungo endofítico é aquele que vive total ou parcialmente no interior das plantas, habitando de modo geral suas partes aéreas sem aparentemente causar danos a seus hospedeiros, vivendo em simbiose com o

endofíticos de *Euphorbia tirucalli* L. existe pelo menos um produtor de protease com grande potencial biotecnológico.

**PALAVRAS-CHAVE:** Avelós; Enzimas; Metabólitos Fúngicos.

## TEST OF ENZYMATIC ACITVITY OF PROTEASES FROM ENDOPHYTIC FUNGI FROM *Euphorbia tirucalli* L.

**ABSTRACT:** An endophytic fungi is the one that lives totally or partially inside the plants, generally inhabiting its aerial parts without apparently causing damage to its hosts, living in symbiosis with the plant. They also have high capacity production of extracellular enzymes with biotechnological interest, being able to serve as bioindicators, pest and disease controllers and still be used for bioremediation, which makes them widely applicable in the textile, food and pharmaceutical industries. This work aimed to analyze the enzymatic activity of protease produced by endophytic fungi isolated from Avelós (*Euphorbia tirucalli* L.). In previous work, 10 endophytic fungi of Avelós specimens were isolated in the city of Mossoró, Rio Grande do Norte. These fungi were previously cultured in BDA (potato dextrose agar) medium at 28°C in BOD chamber for growth during seven days. Subsequently, the fungi were incubated in specific medium. The tests were performed with four replicates. On the eighth day of growth of the microorganisms in the laboratory, degradation halos were observed and the diameter of the colony and the degradation halo were measured, to determine the enzymatic index (EI). Only the isolate named ETT8 showed proteolytic activity having an enzymatic index of 7.5. Proteases can be applied in a variety of ways, especially in detergents, the leather industry, effluent bioremediation, pharmaceuticals and the food industry. It is possible to conclude that among the endophytic fungi of *Euphorbia tirucalli* L. there is at least one protease producer with great biotechnological potential.

**KEYWORDS:** Avelós; Enzymes; Fungal Metabolites.

## 1 | INTRODUÇÃO

Um fungo endofítico é aquele que vive total ou parcialmente no interior das plantas, habitando de modo geral suas partes aéreas sem aparentemente causar danos a seus hospedeiros, vivendo em simbiose com o vegetal. Ao se alojar no interior de uma planta esses fungos adquirem nutrição e proteção do hospedeiro e como num mecanismo de troca eles disponibilizam metabólitos específicos e funcionais para as plantas, além de possibilitar que o vegetal tenha uma maior absorção de determinados elementos necessários para o seu desenvolvimento (AZEVEDO, 1998). Esses fungos podem evoluir com seu hospedeiro, havendo assim uma associação que traz benefícios para ambas espécies, como: controle biológico de pragas, bioherbicida e produção de diversos metabólitos ativos (SOUZA, 2004). Esses microrganismos ainda apresentam alta capacidade de produção de enzimas extracelulares de interesse

biotecnológico que podem servir como bioindicadores de vitalidade, controladores de pragas e doenças e ainda são usados para biorremediação de solos contaminados, o que os tornam amplamente aplicáveis na indústria têxtil, de alimentos e fármacos (SOUZA, 2004).

A *Euphorbia tirucalli* L. (Figura 1), é uma planta pertencente a família Euphorbiaceae, nativa do continente Africano, que foi trazida por imigrantes para países de clima tropical, como o Brasil, onde se adaptou facilmente ao clima semiárido, sendo amplamente encontrada em estados da região Nordeste como, Paraíba, Sergipe, Ceará e Rio Grande do Norte. Ela é popularmente conhecida como aveloz, labirinto, mata-verruga, cachorro-pelado, dentre outros (COSTA, LUCIANA SOBRINHA MEDEIROS, 2011).



Figura 1 – Aspecto geral de *Euphorbia tirucalli* L.

Proteases são enzimas responsáveis por clivar as ligações proteicas, resultando em aminoácidos e peptídeos menores, adicionando água à ligação peptídica. Estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, sendo imprescindíveis em todas as formas de vida, inclusive nos organismos procariotos. São responsáveis pela coagulação do sangue, processo de diferenciação celular, catabolismo de proteínas, dentre outras funções (KUMAR; TAGAGI, 1999; MAURER, 2004).

Podem ser classificadas a partir do pH em que apresentam atividade ótima, definindo-as como neutras, alcalinas e ácidas. São, ainda, distinguidas em dois grupos principais: endopeptidases e exopeptidases, diferindo pelo sítio de ação de cada enzima. As exopeptidases reagem em seu processo de hidrólise nas extremidades amino (N), sendo denominadas de aminopeptidases, ou na extremidade carboxi-terminal (C), denominadas de carboxipeptidases, convertendo as proteínas em peptídeos menores ou mesmo em aminoácidos. Já as endopeptidases, também conhecidas como proteinases, agem clivando as proteínas nas porções internas, o que resulta em peptídeos maiores (MUKHERJEE; ADHIKARI; RAI, 2008; RAO et al., 1998).

As proteases compõem um dos mais importantes cercos de enzimas industriais,

abrangendo cerca 60% do mercado mundial de enzimas com finalidade de processos voltados à indústria. Podem ser aplicadas em diversas vertentes do mercado, como indústria química, de alimentos, têxtil, médica, dentre outros (HAKI; RAKSHIT, 2003; REDDY et al., 2008).

Este trabalho teve como objetivo analisar a atividade enzimática de protease pelos fungos endofíticos isolados de *Euphorbia tirucalli* L., uma planta conhecida popularmente como avelós e que possui uma grande variedade de estudos decorrentes de suas características medicinais.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Foram previamente isolados 10 fungos endofíticos de Avelós na cidade de Mossoró, Rio Grande do Norte, e cultivados em BDA a 28°C (denominados de ETT1 a ETT10) a 28°C em câmara BOD para crescimento por sete dias. Retirado dois discos de micélio de 6mm de cada isolado e cultivado por 8 dias em meio específico a 28°C (1,8% de ágar, 1% de gelatina e 1% leite desnatado diluídos em tampão citrato fosfato a 0,1 M com pH 5.0). A reação proteolítica foi observada através da formação de um halo translúcido ou esbranquiçado ao redor da colônia e os diâmetros da colônia e do halo foram medidos para determinar o índice enzimático (IE = diâmetro da colônia / diâmetro da colônia mais a área do halo de degradação). Não foi necessário uso de revelador. Os testes enzimático foram realizados em quatro repetições.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os isolados testados, apenas ETT8 apresentou atividade proteolítica tendo um índice enzimático (IE) igual a 7,5.

As proteases podem ser aplicadas em diversos alvitre, especialmente em detergentes, indústria de couro, biorremediação de efluentes, fármacos e indústria alimentícia (RAO et al., 1998; WARD et al., 2006). Fernandes (2006) realizou uma metodologia semelhante à do presente trabalho e testou a atividade proteolítica em 71 isolados de diferentes fontes, tais como café, solo, amendoim, pimentão, dentre outros, na qual houve atividade positiva em 56 destes. Porém, dentre estes isolados, apenas três tiveram solo como fonte, dois do gênero *Cladosporium* spp. e um *Penicillium* spp., com IE 1,72, 1,43 e 1,13, respectivamente. O resultado observado se assemelha ao presente estudo, pois apresentou um número reduzido de isolados com atividade proteolítica. No entanto, o índice enzimático apresentado para esse isolado ETT8 foi muito superior ao que se preconiza para um bom produtor enzimático (IE ≥ 2,0), demonstrando um grande potencial biotecnológico.

Isolados	Média IE
ETT1	0,00 a*
ETT2	0,00 a
ETT3	0,00 a
ETT4	0,00 a
ETT5	0,00 a
ETT6	0,00 a
ETT7	0,00 a
ETT9	0,00 a
ETT10	0,00 a
ETT8	7,50 b

Tabela 1: Resultados do teste de atividade enzimática de protease de fungos endofíticos de *Euphorbia tirucalli* L.

\*Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

É possível concluir que dentre os fungos endofíticos de *Euphorbia tirucalli* L. existe pelo menos um produtor de protease com grande potencial biotecnológico.

## REFERÊNCIAS

- SOUZA, AQL de et al. **Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Benth.** Acta amazônica, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.
- AZEVEDO, João Lúcio. **Microrganismos endofíticos.** Ecologia microbiana, p. 117-137, 1998.
- HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. **Developments in industrially important thermostable enzymes: a review.** Biores Tech., V. 89, p. 17-34, 2003.
- REDDY, L. V. A.; WEE, Y. J.; YUN, J. S.; RYU, H. W. **Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 trough Plackett-Burman and response surface methodological approaches.** Biores Techn., V. 99, p. 2242-2249, 2008.
- RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GATHE, M. S.; DESHPANDE, V. V. **Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases.** Microbiol Mol Biol Rev., V. 62, p. 597-635, 1998.
- WARD, O. P.; QIN, W. M.; DHANJOON, J.; YE, J.; SINGH, A. **Physiology and biotechnology of *Aspergillus*.** Advan App Microbiol, V. 58, p. 1-75, 2006.
- MUKHERJEE, A. K.; ADHIKARI, H.; RAI, S. K. **Production of alkaline proteases by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using Imperata cylindrica grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation.** Biochem Engin Jour., V. 39, p. 353-360, 2008.
- KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. **Research review paper Microbial Alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint.** Biotech Advan., V. 17, p. 561-594, 1999.
- MAURER, K. H. **Detergent proteases.** Curr Opin Microbiol., V. 15, p. 330-334, 2004.



COSTA, L. S. **Estudo do uso do aveloz (*Euphorbia tirucalli*) no tratamento de doenças humanas: uma revisão.**[s.l.] Universidade Estadual da Paraíba, 2011

## ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE PROTEASES, AMILASES, UREASES, LIPASES E TANASES POR FUNGOS E BACTÉRIAS ISOLADAS DE ÁREA COSTEIRA DO NORDESTE DO BRASIL

### **Igor Luiz Vieira de Lima Santos**

Universidade Federal de Campina Grande,  
Unidade Acadêmica de Biologia e Química  
Cuité-Paraíba

### **Mykaella Joyce Silva de Araújo**

Universidade Federal de Campina Grande,  
Unidade Acadêmica de Saúde  
Cuité-Paraíba

### **Amanda Geovana Pereira de Araújo**

Universidade Federal de Campina Grande,  
Unidade Acadêmica de Saúde  
Cuité-Paraíba

### **Maria das Graças Morais de Medeiros**

Universidade Federal de Campina Grande,  
Unidade Acadêmica de Saúde  
Cuité-Paraíba

### **Carliane Rebeca Coelho da Silva**

EMBRAPA-CNPA, Departamento de  
Melhoramento Genético Molecular  
Campina Grande-Paraíba

**RESUMO:** Microrganismos presentes nos mais diversos ambientes representam uma fonte atrativa de enzimas. As proteínas microbianas têm uma maior vida útil e podem ser armazenadas durante semanas sem perda significativa de atividade. As enzimas produzidas como metabólitos por bactérias ou fungos são potencialmente aplicáveis nas mais diversas áreas industriais de produção

ou transformação. Isto se dá devido à catálise biológica de processos de interesse comercial eficientemente e é nesse contexto que reside a importância da busca por novas possibilidades biológicas. Este trabalho teve como objetivo analisar a produção de proteases, amilases, ureases, lipases e tanases por linhagens do fungo *Rhizopus arrhizus* (WFCC/UCP 402), e das bactérias *Bacillus licheniformis* (WFCC/UCP 1008) e *Geobacillus stearothermophilus* (WFCC/UCP 1520) que foram isoladas de mangue na cidade de Rio Formoso no litoral sul de Pernambuco-Brasil. Estas linhagens foram submetidas aos testes de produção dessas enzimas em meios de cultura específicos em variadas temperaturas e tempos de amostragem. Os resultados obtidos demonstraram que nas condições de temperaturas empregadas nenhum dos três isolados produziu proteases e tanases de modo eficiente em qualquer tempo de amostragem, mas todas produziram ureases em diversos níveis sendo verificada maior eficiência em *R. arrhizus*. As amilases e lipases foram produzidas apenas pelas linhagens de bactérias. Sendo assim, o *R. arrhizus* deve gerar melhor produção de ureases, o *B. licheniformis* deve ser utilizado na produção de amilases e ureases e o *G. stearothermophilus* na produção de ureases e lipases. Os resultados obtidos demonstram o potencial dos microrganismos estudados em produzir enzimas de interesse

industrial.

**PALAVRAS-CHAVE:** microrganismos, produção enzimática, bactérias, fungos.

## PRODUCTION ANALYSIS OF THE PROTEASES, AMYLASES, UREASES, LIPASES AND TANASES BY FUNGAL AND BACTERIA ISOLATED FROM THE NORTHEAST BRAZIL

**ABSTRACT:** Microorganisms present in the most diverse environments represent an attractive source of enzymes. Microbial proteins have a longer shelf life and can be stored for weeks without significant loss of activity. Enzymes produced as metabolites by bacteria or fungi are potentially applicable in the most diverse industrial areas of production or processing. This is due to the biological catalysis of processes of commercial interest efficiently and it is in this context that lies the importance of the search for new biological possibilities. The objective of this work was to analyze the production of proteases, amylases, ureases, lipases and tanases by *Rhizopus arrhizus* (WFCC / UCP 402) and *Bacillus licheniformis* (WFCC / UCP 1008) and *Geobacillus stearothermophilus* (WFCC / UCP 1520) bacteria that were isolated from mangroves in the city of Rio Formoso in the southern coast of Pernambuco-Brazil. These strains were subjected to production tests of these enzymes in specific culture media at varying temperatures and sampling times. The results showed that under the temperature conditions employed none of the three isolates produced proteases and tanases efficiently at any sampling time, but all produced ureases at different levels and higher efficiency in *R. arrhizus*. Amylases and lipases were produced only by bacterial strains. Thus, *R. arrhizus* should generate better ureases production, *B. licheniformis* should be used for amylase and ureases production and *G. stearothermophilus* for ureases and lipases production. The obtained results demonstrate the potential of the studied microorganisms in producing enzymes of industrial interest.

**KEYWORDS:** microorganisms, enzyme production, bacteria, fungi.

### 1 | INTRODUÇÃO

Existe um clamor social por atividades produtivas sustentáveis valorizando assim a produção de insumos e processos químicos que demandem matéria prima renovável. Neste ponto que se insere a utilização de microrganismos capazes de processos bioquímicos mais eficientes e que favoreçam a produção em larga escala de insumos metabólicos essenciais para os mais diversos ramos industriais fortalecendo assim a sua competitividade. É necessário observar o interesse na melhoria dos processos evitando assim o dispêndio de recursos e aumentando a sua eficiência. Neste contexto existe o favorecimento da utilização de matérias primas renováveis por tecnologias de biotransformação e biocatálise. Estas tecnologias já são realidade nas indústrias, mas a pesquisa continuada favorece o aparecimento de novos processos e novas oportunidades de mercado. Sua implementação resulta em produtos de maior

qualidade, obtidos por processos de menor consumo energético e de menor impacto ambiental.

O potencial biocatalítico dos microrganismos tem sido empregado há séculos para produzir pão, vinho, vinagre e outros produtos comuns sem conhecimento da base bioquímica de seus ingredientes. Enzimas microbianas ganharam interesse por seus usos difundidos na indústria e medicina devido à sua estabilidade, atividade catalítica e facilidade de produção e otimização da obtenção diferente das enzimas vegetais e animais. O uso de enzimas em várias indústrias (por exemplo, alimentos, agricultura, produtos químicos e produtos farmacêuticos) está aumentando rapidamente devido à redução do tempo de processamento, baixo consumo de energia, custo-benefício, características não-tóxicas e ecológicas. Enzimas microbianas são capazes de degradar compostos químicos tóxicos de resíduos industriais e domésticos (compostos fenólicos, nitrilos, aminas, etc.) por degradação ou conversão (SINGH et al., 2016). Entre as enzimas de interesse para a indústria, as mais empregadas são as proteases, que respondem por 60% do mercado mundial de enzimas.

Bactérias e fungos presentes no solo desempenham uma função essencial em vários ciclos biogeoquímicos sendo responsáveis pela ciclagem de compostos orgânicos. Microrganismos do solo influenciam os ecossistemas pela contribuição a saúde, nutrição das plantas e a própria química do solo e fertilidade (ANBU et al., 2017). Os microrganismos apresentam uma extensa diversidade genética e desempenham inúmeras funções nos mais variados processos dos ecossistemas. Sendo assim é essencial o conhecimento e aproveitamento dos microrganismos isolados dos mais diferentes ecossistemas naturais. Será com isso que um conjunto de aplicações antes desconhecidas podem ser descobertas analisando-se suas vias metabólicas e conseqüentemente seus metabólitos que podem conter moléculas até então desconhecidas e que podem ser utilizadas em benefício da humanidade.

O mercado mundial de enzimas industriais foi estimado em 2016 movimentar 4.61 bilhões de dólares e acredita-se que a comercialização mundial dessas substâncias movimente aproximadamente 320 milhões de dólares anualmente. Tal importância econômica justifica o interesse gerado pela busca de microrganismos capazes de influenciar favoravelmente a descoberta de processos e produtos de suas vias que envolvam tecnologia de baixo custo energético e que possuam menor impacto ambiental na sua obtenção (DIAS e CARVALHO, 2017). As enzimas, principais alvos da busca pelos cientistas, são substâncias orgânicas específicas compostas por polímeros de aminoácidos que atuam como catalisadores no metabolismo dos seres vivos. Estas proteínas atuam em vias biossintéticas nas células vivas e estão presentes em todos os organismos sejam plantas ou animais, ou nos mais simples, como formas unicelulares de vida, aos mais desenvolvidos (GAZZALA et al., 2016).

O desenvolvimento tecnológico mundial avança cada vez mais no caminho dos processos biotecnológicos, principalmente aqueles catalisados por enzimas de alta eficiência, baixo custo e facilidade de produção. Sendo assim, a procura por novas

moléculas de interesse biotecnológico é uma ferramenta atual e necessária para a descoberta de novos processos que otimizem a produção industrial e acarretem em inovação para as empresas. Isto impactaria de modo benéfico diretamente a cadeia produtiva nas mais diferentes áreas. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a presença de enzimas com potencial interesse biotecnológico industrial dos tipos proteases, amilases, uréases, lipases e tanases por microrganismos das espécies *R. arrhizus*, *B. licheniformis* e *G. stearothermophilus* quando submetidos a diferentes temperaturas e tempos de crescimento. Este tipo de análise favorece a obtenção de dados eficientes para uma produção em larga escala possibilitando o direcionamento dos fermentadores da linha de produção.

## 2 | METODOLOGIA

### Microrganismos

As linhagens de microrganismos utilizadas foram do fungo filamentososo *Rhizopus arrhizus* (WFCC/UCP 402) e das bactérias *Bacillus licheniformis* (WFCC/UCP 1008) e *Geobacillus stearothermophilus* (WFCC/UCP 1520) isoladas de substratos de mangue localizado na cidade de Rio Formoso no litoral sul do estado de Pernambuco – Brasil. Elas foram obtidas do banco de cultura do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco, o qual é cadastrado no World Federation Culture Collection-WFCC.

### Meios de manutenção

A linhagem do fungo *R. arrhizus* foi cultivada em meio Sabouraud Dextrose ágar (p/v) peptona 10g, glicose 40g, ágar bacteriológico 15g, água destilada 1000ml. Já as bactérias *B. licheniformis* e o *G. stearothermophilus* foram mantidas em ágar nutritivo (p/v) peptona 5g, extrato de carne 3g, cloreto de sódio 1g, ágar bacteriológico 15g, água destilada 1000ml. Estas linhagens foram mantidas em temperatura de 5°C, sendo repicadas a cada 3 meses com o intuito de obter culturas jovens.

### Meios para detecção enzimática

A atividade enzimática foi determinada em quintuplicata em meio específico para detecção de: proteases (extrato de carne 3g, peptona 5g, ágar bacteriológico 15g, água destilada 1000 e pH 7,0, adicionado de uma solução de gelatina de 5g diluída em 100ml de água destilada com pH 6,0); amilases (extrato de carne 3g, peptona 5g, amido 2g, ágar bacteriológico 20g e água destilada 1000mL em pH 7,0); ureases, camada inferior: ágar bacteriológico 20g, peptona 10g, glicose 40g, água destilada 1000ml, solução de uréia 50ml (1% p/v) em pH 6,5, camada superior: ágar bacteriológico 20g, solução tampão fosfato de sódio monobásico 255ml (2,76% p/v),

solução tampão fosfato de sódio dibásico 245ml (5,37% p/v), solução uréia 50ml (1% p/v), solução de azul de bromotimol 50ml, água destilada 500ml em pH 6,5; lipases (peptona 10g, cloreto de sódio 5g, cloreto de cálcio bihidratado 0,1g, ágar bacteriológico 20g, 10ml de tween 20 (esterilizado em vapor fluente), água destilada 1000ml em pH 6,0); e tanases, extrato de malte 30g, ágar bacteriológico 15g, ácido tânico 0,5% (p/v), água destilada 1000ml e pH 6,5.

### **Preparação da suspensão microbiana**

Para preparação das suspensões microbianas foram obtidas suspensões esporicas de  $10^8$  esporos/ml a partir de culturas jovens de *R. arrhizus* crescidas em Sabouraud (28°C/168h); e suspensão bacteriana de  $10^8$  CFU/ml a partir de culturas jovens de *B. licheniformis* e *G. stearothermophilus* crescidas em ágar nutritivo (30°C/24h). Posteriormente, 50µl das suspensões microbianas foram inoculadas em furo com diâmetro de 6mm no centro das placas contendo 20ml dos meios de cultura específicos para detecção enzimática.

### **Determinação da atividade enzimática**

Após a inoculação das soluções microbianas as placas foram incubadas a 28°, 37° e 45°C. A estimativa visual dos halos de atividade enzimática foi realizada em intervalos de tempo de 24, 48 e 72h.

Atividade Proteolítica: Gelatina foi usada para avaliar a atividade proteolítica. Para melhor visualização do halo, após as 72 h de incubação, a superfície das placas foi coberta com solução reveladora de iodo (0,1N).

Atividade Amilolítica: a habilidade de degradar amido foi usada como critério para determinação da produção de enzimas amilolíticas. Após 72 h de incubação a 28, 37 e 45° C, as placas foram reveladas com iodo e a atividade amilolítica avaliada pela zona clara ao redor da colônia.

Atividade Urealítica: a detecção da enzima urease foi confirmada pela mudança do pH e cor do meio, de verde para amarelo.

Atividade Lipolítica: após 72 h de incubação a 28, 37 e 45°C o halo de degradação do Tween 20 foi evidenciado pela revelação das placas com iodo e a atividade lipolítica avaliada pela zona clara ao redor da colônia.

Atividade Tanalítica: após 72 h de incubação a 28, 37 e 45°C deveria ser observada a degradação do ácido tânico e a clarificação do meio ao redor da colônia.

## **3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **Proteases**

As proteases são importantes enzimas, utilizadas na indústria alimentícia,

têxtil, farmacêutica e de detergentes (SINGH et al, 2016). Os resultados obtidos demonstraram a habilidade dos microrganismos testados em crescer nas diferentes temperaturas para o meio de cultura contendo gelatina como fonte de carbono adicional (Tabela 1), contudo foi observada a incapacidade dos microrganismos em produzir proteases de forma eficiente nas condições avaliadas (Figura 1). Isto foi verificado pela não formação de halos nas placas analisadas apesar do crescimento observado.

Organismos	PROTEASES			AMILASES			UREASES			LIPASES			TANASE		
	28°C	37°C	45°C	28°C	37°C	45°C	28°C	37°C	45°C	28°C	37°C	45°C	28°C	37°C	45°C
<i>Rhizopus arrhizus</i>	3+	3+	3+	3+	3+	-	3+	3+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	2+	3+	3+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	1+	1+	3+	-	-	-
<i>G. stearothermophilus</i>	1+	1+	3+	1+	1+	2+	2+	3+	3+	1+	1+	1+	-	-	-

Tabela 1: Média das quintuplicatas do índice de crescimento microbiológico para todos os meios testados após 72 horas de incubação.

1+ = Baixo Crescimento, 2+ = Médio Crescimento, 3+ = Alto Crescimento.

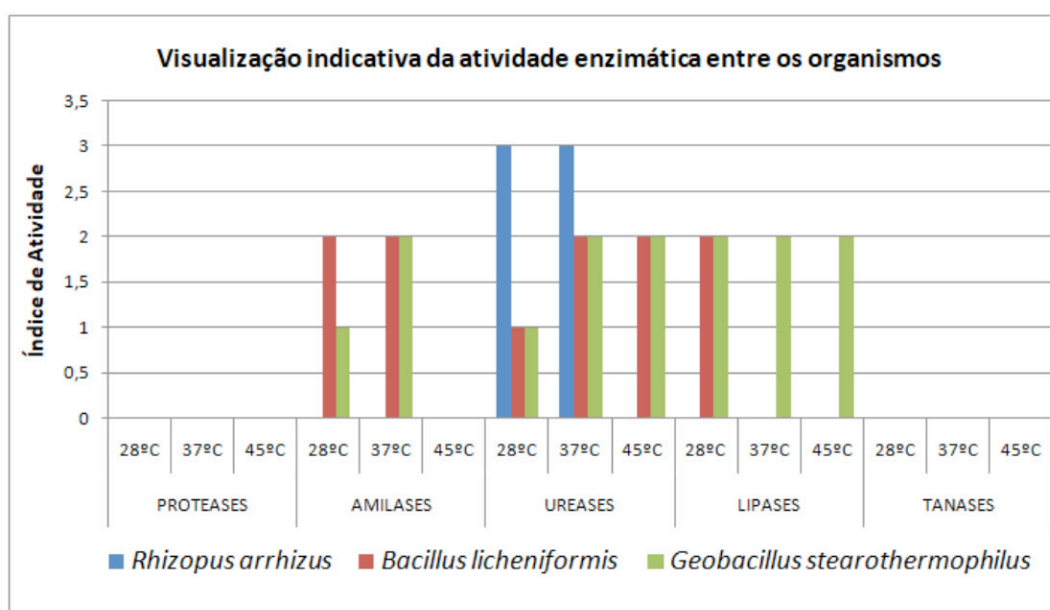


Figura 1. Visão geral com comparação indicativa global do crescimento e das atividades enzimáticas dos microrganismos testados para todas as enzimas analisadas no tempo de 72h. Índice de Atividade: H1 = Baixa atividade, H2 = Média atividade, H3 = Alta atividade.

Esperava-se que o *G. stearothermophilus* por ser uma linhagem termofílica, ou seja, organismo que apresenta maior afinidade metabólica por altas temperaturas apresentaria melhor taxa de crescimento na temperatura de 45°C chegando a níveis 3+ que foram considerados como de alto crescimento. O fato de ele ser um organismo termofílico pode ter influenciado o seu baixo crescimento, em níveis 1+, nas temperaturas de 28° e 37°C. Diferentemente do *Bacillus* que foi mais estável apresentando níveis de crescimento mais uniformes para todas as enzimas e temperaturas testadas. Mas isso tudo pode ser resultado de uma interação entre a capacidade de crescimento em certa temperatura e a disponibilidade do nutriente específico. Após 72h o fungo *R. arrhizus*

apresentou alto crescimento 3+ principalmente nas temperaturas de 28 °C e 37 °C, demonstrando uma adaptabilidade mais estreita quando se refere a temperatura, diferentemente das bactérias estudadas que cresceram nas 3 temperaturas, com exceção apenas no meio para produção de tanases. Shiozaki et al. (2008) descreveram o crescimento de *R. arrhizus* em meio de cultura contendo pireno como fonte adicional de carbono. O seu crescimento em diferentes condições de temperatura pode fazer dela uma ótima opção para o cultivo em larga escala principalmente se for de enzimas do tipo ureases. Assim como o *R. arrhizus*, as bactérias apresentaram crescimento celular do tipo 3+, em temperaturas variando de 37°C a 45°C, sendo descrita previamente a grande capacidade de crescimento desses microrganismos em condições desfavoráveis de fonte de carbono (VASCONCELOS et al, 2009).

Os halos transparentes de degradação da gelatina, presente como única fonte de carbono, não foram distinguíveis em nenhuma placa de crescimento analisada apesar do crescimento dos microrganismos. Este fato pode ter sido devido à inabilidade dos microrganismos testados em degradar tal composto durante o período de 72h, estando o crescimento celular relacionado com a capacidade dos microrganismos em utilizar metabolicamente as outras substâncias presentes no meio de cultura em detrimento da utilização do indicador (gelatina). Também é sugerido que os microrganismos avaliados possam ter degradado de forma bastante suave a gelatina, o que tornou difícil a identificação dos halos que comprovariam a presença de proteases. Na literatura, a produção de proteases vem sendo descrita para diferentes microrganismos (NASCIMENTO e MARTINS, 2004; NAJAFI et al., 2005; FERRACINI-SANTOS e SATO, 2009; SANGEETHA et al., 2010). Havendo a descrição do uso de amido, glicose e caseína como fontes principais de carbono, e nitrato de amônio e extrato de levedura como fontes de nitrogênio. Sendo sugeridos testes adicionais em presença de diferentes fontes de carbono e nitrogênio para confirmar a não produção de proteases pelos microrganismos testados.

## Amilases

Na diversa gama de enzimas existentes as amilases apresentam grande importância para a biotecnologia com um amplo campo de aplicações. Na indústria de alimentos são empregadas na liquefação do amido para a obtenção de glicose, em produtos de panificação, em cervejarias e bebidas fermentadas, em cereais para alimentação infantil como também são aplicadas na ração animal.

Os resultados de crescimento para as placas de teste de amilases demonstraram que *R. arrhizus* apresentou crescimento de nível 3+ nas temperaturas de 28 e 37°C mas não apresentou crescimento a 45°C. Diferentemente das bactérias *B. licheniformis* que aumentou de nível 2+ para 3+ e *G. stearothermophilus* que aumentou de 1+ para 2+ entre 37° e 45°C, respectivamente (Tabela 1).

As amilases estão entre as mais importantes enzimas (GOPINATH et al., 2017).



A presença de amilase observada no crescimento de *B. licheniformis*, corrobora com a literatura que descreve esse microrganismo como grande produtor de amilases comerciais (RODRÍGUEZ et al., 2006). A não produção de amilase por *R. arrhizus*, em nenhuma das condições avaliadas sugere que sejam testadas outras fontes de carbono como indutoras da produção da respectiva enzima, visto que em trabalho de Moreira et al, (2001) foi induzida a produção de amilase por *Aspergillus* sp. em meio contendo  $\alpha$ -metil-D-glucosídeo, um análogo sintético da maltose. Embora tenham sido descritas bactérias termofílicas produtoras de amilases (GORLACH-LIRA e COUTINHO, 2007), para as condições avaliadas *B. licheniformis* e *G. stearothermophilus* não foram capazes de degradar o amido à temperatura de 45°C. Sugerindo que para que estas bactérias expressem amilases eficientemente seja preferível a incubação em temperaturas abaixo de 45°C.

## Ureases

As ureases são enzimas que catalisam a hidrólise do nitrogênio em compostos de amônia, utilizando a uréia e substratos protéicos de baixo peso molecular. Tem grande importância na agricultura sendo muito utilizada em processos envolvendo o aumento da fertilização em solos ricos contendo diversos minerais.

Na Tabela 1 é observada a prevalência de alto crescimento de todos os isolados nas diferentes condições analisadas, demonstrando a capacidade de utilização da uréia como única fonte de nitrogênio. O *R. arrhizus* a 45°C não apresentou crescimento, sendo sugerida que a capacidade de *R. arrhizus* em degradar uréia, como fonte de nitrogênio seja dependente da temperatura de incubação. Devido a essa característica é recomendado temperaturas inferiores a 45°C para processos de otimização da produção de ureases por *R. arrhizus* (WFCC/UCP 402). A literatura descreve a influência de fatores ambientais na produção de urease por fungos (PAULA et al, 2006; CERCIANI et al, 2008; PUPIN et al, 2009). O *G. stearothermophilus* apresentou crescimento do tipo 2+ à temperatura de 28°C que pode ter sido devido ao seu menor rendimento metabólico estar associado a temperaturas mais baixas (SANTOS FILLHO e PENA, 2003). Adicionalmente a estes resultados pode-se sugerir que a presença de glicose como fonte de carbono do meio de cultivo para os testes de presença de ureases foi a melhor opção para a promoção do crescimento celular, quando comparado com a composição dos meios de cultura utilizados para os testes de produção de proteases, amilases, lipases e tanases.

Para as bactérias *B. licheniformis* e o *G. stearothermophilus* as temperaturas que apresentaram melhores resultados para a produção de ureases foram de 37 e 45°C, sendo observada média atividade, enquanto que a 28°C foi observada baixa

atividade enzimática (Figura 1).

## Lipases

De outro modo, as lipases são enzimas que são usadas em indústrias químicas e de cosméticos, farmacêuticas, indústrias de produção de papel e celulose. Na indústria têxtil as lipases atuam na fiação dos tecidos, na química ela melhora a absorção de tintas sintéticas, apresentam solubilidade em água, contudo catalisam reações que possuem substratos lipofílicos.

Para as condições avaliadas não foi observado crescimento micelial de *R. arrhizus* e foi observado baixo crescimento para *B. licheniformis* e *G. stearothermophilus*, sendo sugerida dificuldade desses microrganismos em degradar Tween 20, adicionado ao meio de cultura como única fonte de carbono. Embora seja sugerida a produção de lipases por *B. licheniformis* à temperatura de 40°C (SANGEETHA et al., 2010), no presente estudo o isolado apenas apresentou produção de lipase à 28°C, embora tenha havido alto crescimento celular à 45°C (Tabela 1).

Para esta enzima os halos de degradação revelados pelo iodo foram unicamente de nível H2 (média atividade). Em trabalho de Kumari et al. (2009) é sugerido o tamanho do inóculo como fator importante para uma grande produção de lipase. Para *B. licheniformis* a produção de lipase apenas ocorreu à 28°C e para *G. stearothermophilus* a produção de lipase pôde ser observada em todas as temperaturas avaliadas durante o experimento. Nawani et al. (2006) descreve bactérias termofílicas da família Bacillaceae como produtoras de lipase em temperaturas ótimas de 60°C, sendo sugerido avaliar a atividade da lipase produzida pelo isolado *G. stearthermophilus* em temperaturas acima de 45°C.

## Tanases

As tanases são enzimas que têm a função de hidrolisar ésteres de taninos produzindo ácido gálico e glicose. As maiores aplicações destas enzimas são na produção de ácido gálico, no processamento da cerveja e nos processos de clarificação de sucos e chás instantâneos atuando ainda no tratamento de efluentes contaminados com compostos fenólicos

Os microrganismos testados não cresceram no meio utilizado para os testes de produção enzimática de tanases, mesmo ampliando o período de crescimento para 120h. Conseqüentemente não se fez presente nenhum halo de degradação sendo sugerido que os microrganismos testados não foram capazes de utilizar o ácido tânico como fonte de carbono. Isto pode ter sido devido à composição do meio utilizado, sendo este o único meio a possuir extrato de malte e ácido tânico em sua composição que de alguma forma pode ter influenciado na viabilidade dos inóculos realizados. A literatura descreve diferentes linhagens de *Aspergillus* e *Penicilium* (PINTO et al., 2001;

COSTA et al., 2008; MATA-GOMEZ et al., 2009), *Lactobacillus plantarum* (CURIEL et al., 2010), *Serratia sp.* (BELUR et al., 2010) e *Bacillus licheniformis* (MONDAL e PATI 2000; MOHAPATRA et al., 2009) como produtoras de tanases, contudo as cepas de isolados utilizados no presente trabalho não foram capazes de produzir tanases nas condições experimentais (Figura 1).

#### 4 | CONCLUSÕES

Os isolados *Rhizopus arrhizus*, *Bacillus licheniformis*, e *Geobacillus stearothermophilus* demonstraram serem indicados para testes adicionais de potencial produção biotecnológica em larga escala de amilases, ureases e lipases. Por outro lado, não se deve esperar muito benefício industrial na produção de proteases e tanases, visto que não foi observada a presença de halos de degradação para estas enzimas. O *R. arrhizus* deve gerar melhor produção de ureases, o *B. licheniformis* deve ser utilizado na produção de amilases e ureases e o *G. stearothermophilus* na produção de ureases e lipases. Dito isto, é importante ressaltar a competência destes organismos em produzir certos tipos de enzimas que possuem interesse industrial para estudos futuros.

#### REFERÊNCIAS

ANBU et al. Microbial enzymes and their applications in industries and medicine 2016. **BioMed Research International**, 2016.

BELUR, P. D.; GOPAL, M.; NIRMALA, K. R.; BASAVARAJ, N. Production of novel cell-associated tannase from newly isolated *Serratia ficaria* DTC. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, n.4, p.732-736, 2010.

CENCIANI, K.; FREITAS, S. S.; CRITTER, S. A. M.; AIROLDI, C. Microbial enzymatic activity and thermal effect in a tropical soil treated with organic materials. **Scientia Agricola**, v.65, n.6, p.674-680, 2008.

COSTA, A. M.; RIBEIRO, W. X.; KATO, E.; MONTEIRO, A. R. G.; PERALTA, R. M. Production of tannase by *Aspergillus tamaris* in submerged cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.51, n.2, p.399-404, 2008.

DIAS, R. F. e DE CARVALHO, C. A. A. Bioeconomia no Brasil e no Mundo: Panorama Atual e Perspectivas. **Rev. Virtual Quim.** v.9, n.1, p.410-430, 2017.

FERRACINI-SANTOS, L.; SATO, H.H. Production of alkaline protease from *Cellulosimicrobium cellulans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, n.1, p.54-60, 2009.

GHAZALA, I. et al. Screening and molecular identification of new microbial strains for production of enzymes of biotechnological interest. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v.59, 2016

GOPINATH, S. C. B. et al. Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. **BioMed Research International**. p.2017:127, 2017.

- GORLACH-LIRA, K.; COUTINHO, H. D.M. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.1, p.135-141, 2007.
- GUPTA, R.; PARESH, G.; MOHAPATRA, H. ; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial  $\alpha$ -Amylases: a Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**, v.38, p. 1599-1616, 2003.
- KOBLITZ, M. G. B.; PASTORE, G. M. Purificação Parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus sp.* **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.2, p.287-292, 2004.
- KUMARI, A.; MAHAPATRA, P.; BANERJEE, R. Statistical optimization of culture conditions by response surface methodology for synthesis of lipase with *Enterobacter aerogenes*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, n.6, p.1349-1356, 2009.
- MATA-GOMEZ, M.; RODRIGUEZ, L. V.; RAMOS, E. L.; RENOVATO, J.; CRUZ-HERNANDEZ, M.A.; RODRIGUEZ, R.; CONTRERAS, J.; AGUILAR, C.N. A novel tannase from the xerophilic fungus *Aspergillus niger* GH1. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, n.9, p. 987-996, 2009.
- MOBLEY, H. L. T.; ISLAND, M. D.; HAUSINGER, R. P. Molecular Biology of Microbial Ureases. **Microbiology Reviews**, v.59, p.451-480, 1995.
- MOHAPATRA, P. K.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. Effect of amino acids on tannase biosynthesis by *Bacillus licheniformis* KBR6. **Journal of Microbiology, Immunology, and Infection**, v.42, n.2, p.172-175, 2009.
- MONDAL, K. C.; PATI, B. R. Studies on the extracellular tannase from newly isolated *Bacillus licheniformis* KBR 6. **Journal of Basic Microbiology**, v.40, n.4, p.223-232, 2000.
- MOREIRA, F. G.; LENARTOVICZ, V.; SOUZA, C. G. M.; RAMOS, E. P.; PERALTA, R. M. The use of alpha-methyl-D-glucoside, a synthetic analogue of maltose, as inducer of amylase by *Aspergillus sp* in solid-state and submerged fermentations. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, n.1, p.15-19, 2001.
- NAJAFI, M.F.; DEOBAGKAR, D.; DEOBAGKAR, D. Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.8, n.2, p.79-85, 2005.
- NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS, M. L. L. Produção de proteases por *Bacillus sp* SMIA-2 crescido em soro de água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.582-588, 2006.
- NASCIMENTO, W.C.A.; MARTINS, M.L.L. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus sp.* **Brazilian journal of microbiology**, v.35, n.1-2, p. 91-96, 2004.
- NAWANI, N.; SINGH, R.; KAUR, J. Immobilization and stability studies of a lipase from thermophilic *Bacillus sp*: The effect of process parameters on immobilization of enzyme. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.9, n.5, p.559-565, 2006.
- PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. Enzyme Technology. 1. ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 2005.
- PAULA, A. M.; SOARES, C. R. F. S.; SIQUEIRA, J. O. Biomassa, atividade microbiana e fungos micorrízicos em solo de "landfarming" de resíduos petroquímicos. **Revista Brasileira de Engenharia e Agricultura Ambiental**, v.10, n.2, p. 448-455, 2006.
- PINTO, G. A. S.; LEITE, S. G. F.; TERZI, S. C.; COURI, S. Selection of tannase-producing *Aspergillus niger* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, n.1, p.24-26, 2001.

PUPIN, B.; FREDDI, O. S.; NAHAS, E. Microbial alterations of the soil influenced by induced compaction. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.33, n.5, p.1207-1213, 2009.

SANGEETHA, R.; GEETHA, A.; ARULPANDI, I. Concomitant production of protease and lipase by *Bacillus licheniformis* VSG1: production, purification and characterization. **Brazilian journal of Microbiology**. v.41, n.1, p.179-185, 2010.

SANTOS FILHO, G. C.; PENNA, T. C. V. Validação do processamento térmico de um produto protéico vegetal enlatado. **Revista Brasileira de Ciências Farmacéuticas**, v.39, n.4, p.391-401, 2003.

SINGH, R. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **Biotech**. v.6, n.2, p:174-176., 2016.

SHIOSAKI, R.K.; ALBUQUERQUE, C. D. C.; OKADA, K.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Monitoring the effect of pyrene on the germination and radial growth of the wild and mutant strains of *Rhizopus arrhizus* UCP402. **Brazilian Archives of biology and Technology**, v.51, n.3, p.613-621, 2008.

VASCONCELLOS, S. P.; CEREDA, M. P.; CAGNON, J. R.; FOGLIO, M.A.; RODRIGUES, R.A.; MANFIO, G. P.; OLIVEIRA, V. M. *In vitro* degradation of linamarin by microorganisms isolated from cassava wastewater treatment lagoons. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, n.4, p.879-883, 2009.

## **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 Candido 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

Áreas degradadas 17

Avelós 11, 12, 14, 15, 53, 54, 56

### B

Bactérias 2, 6, 8, 19, 26, 59, 60, 61, 62, 65, 66, 67

### C

Candida parapsilosis 30, 31, 32, 34, 37, 38, 40

Controle-biológico 41

Culturas 4, 5, 7, 21, 41, 43, 44, 47, 49, 62, 63

### D

Descontaminante 17

### E

Enzimas 1, 2, 3, 6, 7, 11, 12, 13, 14, 19, 26, 41, 46, 48, 53, 54, 55, 56, 59, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69

Enzymes 12, 16, 42, 50, 54, 57, 60, 68, 69, 70

### F

Fungal metabolites 12, 54

Fungo 4, 5, 6, 7, 8, 9, 17, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 41, 46, 47, 48, 50, 53, 54, 59, 62, 64, 71

### I

Infecções fúngicas 30, 31

### M

Meio-ambiente 41

Metabólitos fúngicos 12, 54

Microrganismos 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 17, 20, 31, 35, 36, 41, 45, 53, 54, 57, 59, 60, 61, 62, 64, 65, 67

### P

Poluentes 7, 17, 19, 20, 26

Produção enzimática 60, 67

## S

Solo 4, 15, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 43, 49, 56, 61, 69, 70

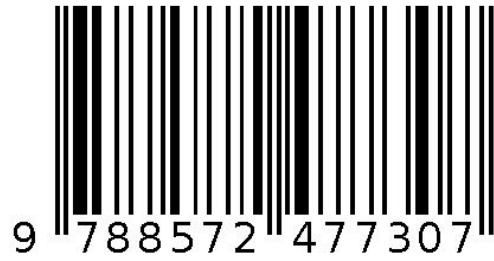
## T

Taxonomia 30, 34, 35

Tecnologia 2, 3, 41, 51, 61, 69



Agência Brasileira do ISBN  
ISBN 978-85-7247-730-7



9 788572 477307