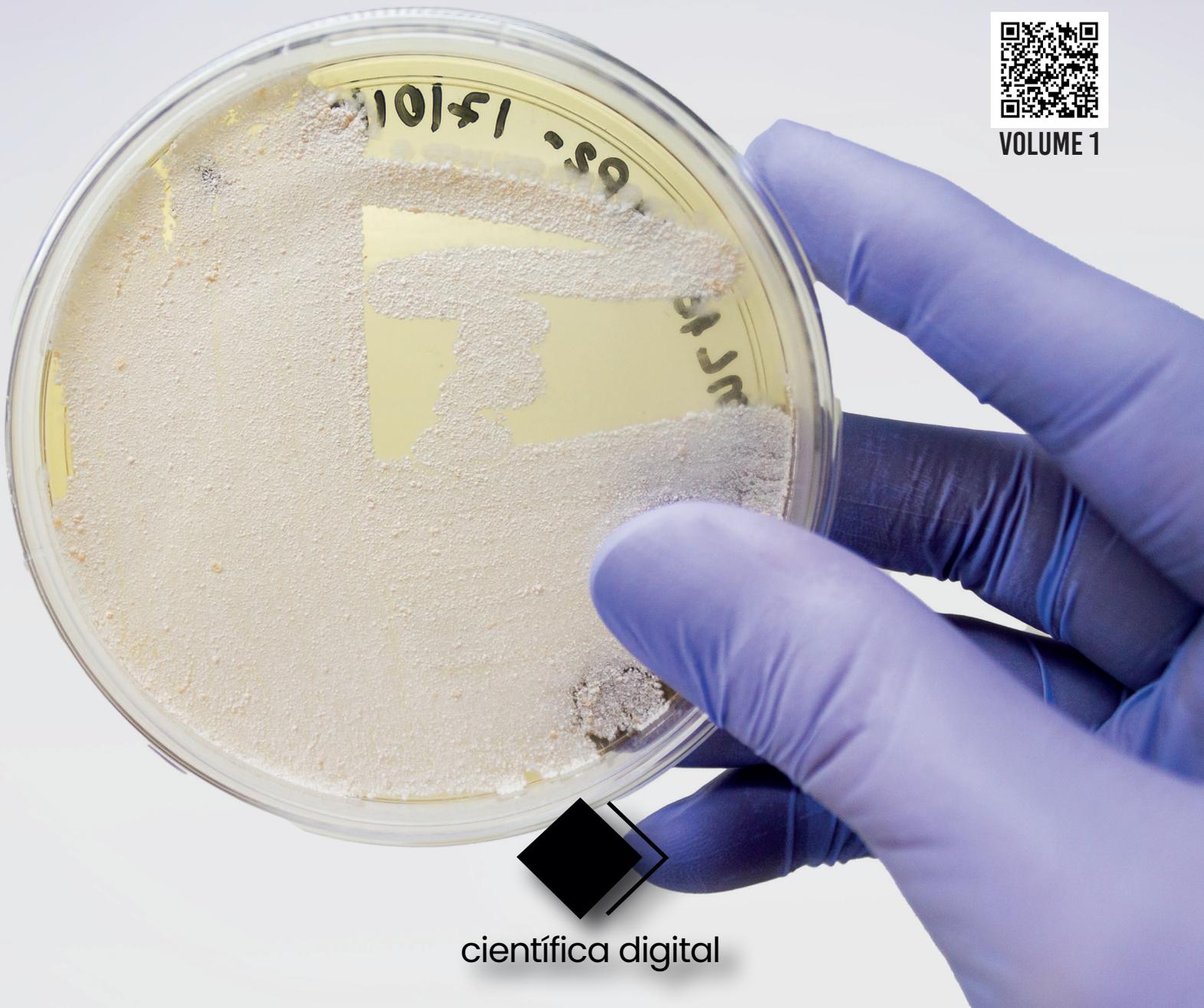


Silvia Katrine Rabelo da Silva
Sara Freitas de Sousa
Raphael Carlos Ferrer de Santana
(Orgs.)

BIOTECNOLOGIA **MICROBIANA**



VOLUME 1



científica digital

**Silvia Katrine Rabelo da Silva
Sara Freitas de Sousa
Raphael Carlos Ferrer de Santana
(Orgs.)**

BIOTECNOLOGIA MICROBIANA

VOLUME 1

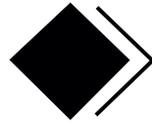


1ª EDIÇÃO



científica digital

2023 - GUARUJÁ - SP



científica digital

EDITORA CIENTÍFICA DIGITAL LTDA

Guarujá - São Paulo - Brasil

www.editoracientifica.com.br - contato@editoracientifica.com.br

Diagramação e arte

Equipe editorial

Imagens da capa

Adobe Stock - licensed by Editora Científica Digital - 2022

Revisão

Autores e Autoras

2023 by Editora Científica Digital

Copyright© 2023 Editora Científica Digital

Copyright do Texto © 2023 Autores e Autoras

Copyright da Edição © 2023 Editora Científica Digital

Acesso Livre - Open Access

Parecer e revisão por pares

Os textos que compõem esta obra foram submetidos para avaliação do Conselho Editorial da Editora Científica Digital, bem como revisados por pares, sendo indicados para a publicação.

O conteúdo dos capítulos e seus dados e sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores e autoras.

É permitido o download e compartilhamento desta obra desde que pela origem da publicação e no formato Acesso Livre (Open Access), com os créditos atribuídos aos autores e autoras, mas sem a possibilidade de alteração de nenhuma forma, catalogação em plataformas de acesso restrito e utilização para fins comerciais.



Esta obra está licenciada com uma Licença Creative Commons Atribuição-Não Comercial-Sem Derivações 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

B616

Biotechnology microbiana - Volume 1 / Organizadores Silvia Katrine Rabelo da Silva, Sara Freitas de Sousa, Raphael Carlos Ferrer de Santana. – Guarujá-SP: Científica Digital, 2023.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-65-5360-269-4

DOI 10.37885/978-65-5360-269-4

1. Biotechnology. I. Silva, Silvia Katrine Rabelo da (Organizadora). II. Sousa, Sara Freitas de (Organizadora). III. Santana, Raphael Carlos Ferrer de (Organizador). IV. Título.

CDD 660.6

Índice para catálogo sistemático: I. Biotechnology

Elaborado por Janaina Ramos – CRB-8/9166

E-BOOK
ACESSO LIVRE ON LINE - IMPRESSÃO PROIBIDA

2023

Direção Editorial

Reinaldo Cardoso

João Batista Quintela

Assistentes Editoriais

Erick Braga Freire

Bianca Moreira

Sandra Cardoso

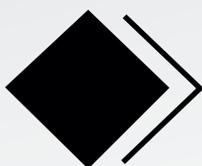
Bibliotecários

Maurício Amormino Júnior - CRB-6/2422

Janaina Ramos - CRB-8/9166

Jurídico

Dr. Alandelon Cardoso Lima - OAB/SP-307852



CONSELHO EDITORIAL

Mestres, Mestras, Doutores e Doutoradas

Prof. Dr. Carlos Alberto Martins Cordeiro
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Rogério de Melo Grillo
Universidade Estadual de Campinas

Prof^a. Ma. Eloisa Rosotti Navarro
Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dr. Ernane Rosa Martins
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás

Prof. Dr. Rossano Sartori Dal Molin
FSG Centro Universitário

Prof. Dr. Carlos Alexandre Oelke
Universidade Federal do Pampa

Prof. Esp. Domingos Bombo Damião
Universidade Agostinho Neto - Angola

Prof. Me. Reinaldo Eduardo da Silva Sales
Instituto Federal do Pará

Prof^a. Ma. Auristela Correa Castro
Universidade Federal do Pará

Prof^a. Dra. Dalizia Amaral Cruz
Universidade Federal do Pará

Prof^a. Ma. Susana Jorge Ferreira
Universidade de Evora, Portugal

Prof. Dr. Fabricio Gomes Gonçalves
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Me. Erival Gonçalves Prata
Universidade Federal do Pará

Prof. Me. Gevair Campos
Faculdade CNEC Unai

Prof. Me. Flávio Aparecido De Almeida
Faculdade Unida de Vitória

Prof. Me. Mauro Vinicius Dutra Girão
Centro Universitário Ihta

Prof. Esp. Clóvis Luciano Giacomiet
Universidade Federal do Amapá

Prof^a. Dra. Giovanna Faria de Moraes
Universidade Federal de Uberlândia

Prof. Dr. André Cutrim Carvalho
Universidade Federal do Pará

Prof. Esp. Dennis Soares Leite
Universidade de São Paulo

Prof^a. Dra. Silvani Verruck
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Me. Osvaldo Contador Junior
Faculdade de Tecnologia de Jahu

Prof^a. Dra. Claudia Maria Rinhel-Silva
Universidade Paulista

Prof^a. Dra. Silvana Lima Vieira
Universidade do Estado da Bahia

Prof^a. Dra. Cristina Berger Fadel
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof^a. Ma. Graciete Barros Silva
Universidade Estadual de Roraima

Prof. Dr. Carlos Roberto de Lima
Universidade Federal de Campina Grande

Prof. Dr. Wesley Viana Evangelista
Universidade do Estado de Mato Grosso

Prof. Dr. Cristiano Marins
Universidade Federal Fluminense

Prof. Me. Marcelo da Fonseca Ferreira da Silva
Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória

Prof. Dr. Daniel Luciano Gevehr
Faculdades Integradas de Taquara

Prof. Me. Silvio Almeida Junior
Universidade de Franca

Prof^a. Ma. Juliana Campos Pinheiro
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Raimundo Nonato Ferreira Do Nascimento
Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr. Antônio Marcos Mota Miranda
Instituto Evandro Chagas

Prof^a. Dra. Maria Cristina Zago
Centro Universitário UNIFAAT

Prof^a. Dra. Samylla Maira Costa Siqueira
Universidade Federal da Bahia

Prof^a. Ma. Gloria Maria de Franca
Centro Universitário CESMAC

Prof^a. Dra. Carla da Silva Sousa
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano

Prof. Me. Denny Ramon de Melo Fernandes Almeida
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Me. Mário Celso Neves De Andrade
Universidade de São Paulo

Prof. Me. Juliano Pizzano Ayoub
Universidade Estadual do Centro-Oeste

Prof. Dr. Ricardo Pereira Sepini
Universidade Federal de São João Del-Rei

Prof^a. Dra. Maria do Carmo de Sousa
Universidade Federal de São Carlos

Prof. Me. Flávio Campos de Moraes
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Me. Jonatas Brito de Alencar Neto
Universidade Federal do Ceará

Prof. Me. Reginaldo da Silva Sales
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará

Prof. Me. Moisés de Souza Mendonça
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará

Prof. Me. Patrício Francisco da Silva
Universidade de Taubaté

Prof^a. Esp. Bianca Anacleto Araújo de Sousa
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Pedro Afonso Cortez
Universidade Metodista de São Paulo

Prof^a. Ma. Bianca Cerqueira Martins
Universidade Federal do Acre

Prof. Dr. Vitor Afonso Hoeflich
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Francisco de Sousa Lima
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano

Prof^a. Dra. Sayonara Cotrim Sabioni
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano

Prof^a. Dra. Thais Ranielle Souza de Oliveira
Centro Universitário Euroamericano

Prof^a. Dra. Rosemary Laís Galati
Universidade Federal de Mato Grosso

Prof^a. Dra. Maria Fernanda Soares Queiroz
Universidade Federal de Mato Grosso

Prof. Dr. Dioniso de Souza Sampaio
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Leonardo Augusto Couto Finelli
Universidade Estadual de Montes Claros

Prof^a. Ma. Danielly de Sousa Nóbrega
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Acre

Prof. Me. Mauro Luiz Costa Campello
Universidade Paulista

Prof^a. Ma. Livia Fernandes dos Santos
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Acre

Prof^a. Dra. Sonia Aparecida Cabral
Secretaria da Educação do Estado de São Paulo

Prof^a. Dra. Camila de Moura Vogt
Universidade Federal do Pará

Prof. Me. José Martins Juliano Eustaquio
Universidade de Uberaba

Prof. Me. Walmir Fernandes Pereira
Miami University of Science and Technology

Prof^a. Dra. Liege Coutinho Goulart Dornellas
Universidade Presidente Antônio Carlos

Prof. Me. Ticiano Azevedo Bastos
Secretaria de Estado da Educação de MG

Prof. Dr. Jónata Ferreira De Moura
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Ma. Daniela Remião de Macedo
Faculdade de Belas Artes da Universidade de Lisboa

Prof. Dr. Francisco Carlos Alberto Fonteles Holanda
Universidade Federal do Pará

Prof^a. Dra. Bruna Almeida da Silva
Universidade do Estado do Pará

Prof^a. Ma. Adriana Leite de Andrade
Universidade Católica de Petrópolis

Prof^a. Dra. Clecia Simone Gonçalves Rosa Pacheco
Instituto Federal do Sertão Pernambucano,

Prof. Dr. Claudimir da Silva Santos
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas

Prof. Dr. Fabrício dos Santos Ritá
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas, Brasil

Prof. Me. Ronei Aparecido Barbosa
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas

Prof. Dr. Julio Onésio Ferreira Melo
Universidade Federal de São João Del Rei

Prof. Dr. Juliano José Corbi
Universidade de São Paulo

Prof^a. Dra. Alessandra de Souza Martins
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof. Dr. Francisco Sérgio Lopes Vasconcelos Filho
Universidade Federal do Cariri

Prof. Dr. Thadeu Borges Souza Santos
Universidade do Estado da Bahia

Prof^a. Dra. Francine Náthalie Ferraresi Rodrigues Queluz
Universidade São Francisco

Prof^a. Dra. Maria Luzete Costa Cavalcante
Universidade Federal do Ceará

Prof^a. Dra. Luciane Martins de Oliveira Matos
Faculdade do Ensino Superior de Linhares

Prof^a. Dra. Rosenery Pimentel Nascimento
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof^a. Esp. Livia Silveira Duarte Aquino
Universidade Federal do Cariri

Prof^a. Dra. Irlane Maia de Oliveira
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a. Dra. Xaene Maria Fernandes Mendonça
Universidade Federal do Pará

Prof^a. Ma. Thais de Oliveira Carvalho Granado Santos
Universidade Federal do Pará

Prof. Me. Fábio Ferreira de Carvalho Junior
Fundação Getúlio Vargas

Prof. Me. Anderson Nunes Lopes
Universidade Luterana do Brasil

Profª. Dra. Iara Margolis Ribeiro
Universidade do Minho

Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva
Universidade Federal do Ceará

Profª. Dra. Keila de Souza Silva
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves do Nascimento
Universidade Federal do Pará

Profª. Dra. Réia Sílvia Lemos da Costa e Silva Gomes
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Evaldo Martins da Silva
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. António Bernardo Mendes de Seça da Providência Santarém
Universidade do Minho, Portugal

Profª. Dra. Miriam Aparecida Rosa
Instituto Federal do Sul de Minas

Prof. Dr. Biano Alves de Melo Neto
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano

Profª. Dra. Priscyla Lima de Andrade
Centro Universitário UnifBV

Prof. Dr. Gabriel Jesus Alves de Melo
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia

Prof. Esp. Marcel Ricardo Nogueira de Oliveira
Universidade Estadual do Centro Oeste

Prof. Dr. Andre Muniz Afonso
Universidade Federal do Paraná

Profª. Dr. Laís Conceição Tavares
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará

Prof. Me. Rayme Tiago Rodrigues Costa
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará

Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme
Universidade Federal do Tocantins

Prof. Me. Valdemir Pereira de Sousa
Universidade Federal do Espírito Santo

Profª. Dra. Sheylla Susan Moreira da Silva de Almeida
Universidade Federal do Amapá

Prof. Dr. Arinaldo Pereira Silva
Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará

Profª. Dra. Ana Maria Aguiar Frias
Universidade de Evora, Portugal

Profª. Dra. Deise Keller Cavalcante
Secretaria de Estado de Educação do Rio de Janeiro

Profª. Esp. Larissa Carvalho de Sousa
Instituto Politécnico de Coimbra, Portugal

Esp. Daniel dos Reis Pedrosa
Instituto Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Waslan Figueiredo Martins
Instituto Federal Goiano

Prof. Dr. Lênio José Guerreiro de Faria
Universidade Federal do Pará

Profª. Dra. Tamara Rocha dos Santos
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Marcos Vinicius Winckler Caldeira
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Gustavo Soares de Souza
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo

Profª. Dra. Adriana Cristina Bordignon
Universidade Federal do Maranhão

Profª. Dra. Norma Suely Evangelista-Barreto
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Prof. Me. Larry Oscar Chaiñi Paucar
Universidad Nacional Autónoma Altoandina de Tarma, Peru

Prof. Dr. Pedro Andrés Chira Oliva
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Daniel Augusto da Silva
Fundação Educacional do Município de Assis

Profª. Dra. Aleteia Hummes Thaines
Faculdades Integradas de Taquara

Profª. Dra. Elisangela Lima Andrade
Universidade Federal do Pará

Prof. Me. Reinaldo Pacheco Santos
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Profª. Ma. Cláudia Catarina Agostinho
Hospital Lusíadas Lisboa, Portugal

Profª. Dra. Carla Cristina Bauermann Brasil
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Humberto Costa
Universidade Federal do Paraná

Profª. Ma. Ana Paula Felipe Ferreira da Silva
Universidade Potiguar

Prof. Dr. Ernane José Xavier Costa
Universidade de São Paulo

Profª. Ma. Fabricia Zanelato Bertolde
Universidade Estadual de Santa Cruz

Prof. Me. Eliomar Viana Amorim
Universidade Estadual de Santa Cruz

Profª. Esp. Nássarah Jabur Lot Rodrigues
Universidade Estadual Paulista

Prof. Dr. José Aderval Aragão
Universidade Federal de Sergipe

Profª. Ma. Caroline Muñoz Cevada Jeronimo
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba

Profª. Dra. Aline Silva De Aguiar
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Renato Moreira Nunes
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Me. Júlio Nonato Silva Nascimento
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará

Profª. Dra. Cybelle Pereira de Oliveira
Universidade Federal da Paraíba

Profª. Ma. Cristianne Kalinne Santos Medeiros
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Profª. Dra. Fernanda Rezende
Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Estudo em Educação Ambiental

Profª. Dra. Clara Mockdece Neves
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª. Ma. Danielle Galdino de Souza
Universidade de Brasília

Prof. Me. Thyago José Arruda Pacheco
Universidade de Brasília

Profª. Dra. Flora Magdaline Benitez Romero
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Profª. Dra. Carline Santos Borges
Governo do Estado do Espírito Santo, Secretaria de Estado de Direitos Humanos.

Profª. Dra. Rosana Barbosa Castro
Universidade Federal de Amazonas

Prof. Dr. Wilson José Oliveira de Souza
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Prof. Dr. Eduardo Nardini Gomes
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Prof. Dr. José de Souza Rodrigues
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Prof. Dr. Willian Carboni Viana
Universidade do Porto

Prof. Dr. Diogo da Silva Cardoso
Prefeitura Municipal de Santos

Prof. Me. Guilherme Fernando Ribeiro
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Profª. Dra. Jaisa Klaus
Associação Vitoriana de Ensino Superior

Prof. Dr. Jeferson Falcão do Amaral
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira

Profª. Ma. Ana Carla Mendes Coelho
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Prof. Dr. Octávio Barbosa Neto
Universidade Federal do Ceará

Profª. Dra. Carolina de Moraes Da Trindade
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará

Prof. Me. Ronison Oliveira da Silva
Instituto Federal de Amazonas

Prof. Dr. Alex Guimarães Sanches
Universidade Estadual Paulista

Profa. Esp. Vanderlene Pinto Brandão
Faculdade de Ciências da Saúde de Unai

Profa. Ma. Maria Das Neves Martins
Faculdade de Ciências da Saúde de Unai

Prof. Dr. Joachin Melo Azevedo Neto
Universidade de Pernambuco

Prof. Dr. André Luis Assunção de Farias
Universidade Federal do Pará

Profª. Dra. Danielle Mariam Araujo Santos
Universidade do Estado do Amazonas

Profª. Dra. Raquel Marchesan
Universidade Federal do Tocantins

Profª. Dra. Thays Zigante Furlan Ribeiro
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Norbert Fenzl
Universidade Federal do Pará

Prof. Me. Arleson Eduardo Monte Palma Lopes
Universidade Federal do Pará

Profa. Ma. Iná Camila Ramos Favacho de Miranda
Universidade Federal do Pará

Profª. Ma. Ana Lise Costa de Oliveira Santos
Secretaria de Educação do Estado da Bahia

Prof. Me. Diego Vieira Ramos
Centro Universitário Inga

Prof. Dr. Janaildo Soares de Sousa
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Mário Henrique Gomes
Centro de Estudos das Migrações e das Relações Interculturais, Portugal

Profª. Dra. Maria da Luz Ferreira Barros
Universidade de Evora, Portugal

Prof^a. Ma. Eliadina Wagner Oliveira da Silva
Caixa de Assistência dos Advogados da OAB-ES

Prof^a. Ma. Maria José Coelho dos Santos
Prefeitura Municipal de Serra

Prof^a. Tais Muller
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Me. Eduardo Cesar Amancio
Centro Universitário de Tecnologia de Curitiba

Prof^a. Dra. Janine Nicolosi Corrêa
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof^a. Dra. Tatiana Maria Cecy Gadda
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof^a. Gabriela da Costa Bonetti
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Me. Thales do Rosário De Oliveira
Universidade de Brasília

Prof^a. Dra. Maisa Sales Gama Tobias
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Pedro Igor Dias Lameira
Universidade Federal do Pará

Prof^a. Dra. Geuciane Felipe Guerim Fernandes
Universidade Estadual do Norte do Paraná

Prof. Me. Teonis Batista da Silva
Universidade do Estado da Bahia

Prof^a. Ma. Aline Maria Gonzaga Ruas
Universidade Estadual de Montes Claros

Prof^a. Dra. Alessandra Knoll
Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial

Prof^a. Ma. Carla Cristina Sordi
Universidade Estadual do Ceará

Prof^a. Dra. Caroline Lourenço de Almeida
Fundação Educacional do Município de Assis

Prof^a. Dra. Rosângela Gonçalves da Silva
Fundação Educacional do Município de Assis

Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Prof. Dr. Cleberton Correia Santos
Universidade Federal da Grande Dourados

Prof. Dr. Leonardo de Carvalho Vidal
Instituto Federal do Rio de Janeiro

Prof^a. Dra. Mônica Aparecida Bortolotti
Universidade Estadual do Centro Oeste do Paraná

Prof^a. Dra. Lucieny Almohalha
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Esp. Layane Caroline Silva Lima Braun
Universidade Federal do Pará

Prof^a. Ma. Michelle Cristina Boaventura França
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Fernando da Silva Cardoso
Universidade de Pernambuco

Prof. Me. Hugo José Coelho Corrêa de Azevedo
Fundação Oswaldo Cruz

Prof^a. Ma. Leticia Keroly Bezerra Alexandrino
Universidade de Fortaleza

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Lapa Junior
Universidade de Brasília

Prof^a. Ma. Martha Luiza Costa Vieira
Universidade Federal do Pará

Prof^a. Dra. Vânia Maria Arantes
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Me. Paulo Roberto Serpa
Universidade do Vale do Itajaí

Prof. Dr. Hercules de Oliveira Carmo
Faculdade de Educação de Guaratinguetá

Prof^a. Dra. Caroline Nóbrega de Almeida
Universidade Presbiteriana Mackenzie

Prof^a. Ma. Camila Tâmires Alves Oliveira
Universidade Federal Rural do Semiárido

Prof. Me. Francisco Lidiano Guimarães Oliveira
Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. Mauro José de Deus Moraes
Universidade Federal do Acre

Prof^a. Ma. Terezinha Maria Bogéa Gusmão
Instituto Histórico e Geográfico de Arari

Prof. Dr. Felipe Vitório Ribeiro
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Esta obra constituiu-se a partir de um processo colaborativo entre professores, estudantes e pesquisadores da área da microbiologia que reuniram alguns dos seus resultados recentes de pesquisas com foco na obtenção de produtos microbianos de interesse biotecnológico. Resulta também, de um movimento interdisciplinar trazendo como aliada a fotografia científica, onde a imagem da capa foi produzida a partir de um ensaio fotográfico para registro artístico da beleza e sutileza do trabalho executado na rotina de um laboratório de microbiologia, apresentando uma das Actinobactérias objeto de estudo nesta obra, trazendo portanto, a identidade deste livro.

Esta iniciativa se construiu a partir de um movimento interdisciplinar e interinstitucional reunindo ações de incentivo à pesquisa que uniu pesquisadores de diferentes especialidades dentro da grande área da Microbiologia de instituições de ensino superior públicas e privadas, nacionais e internacionais.

As informações aqui apresentadas tem a finalidade de estimular a leitura sobre a vivência da biotecnologia microbiana em nossa rotina e, portanto, fomentar a formação científica por meio da produção, socialização e estímulo de acesso ao conhecimento especializado.

Agradecemos aos autores pela disponibilidade, empenho e dedicação para o desenvolvimento dessa obra, especialmente por aceitarem este desafio em um momento delicado que vivemos em reclusão devido à Pandemia de COVID-19. Esperamos também que esta obra sirva de instrumento didático-pedagógico para estudantes, professores dos diversos níveis de ensino em seus trabalhos e demais interessados pela temática.

Silvia Katrine Rabelo da Silva

SUMÁRIO

CAPÍTULO 01

Plataformas Microbianas para Produção de Biofármacos

Renata Ligia de Araújo Furlan; Gabriel Padilla

 [10.37885/230111831](https://doi.org/10.37885/230111831) 11

CAPÍTULO 02

Biologia sintética em bactérias: controlando a expressão gênica através da luz

Alice Kei Endo; Dora Takiya Bonadio; Eric Andre Velasco Yepez; Erick Tavares Marcelino Alves; Giulia Maria Ramella; Jung Hun Park

 [10.37885/230111832](https://doi.org/10.37885/230111832) 25

CAPÍTULO 03

Potencial biotecnológico dos fungos

Hortência Farias de Andrade; Joana Suassuna da Nóbrega Veras; Anna Paula de Oliveira Souza; Palloma Lima de Oliveira; Maria Betânia Melo de Oliveira

 [10.37885/230111833](https://doi.org/10.37885/230111833) 43

CAPÍTULO 04

Anfíbios como fonte não convencional de moléculas com potencial antimicrobiano

Johana Becerra; Faride Lamadrid-Feris; Raul Vitor Ferreira de Oliveira; Jorge Arboleda-Valencia; Felipe Vásquez-Ponce; Gabriel Padilla; Nilton Lincopan

 [10.37885/230111834](https://doi.org/10.37885/230111834) 63

CAPÍTULO 05

Estabilidade e composição bromatológica da silagem de milho produzida com actinobactéria

Andréa Krystina Vinente Guimarães; Eloinny Karina Figueira Castro; Silvia Katrine Rabelo da Silva; Sara Freitas de Sousa Ramos; José Jeosafá de Sousa Júnior

 [10.37885/230111835](https://doi.org/10.37885/230111835) 78

CAPÍTULO 06

Substâncias fitoestimulantes produzidas por cepas de *Streptomyces* spp. isolados da rizosfera de *Aniba parviflora* Syn *A. fragans* (macacaporanga)

Fernanda Alves Ferreira; Élcio Meira da Fonseca Júnior; José Jeosafá de Sousa Júnior; Sara Freitas de Sousa Ramos; Raphael Carlos Ferrer de Santana; Silvia Katrine Rabelo da Silva

 [10.37885/230111836](https://doi.org/10.37885/230111836) 91

CAPÍTULO 07**Prospecção de biossurfactantes a partir de *Streptomyces* sp. isolados da rizosfera de *Aniba parviflora Fragans* (macacaporanga)**

Amanda de Lima Silva; José Jeosafá de Sousa Júnior; Sara Freitas de Sousa Ramos; Silvia Katrine Rabelo da Silva; Raphael Carlos Ferrer de Santana

doi 10.37885/230111837 103

CAPÍTULO 08**Prospecção de linhagens fúngicas produtoras de enzimas hidrolíticas a partir de substratos agroindustriais usados em nutrição animal**

Isac Gabriel Cunha dos Santos; Bruna Alexandrino; Eveleise Samira Martins Canto; Maurilio Antonio Varavallo; Taidés Tavares dos Santos

doi 10.37885/230111838 116

CAPÍTULO 09**Composição da comunidade de fungos filamentosos de ambiente aéreo urbano de Santarém, Pará**

Rídel Rodrigo Silva Fernandes; Ana Clara Ribeiro Morais; Andresa Krislany Ferreira; Eveleise Samira Martins Canto; Graciene do Socorro Taveira Fernandes

doi 10.37885/230111839 131

CAPÍTULO 10**Avaliação da produção de atividade enzimática por fungos filamentosos coletados de solo amazônico**

Eveleise Samira Martins Canto; Darlene Vitória Silva da Costa; Ludyanne da Silva Sousa; Patrícia Guimaraes Antunes; Vanessa dos Santos Bentes; Yanka Silva de Sousa; Taidés Tavares dos Santos

doi 10.37885/230111840 142

SOBRE OS ORGANIZADORES 157

ÍNDICE REMISSIVO 158

Plataformas Microbianas para Produção de Biofármacos

| **Renata Ligia de Araújo Furlan**

Universidade de São Paulo - USP

| **Gabriel Padilla**

Universidade de São Paulo - USP

RESUMO

Os compostos bioativos despertam interesse das indústrias farmacêuticas, alimentícias, agrícolas e outras. Produzidos em grande parte por microrganismos e plantas apresentam aplicações terapêuticas como agentes antimicrobianos, imunossuppressores, anticancerígenos e anti-inflamatórios. Conhecidos como Produtos Naturais (PNs) são classificados como pequenas moléculas, representadas pelos metabólitos microbianos, moléculas sinalizadoras, fatores de crescimento entre outros. Geralmente, os PNs já estudados são derivados da síntese de metabólitos secundários dos microrganismos e plantas (DEMAIN, 2000; DHAKAL; DHAKAL; SOHNG, 2017). Além dos PNs, diversos produtos farmacêuticos biológicos, denominados biofármacos são produzidos utilizando a tecnologia do DNA recombinante em plataformas de células de animais, vegetais e microrganismos (TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019). Desde a sua introdução nos tratamentos clínicos em 1982, os medicamentos biofarmacêuticos revolucionaram o tratamento de doenças como câncer, distúrbios metabólicos e infecções. Como exemplos de biofármacos apresentam-se a produção de anticorpos monoclonais, interferons, citocinas, vacinas, moduladores de enzimas (LACANÁ; AMUR; MUMMANNENI; ZHAO *et al.*, 2007; MICHAEL, 2015). O mercado biofarmacêutico se desenvolveu muito mais rápido do que o mercado de PNs e medicamentos sintéticos, devido ao envelhecimento da população. **Objetivo:** referenciar as principais plataformas microbianas de produção de biofármacos. **Método:** o trabalho envolve uma pesquisa descritiva por coleta de dados bibliográficos. **Resultados:** apresentação de sistemas procarióticos, principalmente *Escherichia coli*, sistemas eucarióticos de leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* e atividade biológica provenientes dessas plataformas. **Conclusão:** as plataformas microbianas devem se tornar primordiais no processo de produção de biofármacos, devido ao interesse das indústrias farmacêuticas e aplicação em terapêuticas.

Palavras-chave: Biofármacos, Plataformas Microbianas, Proteínas Recombinantadas.

■ INTRODUÇÃO

Tecnologia de DNA recombinante propulsora da produção de biofármacos

Não são apenas os PNs que vislumbram o setor industrial farmacêutico, com o advento da tecnologia do DNA recombinante está havendo uma explosão de produtos biológicos, conhecidos como biofármacos. O termo biofármaco cunhado na década de 1980 refere-se a produtos farmacêuticos produzidos por processos biotecnológicos usando a tecnologia de DNA recombinante, que modifica geneticamente uma célula para a produção de uma proteína de interesse (RADER, 2008).

O exemplo clássico é a produção de insulina recombinante para pacientes diabéticos, aprovada em 1982 pelo FDA (Food and Administration), produzida a partir de cultura de uma bactéria geneticamente modificada (JOHNSON, 1983). Os biofármacos apresentam vantagens quando comparados aos medicamentos convencionais, pois tem como alvo apenas moléculas específicas, o que raramente causam efeitos colaterais (CRAIK; FAIRLIE; LIRAS; PRICE, 2013) além de, apresentarem excelente atividade biológica (MITRAGOTRI; BURKE; LANGER, 2014). Com essas vantagens são cada vez mais requeridos, principalmente para o tratamento de pacientes que não respondem bem à medicação com drogas sintéticas.

A área de produtos biofarmacêuticos é um mercado crescente na indústria de biotecnologia direcionada, principalmente, à medicina humana. A maioria dos biofármacos aprovado para comercialização são obtidos a partir proteínas: anticorpos monoclonais, fatores de crescimento, proteínas purificadas, proteínas, hormônios, vacinas, enzimas recombinantes, terapias celulares e genéticas, imunomoduladores sintéticos entre outros. Segundo o relatório apresentado pela empresa Mordor Intelligence, o mercado biofarmacêutico foi avaliado em cerca de US \$325,17 bilhões em 2020 e espera-se que o crescimento da receita para 2026 chegue a US \$496,71 bilhões. De acordo com a empresa no início deste ano, o mercado de biofármacos está sendo impulsionado pela crescente população geriátrica, aumento de doenças crônicas, pela pandemia da COVID-19, além da demanda de contornar os efeitos colaterais associados a algumas terapias realizadas com pequenas moléculas (sintéticos) e tratamentos cirúrgicos invasivos. A aplicação terapêutica desses produtos está principalmente nas áreas de oncologia, doenças infecciosas e inflamatórias, distúrbios autoimunes, distúrbios metabólicos, distúrbios hormonais, doenças cardiovasculares, doenças neurológicas. Nesse mesmo estudo a consultoria apresenta como principal mercado biofarmacêutico os Estados Unidos, onde os investimentos em atividades de pesquisa e desenvolvimento são fortemente considerados, tornando-os a capital global de startups nessa área. Atualmente, grande parte das empresas de biofármacos dos Estados Unidos está direcionada no desenvolvimento de terapias para COVID-19 (MORDOR INTELLIGENCE, 2022). De acordo

com a Pharmaceutical Research and Manufacturers of America, em janeiro de 2021 cerca de 1.750 ensaios clínicos estavam em andamento para o desenvolvimento de vacinas e medicamentos (PHRMA, 2021).

A produção de biofármacos é bastante complexa, onerosa e requer diretrizes bem claras sobre o processo de produção, eficácia e segurança. A reprodução de biofármacos é bem complexa, podendo apresentar variações na formulação quando realizado em laboratórios diferentes (KESIK-BRODACKA, 2018). Com o término da proteção de patentes sobre os biofármacos abriu-se a possibilidade de produção de biossimilares. O termo biossimilar foi definido pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) e, se refere a produtos biológicos que contenham uma versão do insumo farmacêutico ativo encontrado nos medicamentos biológicos de referência previamente registrados (KESIK-BRODACKA, 2018) e (EMA, 2014). Esses por sua vez podem apresentar diferenciação no padrão de glicosilação ou no potencial do ingrediente ativo e, com isso pode haver influência nas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos biossimilares em relação ao biofármaco. Para evitar que isso aconteça, melhoramentos no processo de produção estão sendo realizados. O mercado brasileiro de biofarmacêuticos é dominado por produtos biológicos importados, sendo os anticorpos monoclonais os mais vendidos. A não produção de tecnologia e de produtos, no Brasil, é preocupante, visto que torna importações de biológicos um gasto muito relevante para a saúde pública (SALERNO; MATSUMOTO; FERRAZ, 2018). Tentando sanar esse problema houve a formação de um consórcio entre laboratórios da rede pública nacional e laboratórios de empresas privadas, se uniram para somar conhecimentos, capacitação profissional e transferência de tecnologia, com o objetivo de fornecer a custo reduzido esses medicamentos estratégicos para o Sistema Único de Saúde (SUS) (SALERNO; MATSUMOTO; FERRAZ, 2018). Segundo Deloitte 2018 citado em LiNAbiotec, o Brasil ocupa o 9º lugar ranking de países, com 37 biossimilares em desenvolvimento.

A regulamentação de para produtos biológicos no país foi definida pela Anvisa em 2010, por meio da resolução:

RDC Nº 55, DE 16 DE DEZEMBRO DE 2010,
Art. 1º Com o objetivo de estabelecer os requisitos mínimos para o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos no país, visando garantir a qualidade, segurança e eficácia destes medicamentos.

Essa resolução é aplicada aos produtos: I - vacinas; II - soros hiperimunes; III - hemoderivados; IV - biomedicamentos classificados em: a) medicamentos obtidos a partir de fluidos biológicos ou de tecidos de origem animal; e b) medicamentos obtidos por procedimentos biotecnológicos. V - anticorpos monoclonais; VI - medicamentos contendo microorganismos

vivos, atenuados ou mortos; deixando de fora os antibióticos e estrógenos conjugados semi-sintéticos, probióticos e alérgenos, que apresentam regulamentação própria.

Este trabalho de revisão atualizada da literatura apresenta as plataformas microbianas para a produção de produtos farmacêuticos.

■ MATERIAL E MÉTODO

O material apresentado trata-se de uma pesquisa descritiva por coleta de dados bibliográficos pautados em artigos científicos e textos gerais. Bases eletrônicas como, NCBI, Scielo, Google Scholar, ANVISA, FDA e OMS, foram consultadas para essa revisão bibliográfica.

■ RESULTADOS E DISCUSSÃO

O que são proteínas recombinantes e como são produzidas?

A informação para síntese de proteínas é armazenada no DNA, que serve como molde para processos transcricionais altamente regulados, que produzirão o RNA mensageiro (mRNA). A mensagem codificada pelo mRNA é então traduzida em sequências definidas de aminoácidos, sendo as unidades constituintes da proteína.

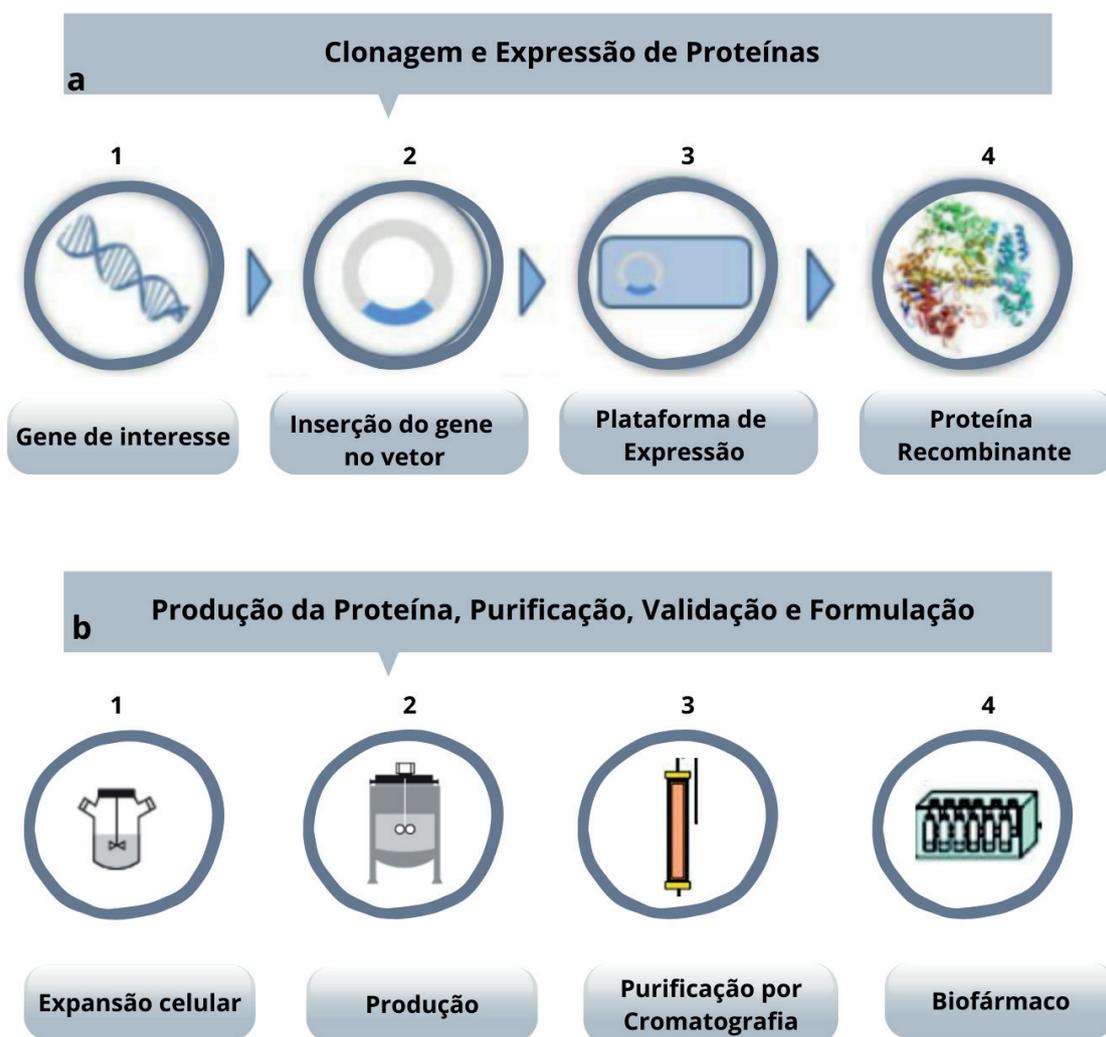
As proteínas recombinantes são proteínas codificadas por DNA recombinante, que por meio da ligação do gene codificador da proteína de interesse a um vetor (DNA plasmidial) pode expressar excesso de proteína exógena em uma célula hospedeira, podendo ser células procarióticas ou eucarióticas. A proteína recombinante é uma forma manipulada da proteína original, necessária para o aumento de escala da produção da proteína de interesse. Sua produção inicia-se com o isolamento e clonagem em um vetor plasmidial de expressão da sequência de codificação da proteína de interesse. A maioria das proteínas recombinantes para uso terapêutico são de humanos, mas são expressas em microrganismos como bactérias, leveduras ou em culturas de células animais. Os genes humanos são muito complexos e apresentam sequências de DNA não codificadoras de proteínas conhecidas como íntrons. Para a retirar os íntrons do gene deve haver um processo de conversão do mRNA em cDNA. Com a ausência de regiões reguladoras pelo cDNA, essas deverão ser fornecidas pelo vetor de expressão (Figura 1a).

Muitas proteínas recombinantes requerem modificações pós- traducionais (MPTs), como glicosilação, fosforilação, metilação, carboxilação, além da formação de ligações de dissulfetos. As MPTs introduzem modificações químicas específicas na cadeia primária de aminoácidos por meio da adição de estruturas ramificadas complexas. Elas estão relacionadas com o crosstalk metabólico, dobramento e estabilidade da proteína e na sinalização

de erros. As principais MTPs são a glicosilação e ligação dissulfeto, que estão diretamente envolvidas na regulação, função e estabilidade da proteína (MACEK; FORCHHAMMER; HARDOUIN; WEBER-BAN *et al.*, 2019).

A síntese de proteínas recombinantes em microrganismos se destaca devido algumas vantagens, tais como: mais rapidez no processo de produção, mais econômico, manipulações genéticas fáceis, processos a jusante (Figura 1b) mais fáceis quando comparados com sistemas de mamíferos. Aqui são apresentadas as principais plataformas de microrganismos utilizadas para expressão de proteínas recombinantes de produtos com aplicação terapêutica.

Figura 1. Esquema reduzido de processos envolvidos na produção de biofármacos. 1a) Plataforma de expressão - 1. Seleção do gene de interesse; 2. Clonagem do inserto no vetor de expressão; 3. Transformação do plasmídeo recombinante e expressão na plataforma adequada; 4. Seleção dos clones recombinantes por meio de marcadores. 1b) Produção da proteína recombinante- 1. Expansão do clone recombinante; 2. Produção em biorreator de larga escala e recuperação da massa por filtração e centrifugação, 3. Purificação por cromatografia do ingrediente ativo, 4. Caracterização, estabilidade, formulação e envase. Figura (1a)- adaptada de BIOLOGICSCORP.



Plataformas para produção de biofármacos

Os biofármacos incluem proteínas recombinantes e ácidos nucleicos como seus ingredientes ativos, sendo as proteínas recombinantes as principais. Essas proteínas podem ser produzidas em diferentes plataformas de expressão industrial, incluindo: sistemas procarióticos, principalmente *Escherichia coli*, sistemas eucarióticos à base de leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* e fungos filamentosos, também em linhagens celulares de mamíferos, células de insetos ou plantas (DEMAIN; VAISHNAV, 2009). Outra plataforma que está sendo aprimorada como alternativa para expressões é a CFPS (do inglês: Cell Free Protein Synthesis, também conhecida como sistemas de expressão “in vitro” (ZEMELLA; THORING; HOFFMEISTER; KUBICK, 2015). Apesar de inúmeras plataformas estarem disponíveis para a produção de proteínas recombinantes, cada uma apresenta sua peculiaridade, com vantagens e desvantagens (RETTENBACHER; ARAUZO-AGUILERA; BUSCAJONI; CASTILLO-CORUJO *et al.*, 2021). A escolha da melhor plataforma no momento da utilização tem que ser com base em propriedades específicas da proteína de interesse com protocolo e estratégias de produção bem definidos (KESIK-BRODACKA, 2018). As plataformas microbianas são almejadas para a produção de biofármacos por serem mais fáceis de trabalhar, robustas e economicamente mais viáveis quando comparadas, por exemplo, com a de mamíferos. Representam bioprodutos farmacêuticos oriundos de plataformas microbianas as vacinas, hormônios, interferons e fatores de crescimento, além de enzimas industriais que não possuem aplicação terapêutica, com aplicação na indústria de alimentos, ração, têxteis e outras.

Entre as plataformas microbianas, as que compõem o sistema bacteriano são as mais utilizadas para a expressão de proteínas recombinantes. Segundo dados da BioProcess Technology Consultants, em 2010, a produção total de proteínas puras como ingredientes ativos biofarmacêuticos foi de 26,4 toneladas, sendo 68% produzidos em sistemas bacterianos e 32% em sistemas mamíferos (KESIK-BRODACKA, 2018). Mais de 400 biofármacos (peptídeos e proteínas) já são comercializados e, um número superior a 1000 estão em desenvolvimento (SANCHEZ-GARCIA; MARTÍN; MANGUES; FERRER-MIRALLES *et al.*, 2016). As áreas terapêuticas com mais biofármacos disponíveis para tratamento são: distúrbios metabólicos com 24% de aprovação para tratamento de diabetes tipo 1, tipo 2, obesidade ou hipoglicemia, doenças hematológicas com 18% para tratamento de anemia renal, hemofilia A, distúrbios hemorrágicos ou de coagulação e oncologia que apresenta aprovação de 15% de biofármacos para o tratamento melanoma, câncer de mama ou colorretal (SANCHEZ-GARCIA; MARTÍN; MANGUES; FERRER-MIRALLES *et al.*, 2016).

Como descrito anteriormente, a escolha da plataforma de expressão para produção de biofármacos deve estar pautada nas propriedades específicas da proteína

recombinante. As vantagens e desvantagens das principais plataformas microbianas usadas pelas indústrias biofarmacêuticas estão resumidas na tabela 1.

Tabela 1. Comparação entre as principais plataformas de expressão microbianas identificando as vantagens e desvantagens de cada uma, para produção de proteínas recombinantes (PHAM; YILMA; FELIZ; MAJID *et al.*, 2019).

Plataformas de Expressão	Vantagens	Desvantagens	Proteínas recombinantes
<i>Escherichia coli</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Altos rendimentos - Expressão rápida - Crescimento rápido e econômico - Ampliação da escala - Fácil manipulação genética 	<ul style="list-style-type: none"> - Ausência de modificações pós-traducionais de mamíferos - Não produz corretamente ligações dissulfetos - Presença de endotoxinas - Problemas na solubilidade de proteínas 	insulina, hormônio de crescimento humano, α , β , γ -interferons e G-CSF
<i>Bacillus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Secreção livre de toxinas - Altos rendimentos - Fácil manipulação - Recuperação eficiente e econômica - Excelentes propriedades fermentativas 	<ul style="list-style-type: none"> - Produção de muitas proteases extracelular que podem destruir as proteínas recombinantes - Instabilidade plasmidial 	interleucina-3EGF e esterase de <i>Pseudomonas</i> .
Leveduras 	<ul style="list-style-type: none"> - Produção estável - Alta produtividade - Presença de modificações pós-traducionais de mamíferos - Pode lidar com proteínas ricas em S-S - Auxilia no dobramento de proteínas 	<ul style="list-style-type: none"> - Podem produzir hipermanolisação resultando em atividade alterada e uma resposta imunogênica 	insulina, antígeno de superfície da hepatite B, urato oxidase, glucagon, fator estimulador de colônia de macrófagos de granulócitos (GM-CSF), hirudina e fator de crescimento derivado de plaquetas.

Fotos: Google Imagem

Plataformas Procarióticas

As plataformas de procariontes para expressão de proteínas recombinantes são menos dispendiosas, mais facilmente manipuladas, com crescimento e produção mais rápidas, além da ampla compreensão de suas características fisiológicas e genéticas. O exemplo clássico é representado por *Escherichia coli*, relatada como hospedeiro de produção de primeira escolha (BANEYX, 1999). Abordagens que combinam conhecimento de biologia de sistemas, biologia sintética e engenharia evolutiva influenciaram no desenvolvimento de um sistema robusto de *E. coli* como um hospedeiro para expressão heteróloga de biofármacos (CHOI; KATSUYAMA; BAI; DENG *et al.*, 2018). Além desse sistema, a produção de biofármacos conta com o de *Pseudomonas putida* mostrando-se um hospedeiro importante devido à sua flexível regulação metabólica intrínseca, capacidades enzimáticas divergentes e tolerância a xenobióticos (IPEK SÜNTAR AND SÜMEYRA ÇETINKAYA AND ÜLKÜ SELCEN HAYDAROĞLU AND SOLOMON, 2021). Os ramnolipídios, terpenóides, PKs, NRPs e outras substâncias bioativas derivadas de aminoácidos são produzidos em sistemas de *P. putida* (RACHEL, 2012). Outro sistema bem conhecido para expressão de proteínas recombinantes é o de bacilos Gram-positivos, que se adapta a diferentes condições ambientais e capacidade de alto rendimento de produção de proteína. A produção é completamente livre de toxinas e são representados por *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *Bacillus brevis*. O *B. subtilis* apresenta como vantagem sobre *E. coli* ser um hospedeiro livre de endotoxinas para a expressão de proteínas recombinantes, sendo escolhidos para a produção de heparina (PHAM; YILMA; FELIZ; MAJID *et al.*, 2019). De um modo geral, as espécies de *Bacillus*

produzem alto rendimento na produção de enzimas, até 2006 eram responsáveis por 60% da produção comercializada (FU; XU; LI *et al.*, 2007). Além da produção de enzimas, também é utilizado como sistema de expressão para produção de citocinas como interleucina-3EGF e esterase de *Pseudomonas*.

Corynebacterium glutamicum é um sistema alternativo de destaque, sendo classificado como altamente promissor. *C. glutamicum* sofreu modificações para ampliar a produção de proteínas recombinantes; com sistema Corynex produz e secreta grandes quantidades de fator de crescimento epidérmico humano e Fabs (LIU; YANG; ZHANG; SUN *et al.*, 2016). Apesar dos sistemas bacterianos serem muito requeridos e cada vez mais robustos, ainda existem gargalos a serem resolvidos, eles são funcionais para proteínas que não requerem glicosilação.

Plataformas Eucarióticas

As plataformas de eucariotos são geralmente utilizadas para expressar proteínas maiores que 100 kD, também requeridas para produção de proteínas que necessitam de MPTs. A clássica *Saccharomyces cerevisiae* (levedura usada para fazer o pão) e *Pichia pastoris* estão entre as leveduras eucarióticas mais estudadas e, mais comumente, usadas como hospedeiros heterólogos para síntese de biofármacos (DEMAIN; VAISHNAV, 2009; KARBALAEI; REZAEI; FARSIANI, 2020). Ambas passaram por processos de melhoramento genético e são capazes de produzir altos rendimentos de proteínas a baixo custo, proteínas maiores que 50 kD, podem realizar processo de remoção de sequências de sinal, desencadear a glicosilação na modificação pós transducional, além de serem capazes de produzirem chaperoninas que auxiliam durante o processo de dobramento de certas proteínas e podem lidar com proteínas ricas em S-S (QI; LI; YU; ENGQVIST *et al.*, 2020).

O uso do sistema de expressão de *S. cerevisiae* apresenta vantagens com relação ao rápido crescimento e capacidade de exportar o produto extracelularmente, porém com relação às MPTs, pode ocorrer a produção de hipermanosilação, sendo indesejada, pois pode resultar em uma resposta imunogênica alterada quando indicada em aplicações terapêuticas (GUPTA; SHUKLA, 2017). Por meio de uma combinação de ferramentas de genômicas e transcriptômicas foram selecionadas cepas de *P. pastoris* com melhores eficiências de transformação e melhores produtoras, tornando-a uma plataforma de expressão muito utilizada, podendo superar a plataforma de mamíferos (BRADY; WHITTAKER; TAN; KRISTENSEN II *et al.*, 2020). Apresenta crescimento rápido atingindo altas densidades, tem disponível promotores fortes e bem regulados, pode produzir quantidades significativas da proteína recombinante intracelular e extracelular. Algumas desvantagens também podem interferir no sistema de *P. pastoris*, entre eles pode ser necessário a otimização do processo

para o alcance da produção máxima das proteínas recombinantes, essa otimização pode variar segundo a proteína alvo.

Entre as células de levedura, a *Saccharomyces cerevisiae* é usada na fabricação de vacinas contra hepatite B e papilomavírus humano, ambas produzindo uma resposta imune protetora contra vírus do tipo selvagem (BILL, 2015). Em sistemas de *P. pastoris* novas vacinas de subunidades recombinantes foram expressas, tais como: botulismo, malária, sars, tuberculose, dengue e outras.

Os avanços desenvolvidos nas plataformas de produção para biofármacos estão diretamente relacionados com o advento das ferramentas “omics” (BECKER; WITTMANN, 2018). Que envolve a compreensão global de um sistema biológico, conhecendo, definindo e mensurando as moléculas que o compõem, desde os genes, passando pelo RNA mensageiro, proteínas até os metabólitos produzidos. Essas ferramentas são: genômica (os genes de um organismo), transcriptômica (os processos de transcrição de um organismo), proteômica (as proteínas em um organismo), metabolômica (os metabólitos em um organismo) e fluxomics (a taxa de reações metabólicas em um organismo).

Atividade Biológica de Biofármacos de Plataformas Microbianas

O exemplo clássico de biofármaco é a produção de insulina recombinante utilizada para tratamento de diabetes, porém muitos outros fazem parte de uma lista de biofarmacos comercializados como, por exemplo os anticorpos monoclonais Trastuzumab (Herceptin©) utilizado para o tratamento de câncer de mama e o Rituximab (Rituxan ou Mabthera©) disponível para o tratamento de linfomas e leucemias. Na tabela 2 estão apresentados alguns exemplos de biofármacos produzidos em plataformas microbianas que já são comercializados.

Tabela 2. Exemplos representativos de biofármacos comercializados

Biofármaco [®]	Tratamento	Sistemas de Expressão	Referências
Humulin	Diabetes	<i>E. coli</i>	(JOHNSON, 1983)
Protropin e Humatrope	Hormônio de crescimento	<i>E. coli</i>	(MOHAMMED; AHMED; ROOP; MOHAMMED <i>et al.</i> , 2015; SANCHEZ-GARCIA; MARTÍN; MANGUES; FERRER-MIRALLES <i>et al.</i> , 2016)
Krystexxa	Gota crônica	<i>E. coli</i>	(MOHAMMED; AHMED; ROOP; MOHAMMED <i>et al.</i> , 2015; SANCHEZ-GARCIA; MARTÍN; MANGUES; FERRER-MIRALLES <i>et al.</i> , 2016)
Intron A	Verrugas genitais, melanoma maligno, leucemia de células pilosas, linfoma folicular, sarcoma de Kaposi e hepatite crônica B ou C	<i>E. coli</i>	(MOHAMMED; AHMED; ROOP; MOHAMMED <i>et al.</i> , 2015; SANCHEZ-GARCIA; MARTÍN; MANGUES; FERRER-MIRALLES <i>et al.</i> , 2016)
Lantus	Análogo da insulina	<i>E. coli</i>	(JOZALA; GERALDES; TUNDISI; FEITOSA <i>et al.</i> , 2016; SANCHEZ-GARCIA; MARTÍN; MANGUES; FERRER-MIRALLES <i>et al.</i> , 2016);
Prevnar	Vacinas pneumocócicas	<i>S. pneumoniae</i> e <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	(JOZALA; GERALDES; TUNDISI; FEITOSA <i>et al.</i> , 2016)

Biofármaco [®]	Tratamento	Sistemas de Expressão	Referências
Scimax	Estimula hematopoiese	<i>E. coli</i>	(SANCHEZ-GARCIA; MARTÍN; MANGUES; FERRER-MIRALLES <i>et al.</i> , 2016)
Pediarix	Imunização contra difteria, tétano, coqueluche, poliomielite e infecção por subtipos conhecidos de HBV	<i>S. cerevisiae</i>	(NANDY; SRIVASTAVA, 2018)
Recombivax	Infecção de subtipos do vírus da hepatite B	<i>S. cerevisiae</i>	(SANCHEZ-GARCIA; MARTÍN; MANGUES; FERRER-MIRALLES <i>et al.</i> , 2016)

Material residual nos produtos comercializados

Como a origem dos biofármacos está sustentada em sistemas biológicos, há uma enorme preocupação quanto à presença de resíduos celulares e resíduos celulares de DNAs (rcDNA) no produto final. Recomendações da OMS estabelecem limites desses resíduos considerando as características do substrato celular, a aplicação terapêutica pretendida e a via de administração dos biofármacos, mas, principalmente, a atividade biológica do fragmento de DNA da célula hospedeira. Processos, como filtragem, devem ser implementados e validados para garantir que não haverá resíduos de células intactas no produto final. Para diminuição da quantidade e redução do tamanho de rcDNA, tratamentos com DNase ou inativação química são recomendados, garantindo um DNA não funcional. Segundo FDA para células não tumorigênicas o limite de rcDNA é < 10ng/ dose para inoculação parenteral. No Brasil a RDC Nº 55, DE 16 DE DEZEMBRO DE 2010, não apresenta uma diretriz que seja específica para limites de resíduos no produto final.

■ CONCLUSÃO

As plataformas microbianas contam com o avanço das ferramentas “omics” e técnicas de biologia de sistema para melhor compreensão da fisiologia e processos biotecnológicos, que resultaram em melhoria dos sistemas microbianos. Em *E. coli* os resultados obtidos de manipulação com as ferramentas “omics” mostram melhorias significativas no dobramento da proteína. *Bacillus* alcança títulos de produção para enzimas industriais excelentes e, nos últimos anos, há um esforço para transpor o conhecimento adquirido para elevar os títulos de produção de proteínas farmacêuticas. Quanto aos sistemas de expressão em leveduras, *S. cerevisiae* continua tendo esforços de pesquisa para melhor compreensão do hospedeiro e *P. pastoris* está em ascensão como sistema para produção de proteínas recombinantes e mostra-se como hospedeiro para a produção de proteínas que requerem MPTs complexas, chegando a desafiar as plataformas de mamíferos. Apesar de todas as melhorias já realizadas nas plataformas microbianas, essas ainda são superadas pelas plataformas de mamíferos, principalmente quando a produção é de proteínas farmacêuticas. Muitos esforços em pesquisa ainda deverão ser realizados para que as plataformas microbianas se tornem

primordiais no processo de produção de biofármacos, isso acontecerá bem mais rápido do que imaginamos pois, há o interesse crescente das indústrias farmacêuticas e a aplicação cada vez maior em terapêuticas.

■ REFERÊNCIAS

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Curr Opin Biotechnol**, 10, n. 5, p. 411-421, Oct 1999.

BECKER, J.; WITTMANN, C. From systems biology to metabolically engineered cells—an omics perspective on the development of industrial microbes. **Current Opinion in Microbiology**, 45, p. 180-188, 2018.

BILL, R. M. Recombinant protein subunit vaccine synthesis in microbes: a role for yeast? **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 67, n. 3, p. 319-328, 3/5/2022 2015.

BIOLOGICSCORP. Protein Expression Protocol & Troubleshooting in *E. coli*. Indianapolis, USA. <https://www.biologicscorp.com/download/Protein-Expression-Protocol-&-Troubleshooting-in-E.coli.pdf>. Acesso em 24, fev. 2022.

BRADY, J. R.; WHITTAKER, C. A.; TAN, M. C.; KRISTENSEN II, D. L. *et al.* Comparative genome-scale analysis of *Pichia pastoris* variants informs selection of an optimal base strain. **Biotechnology and Bioengineering**, 117, n. 2, p. 543-555, 2022/03/05 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 55, de 16 de dezembro de 2010. Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/%281%29RDC_55_2010_COMP.pdf/41ebae78-5742-4060-9bec-6ccece9ce262. Acesso em 24, jan.2022.

CHOI, S.-S.; KATSUYAMA, Y.; BAI, L.; DENG, Z. *et al.* Genome engineering for microbial natural product discovery. **Current opinion in microbiology**, 45, p. 53-60, 2018.

CRAIK, D. J.; FAIRLIE, D. P.; LIRAS, S.; PRICE, D. The Future of Peptide-based Drugs. **Chemical Biology & Drug Design**, 81, n. 1, p. 136-147, 2013.

DELOITTE. **2018 Global life sciences outlook**. Budapeste, 2018. Disponível em: <https://www2.deloitte.com/content/dam/Deloitte/global/Documents/Life-Sciences-Health-Care/gx-lshc-ls-outlook-2018.pdf>. Acessado em 24, jan. 2022.

DEMAIN, A. L. Microbial biotechnology. **Trends in Biotechnology**, 18, n. 1, p. 26-31, 2022/03/03 2000.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnol Adv**, 27, n. 3, p. 297-306, May-Jun 2009.

DHAKAL, D.; DHAKAL, Y.; SOHNG, J. K. Book Review: Antibody-Drug Conjugates: Fundamentals, Drug Development, and Clinical Outcomes to Target Cancer. **Frontiers in Pharmacology**, 8, 2017-October-25 2017. Book Review.

DELOITTE. **2018 Global life sciences outlook**. Budapeste, 2018 em <https://linabiotec.com.br/2022/02/15/biofarmacos-o-que-sao-mercado-e-regulamentacao>. Acesso 15, fev. 2022.

EMA. Guideline on similar biological medicinal products. Londres, Reino Unido, 23 outubro 2014. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-rev1_en.pdf Acesso em 24, fev. 2022.

FDA. Guidance for Industry Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications. Other test: Testing for the Presence of Residual Cells. Rockville, 2010. <https://www.fda.gov/media/78428/download>. Acesso em 17, fev. 2022.

FU, L. L., XU, Z. R., LI, W. F. *et al.* A. Protein secretion pathways in *Bacillus subtilis*: Implication for optimization of heterologous protein secretion. **Biotechnology Advances**, 25, n. 1, p. 1-12, 2007.

GUPTA, S. K.; SHUKLA, P. Sophisticated Cloning, Fermentation, and Purification Technologies for an Enhanced Therapeutic Protein Production: A Review. **Frontiers in Pharmacology**, 8, 2017.

IPEK SÜNTAR AND SÜMEYRA ÇETINKAYA AND ÜLKÜ SELCEN HAYDAROĞLU AND SOLOMON, H. Bioproduction process of natural products and biopharmaceuticals: Biotechnological aspects. **Biotechnology Advances**, 50, p. 107768, 2021.

JOHNSON, I. S. Human insulin from recombinant DNA technology. **Science**, 219, n. 4585, p. 632-637, Feb 11 1983.

JOZALA, A. F.; GERALDES, D. C.; TUNDISI, L. L.; FEITOSA, V. D. A. *et al.* Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. **Brazilian Journal of Microbiology**, 47, p. 51-63, 2016.

KARBALAEI, M.; REZAEI, S. A.; FARSIANI, H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. **Journal of Cellular Physiology**, 235, n. 9, p. 5867-5881, 2020.

KESIK-BRODACKA, M. Progress in biopharmaceutical development. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 65, n. 3, p. 306-322, 2018.

LACANÁ, E.; AMUR, S.; MUMMANNENI, P.; ZHAO, H. *et al.* The Emerging Role of Pharmacogenomics in Biologics. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, 82, n. 4, p. 466-471, 2007.

LIU, X.; YANG, Y.; ZHANG, W.; SUN, Y. *et al.* Expression of recombinant protein using *Corynebacterium Glutamicum*: progress, challenges and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, 36, n. 4, p. 652-664, 2016.

MACEK, B.; FORCHHAMMER, K.; HARDOUIN, J.; WEBER-BAN, E. *et al.* Protein post-translational modifications in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, 17, n. 11, p. 651-664, 2019.

MICHAEL, S. K. An overview of FDA-approved biologics medicines. **Drug Discovery Today**, 20, n. 4, p. 393-398, 2015.

MITRAGOTRI, S.; BURKE, P. A.; LANGER, R. Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies. **Nature Reviews Drug Discovery**, 13, n. 9, p. 655-672, 2014.

MOHAMMED, N. B.; AHMED, M. A.-H.; ROOP, S. B.; MOHAMED, M. M. A. *et al.* Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 25, n. 7, p. 953-962, 2015.

MORDOR INTELLIGENCE. Global Biopharmaceuticals Market (2022 – 2027). Hyderabad, India, 2022. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-biopharmaceuticals-market-industry><https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-biopharmaceuticals-market-industry>. Acesso em 24, fev. 2022.

NANDY, S. K.; SRIVASTAVA, R. K. A review on sustainable yeast biotechnological processes and applications. **Microbiological Research**, 207, p. 83-90, 2018.

PHAM, J. V.; YILMA, M. A.; FELIZ, A.; MAJID, M. T. *et al.* A Review of the Microbial Production of Bioactive Natural Products and Biologics. **Frontiers in Microbiology**, 10, 2019-June-20 2019. Review.

PHARMA. The biopharmaceutical industry is leading the way in developing new vaccines and treatments for covid-19. Washington, DC, USA, 08 de janeiro de 2021. Disponível em: https://www.phrma.org/-/media/Project/PhRMA/PhRMA-Org/PhRMA-Org/PDF/P-R/PhRMA_DevelopingNewVaccinesandTreatments_Updated.pdf. Acesso 20, fev. 2022https://www.phrma.org/-/media/Project/PhRMA/PhRMA-Org/PhRMA-Org/PDF/P-R/PhRMA_DevelopingNewVaccinesandTreatments_Updated.pdf.

QI, Q.; LI, F.; YU, R.; ENGQVIST, M. K. M. *et al.* Different Routes of Protein Folding Contribute to Improved Protein Production in *Saccharomyces cerevisiae*. **mBio**, 11, n. 6, p. e02743-02720, 2020.

RACHEL, C. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. **Biotechnology Advances**, 30, n. 5, p. 1102-1107, 2012.

RADER, R. A. (Re)defining biopharmaceutical. **Nature Biotechnology**, 26, n. 7, p. 743-751, 2008.

RETTENBACHER, L. A.; ARAUZO-AGUILERA, K.; BUSCAJONI, L.; CASTILLO-CORUJO, A. *et al.* Microbial protein cell factories fight back? **Trends in Biotechnology**, 2021.

SALERNO, M. S.; MATSUMOTO, C.; FERRAZ, I. **Biofármacos no Brasil: características, importância e delineamento de políticas públicas para seu desenvolvimento**. Texto para Discussão. 2018.

SANCHEZ-GARCIA, L.; MARTÍN, L.; MANGUES, R.; FERRER-MIRALLES, N. *et al.* Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. **Microbial Cell Factories**, 15, n. 1, p. 33, 2016.

TRIPATHI, N. K.; SHRIVASTAVA, A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 7, 2019-December-20 2019. Review.

ZEMELLA, A.; THORING, L.; HOFFMEISTER, C.; KUBICK, S. Cell-Free Protein Synthesis: Pros and Cons of Prokaryotic and Eukaryotic Systems. **ChemBioChem**, 16, n. 17, p. 2420-2431, 2015.

Biologia sintética em bactérias: controlando a expressão gênica através da luz

| **Alice Kei Endo**

Universidade de São Paulo - USP

| **Dora Takiya Bonadio**

Universidade de São Paulo - USP

| **Eric Andre Velasco Yopez**

Universidade de São Paulo - USP

| **Erick Tavares Marcelino Alves**

Universidade de São Paulo - USP

| **Giulia Maria Ramella**

Universidade de São Paulo - USP

| **Jung Hun Park**

Universidade de São Paulo - USP

RESUMO

Objetivo: Este trabalho de revisão tem como objetivo descrever brevemente a evolução da Biologia Sintética em bactérias e a criação de circuitos genéticos induzidos pela luz, conhecida como optogenética. **Método:** Foram utilizados bases de dados online como PubMed-NCBI e OptoBase, para realizar a busca e análise dos artigos científicos escolhidos usando como palavras-chave: “optogenetics”, “optogenetics and applications”, e “optogenetics and synthetic biology”. **Resultados:** Um dos marcos da história da biologia sintética é o uso da luz visível para o controle da regulação genética em bactérias, principalmente no modelo *Escherichia coli*. Proteínas fotorreceptoras ocorrem naturalmente em microrganismos e eucariotos (como fitocromos e opsinas), mas também podem ser construídas através da fusão de diferentes domínios sensíveis à luz combinados a diversos outros domínios efetores. Estes novos sistemas responsivos, representados geralmente pelo complexo Cph1–Rcp1, CcaS/R e YF1–FixJ, são induzidos por comprimentos de onda de luz entre 650-705 nm (luz vermelha/vermelho longo), 563 nm (luz verde) e 470 nm (luz azul), respectivamente. Além da descrição do funcionamento desses receptores de luz, alguns exemplos de suas aplicações são citados. **Conclusão:** O uso de sistemas optogenéticos permitiu obter um maior controle espacial e temporal da expressão gênica em bactérias, abrindo novas perspectivas para a automatização de processos biológicos e diminuição dos custos de bioprodução no setor da biotecnologia industrial.

Palavras-chave: Biologia Sintética, Optogenética, Luz, Circuitos Genéticos.

■ INTRODUÇÃO

A biologia sintética nasceu como área de pesquisa dentro das ciências biológicas na virada do século 21 (CAMERON; BASHOR; COLLINS, 2014). Apesar de não possuir uma definição consensual entre seus expoentes, esse campo multidisciplinar da biologia importa técnicas da engenharia (principalmente do campo da microeletrônica) para modificar, otimizar e criar novas vias metabólicas, bioquímicas, genomas e até mesmo componentes celulares. Ainda, de forma singular, essa área se vale da modularidade e padronização para melhorar a capacidade prática de programar e construir sistemas biológicos que produzem resultados projetados com propriedades e funções previsíveis (CLARKE; KITNEY, 2020), com base no ciclo autoexplicativo de projeção-construção-testagem-aprendizado (do inglês, Design-Build-Test-Learn, DBTL) (NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES; DIVISION ON EARTH AND LIFE; BOARD ON LIFE; BOARD ON CHEMICAL SCIENCES AND *et al.*, 2018). Apesar de ser pouco conhecida no Brasil, a biologia sintética possibilitou inúmeros avanços tecnológicos consideráveis para solucionar os desafios globais atuais como segurança alimentar, pandemias emergentes, poluição dos oceanos (RAMAN; SINHA; VICKERS; NIKEL, 2021).

Para entender o desenvolvimento da biologia sintética, foram selecionados alguns trabalhos publicados e eventos chaves na linha do tempo dessa ciência na Figura 1. No ano 2000, o grupo de Collins e colegas (GARDNER; CANTOR; COLLINS, 2000) construíram um dos primeiros interruptores genéticos, contendo promotores que conduzem a expressão de repressores transcricionais mutuamente inibitórios, sendo que as células que continham este circuito podiam alternar entre dois estados de expressão estáveis em resposta a sinais externos. Além deste exemplo, a dupla Elowitz e Leibler (2000) construíram o primeiro “repressilator” (repressilador), formado por um ciclo de feedback triplo negativo de sequencias de promotores inibitórios, de forma que o transcrito do primeiro gene inibe a expressão do segundo, o segundo inibe o terceiro e o terceiro inibe o primeiro, fechando assim o ciclo (ELOWITZ; LEIBLER, 2000). O “repressilator” foi o primeiro oscilador sintético introduzido em um organismo, abrindo possibilidades para o estudo de comportamentos cíclicos e oscilatórios que naturalmente ocorrem em organismos, como por exemplo o ciclo circadiano. A partir destas publicações, outros tipos de osciladores foram surgindo e, de forma mais abrangente, encorajaram a construção de circuitos cada vez mais complexos, culminando na evolução do estudo da comunicação célula-célula, formação de padrões estruturais em organismos, e o controle fino das respostas celulares através da optogenética (CAMERON; BASHOR; COLLINS, 2014).

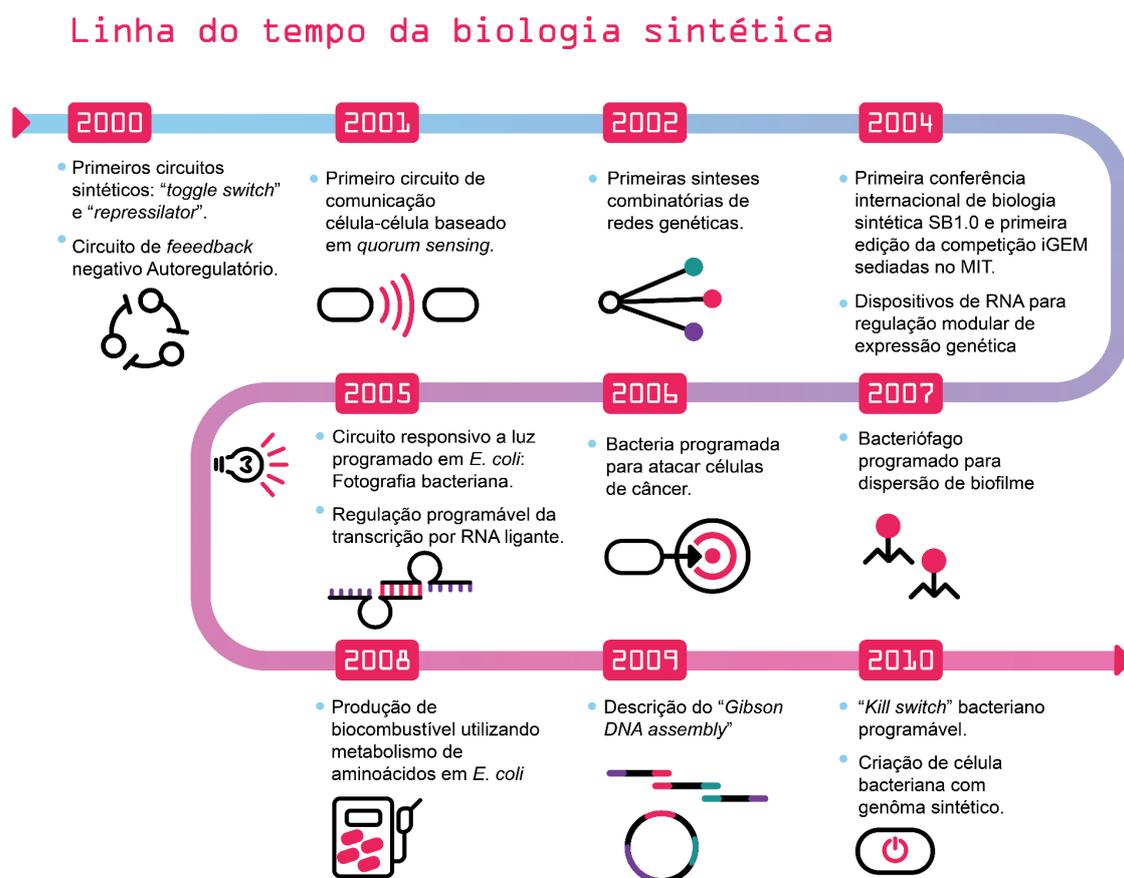
Por fim, para além do ilustrado nos anos da história da biologia sintética, atualmente existem diversos produtos no mercado que usufruem desta tecnologia. Dois exemplos

interessantes em campos diferentes são: PROVEN, um fertilizante de nitrogênio biológico para milho da Pivot Bio e “Hambúrgueres que sangram” por “impossible foods” (VOIGT, 2020).

Como ilustrado na Figura 1, um dos marcos na história da biologia sintética foi o desenvolvimento de um sistema capaz de induzir a expressão gênica pelo controle da luz. Publicado em 2005 pelo grupo do renomado pesquisador Christopher A. Voigt, este circuito e sua aplicação ficaram conhecidos como fotografia de bactéria (LEVSKAYA, A.; CHEVALIER, A. A.; TABOR, J. J.; SIMPSON, Z. B. *et al.*, 2005). Atualmente, Voigt é um dos expoentes da investigação das bases de biologia sintética para a chamada área da optogenética que, contudo, surgiu ao final da década de 1970 com o desafio proposto por Francis Crick (CRICK, 1979). Constatou-se que a resposta para o desafio de estimular precisamente neurônios estava no uso da luz e de sistemas responsivos que permitem ativar ou inativar populações específicas de neurônios controlando suas funções e comportamentos, com uma alta resolução espaço-temporal. Vale ressaltar que o termo optogenética foi cunhado em 2005 pelo pesquisador Boyden em seu trabalho sobre regulação óptica em neurônios (BOYDEN; ZHANG; BAMBERG; NAGEL *et al.*, 2005; LINDNER; DIEPOLD, 2021). Por esse motivo, o uso da palavra chave “optogenetic” na base de publicações americana, PubMed-NCBI, gera cerca de 8.912 trabalhos (ano da consulta: 2022) sendo que a grande maioria deles perpassa neurociência e neuromodulação. Interessantemente, ao fazer a consulta em uma base de dados pública especializada em optogenética (OptoBase) a palavra chave “neuroscience” retorna 30 publicações em oposição a “synthetic biology” que retorna 173 publicações, cerca de cinco vezes mais trabalhos publicados (ano da consulta: 2022).

Considerando uma definição ampla, a optogenética combina técnicas ópticas e genéticas para programar e empregar proteínas sensíveis à luz que são capazes de controlar processos celulares dentro de organismos vivos. De forma didática, é possível dividir as proteínas (ou domínios de proteínas) sensíveis à luz em: opsinas microbianas e interruptores ópticos. Esta variedade de sensores bacterianos/eucarióticos de luz que evoluíram para detectar sinais ultra-violeta, azul, verde, vermelho/vermelho longo e infravermelho foram expressos de forma heteróloga em *E. coli*, ou seja, na bactéria modelo que não ocorre de forma natural (JIANG; CUI; RAHMOUNI, 2017; LINDNER; DIEPOLD, 2021). Ademais, os sistemas melhores caracterizados nessa bactéria são os de recepção da luz azul, vermelho e verde (descritos nos tópicos seguintes deste capítulo).

Figura 1. Linha do tempo da biologia sintética. iGEM (International Genetically Engineered Machine), MIT (Massachusetts Institute of Technology), SB1.0 (Synthetic Biology 1.0).



Fonte: adaptado de Cameron et al., 2014.

Dito isso, a optogenética oferece uma série de vantagens em relação aos outros tipos de indução da expressão genética em bactérias, principalmente no contexto de bioprodução. Atualmente neste setor, é comumente utilizado indutores químicos, como IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) (sistema LacI-pLac) ou arabinose (sistema araC-pBAD), para a ativação da expressão de genes de interesse em *E. coli*. O uso desses indutores, entretanto, impõem uma série de dificuldades: a incapacidade de obter uma resposta rápida de ativação e repressão da expressão gênica para um controle metabólico mais dinâmico e complexo, e o problema relacionado à concentração de indutores químicos, que varia ao longo do tempo de cultura devido à sua degradação (SOFFER; PERRY; SHIH, 2021). Promotores sensíveis à mudança de temperatura apresentam caráter reversível, mas o gradiente de temperatura do ambiente impossibilita a precisão espacial de indução, possui baixa amplitude dinâmica de expressão e geralmente a mudança de temperatura aumenta o estado de estresse nas células (MOSER; THAM; GONZÁLEZ; LU *et al.*, 2019; PIRANER; ABEDI; MOSER; LEE-GOSSELIN *et al.*, 2017). Em contrapartida, a luz é capaz de propiciar um controle mais robusto de forma precisa e instantânea, garantindo um equilíbrio fino durante a fase de

crescimento da cultura e a fase de bioprodução, maximizando o acúmulo do produto final. Além disso, também garante de forma prática a reversibilidade do estímulo, o que não é viável ao utilizar indutores químicos.

Por fim, a luz garante o controle de feedback remoto das culturas de células, um atributo necessário para a automatização da bioprodução, uma vez que o estímulo luminoso e a sua retirada garantem a ativação e desativação gênica de forma rápida o suficiente para modular o metabolismo celular em tempo real (LIU; ZHANG; JIN; GENG *et al.*, 2018; POUZET; BANDERAS; LE BEC; LAUTIER *et al.*, 2020).

■ MÉTODOS

O capítulo é uma revisão baseada em diversos artigos científicos. O material bibliográfico e os dados utilizados foram adquiridos através da base eletrônica PubMed-NCBI (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) e OptoBase (<https://www.optobase.org/>), usando palavras-chave “optogenetics”, “optogenetics and applications”, “optogenetics and synthetic biology”.

■ RESULTADOS E DISCUSSÃO

Circuito genético responsivo à luz vermelha.

O sistema de detecção de luz vermelha mais conhecido é baseado em complexos sensoriais de dois componentes que, similar aos sistemas de percepção da luz verde e azul (descritos também neste capítulo), são constituídos de uma proteína sensora do tipo quinase (primeiro componente) que atua como um fotorreceptor e sinalizador, e outra proteína reguladora (segundo componente) que responde à sinalização para iniciar uma determinada resposta celular (BAUMSCHLAGER; KHAMMASH, 2021; LINDNER; DIEPOLD, 2021) através da mudança da expressão gênica. Os fitocromos bacterianos sensíveis à luz vermelha mais estudados estão relacionados às cianobactérias *Synechocystis* sp. PCC6803 (Cph1 e CcaS) e *Fremyella diplosiphon* (RcaE), sendo que o mecanismo de ação destas proteínas estão bem caracterizadas (DREPPER; KRAUSS; MEYER ZU BERSTENHORST; PIETRUSZKA *et al.*, 2011; HIROSE; SHIMADA; NARIKAWA; KATAYAMA *et al.*, 2008; TERAUCHI; MONTGOMERY; GROSSMAN; LAGARIAS *et al.*, 2004; YEH; WU; MURPHY; LAGARIAS, 1997). Entre esses fitocromos, o Cph1 tem se destacado por ser amplamente utilizado na construção de circuitos genéticos controlados pela luz vermelha/vermelha longa ou na combinação com outros tipos de luzes (e.g., luz verde e/ou azul) (FERNANDEZ-RODRIGUEZ; MOSER; SONG; VOIGT, 2017; SCHMIDL; SHETH; WU; TABOR, 2014; TABOR; LEVSKAYA; VOIGT, 2011).

O funcionamento do sistema Cph1–Rcp1 descrito por Yeh e colaboradores (1997), mostrou que o primeiro componente (Cph1) é uma proteína transmembrana quinase, onde a região N-terminal (periplasma) funciona como fotorreceptor, e é constituída por três domínios altamente conservados que servem como ponto de ligação para o cromóforo de tetrapirrol ficocianobilina (PCB), sendo que este é responsável pela absorção dos comprimentos de onda da luz vermelha. Já a região C-terminal (citoplasma) atua como sinalizador, e é composta por um domínio de histidina quinase dependente de ATP que exibe atividade fosforilativa quando o Cph1 se encontra no estado ativo (Pr) (ESSEN; MAILLIET; HUGHES, 2008). Consequentemente, o domínio quinase fosforila a proteína fosfotransferase Rcp1 (segundo componente) que em resposta à fosforilação, transduz o sinal para outras moléculas mediante a sua desfosforilação (DREPPER; KRAUSS; MEYER ZU BERSTENHORST; PIETRUSZKA *et al.*, 2011). A biossíntese do cromóforo PCB na cianobactéria *Synechocystis* sp. começa pela oxidação do grupo prostético heme codificado pelo produto do gene *ho1*, produzindo o pigmento intermediário biliverdina (BV) que posteriormente é reduzido pelo produto do gene *pycA* (BAUMSCHLAGER; KHAMMASH, 2021). Desse modo, a ligação do PCB na região fotorreceptora permite que o fitocromo Cph1 possa absorver a luz vermelha (~650 nm) ou do vermelho longo (~700-730 nm) criando-se assim um estado de absorção de vermelho (Pr) e um estado de absorção de vermelho longo (Pfr), sendo que ambos estados Pr e Pfr são reversíveis entre si (DWIJAYANTI; ZHANG; POH; LAUTIER, 2022; ROCKWELL; SU; LAGARIAS, 2006). Curiosamente, em plantas o fitocromo (Phy) é ativo no estado Pfr, enquanto na cianobactéria *Synechocystis* sp. o fitocromo Cph1 é ativo no estado Pr (ROCKWELL; SU; LAGARIAS, 2006; YEH; WU; MURPHY; LAGARIAS, 1997).

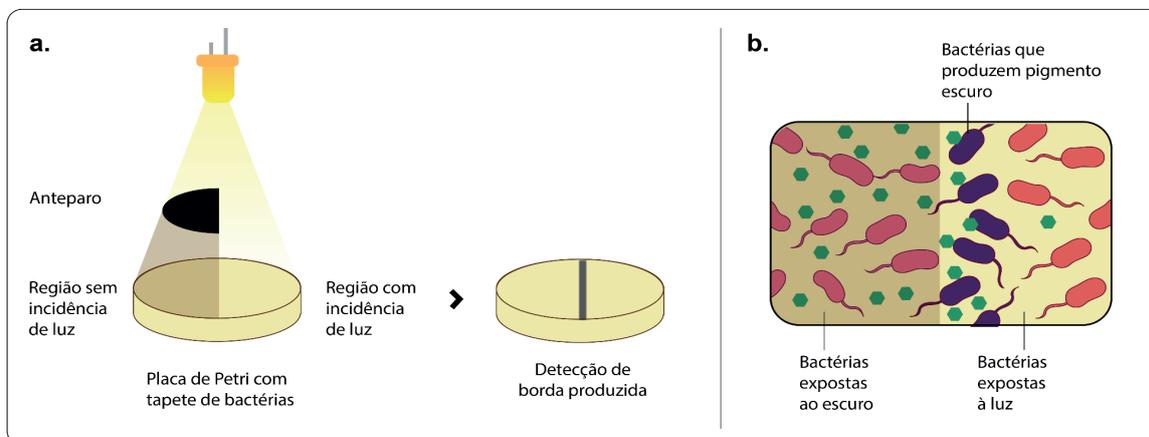
Em resumo, a transdução de sinal do sistema Cph1–Rcp1 se inicia quando o domínio fotossensor do fitocromo Cph1, contendo o cromóforo PCB, absorve uma faixa de luz do vermelho longo conduzindo o complexo para o estado Pr, neste ponto ocorre a homodimerização do fitocromo, promovendo a autofosforilação do domínio histidina quinase. Logo, a proteína reguladora Rcp1 é fosforilada pela interação com o domínio quinase do Cph1, e finalmente a proteína Rcp1 transfere esses grupos fosfato para outras moléculas que irão desencadear uma resposta celular. Entretanto, a ausência de luz também converte o fitocromo Cph1 na forma ativa (Pr), processo conhecido como “reversão no escuro” (ROCKWELL; SU; LAGARIAS, 2006). Todavia, a inativação da autofosforilação do Cph1 também pode ser realizada mediante a iluminação com a luz vermelha, conduzindo o fitocromo para o estado Pfr (YEH; WU; MURPHY; LAGARIAS, 1997).

O fato do domínio fotossensor do fitocromo acoplado ao PCB ser funcional mesmo na ausência do domínio quinase (JONES; EDGERTON, 1994; YEH; WU; MURPHY; LAGARIAS, 1997), possibilitou a criação de fotorreceptores com diferentes propriedades. Levskaya e

colaboradores (2005) demonstraram pela primeira vez em *E. coli*, que a fusão da região N-terminal do domínio conservado do fotorreceptor Cph1 com o domínio do sensor osmótico EnvZ de *E. coli*, resulta em uma proteína de membrana denominada Cph8-EnvZ, capaz de receber o sinal de luz vermelho longo (705 nm) para ativar o fator transcricional OmpR e induzir a expressão de genes controlados pelo promotor *ompC*. De forma contrária, a expressão do gene de interesse é reprimida quando o Cph8 é irradiado com luz vermelha (~650 nm) ocasionando a desfosforilação do regulador OmpR pelo domínio EnvZ (Figura 3a). Adicionalmente, os genes da biossíntese do PCB também foram expressos heterologicamente na *E. coli*, uma vez que estes componentes não são endógenos nesta bactéria.

A partir do trabalho de Levskaya *et al.*, (2005), Tabor e colaboradores (2009) perceberam o grande potencial do sistema Cph8-EnvZ/OmpR e, inspirados em um algoritmo de processamento de sinal para o reconhecimento de imagens denominado “detecção de borda”, os autores construíram uma linhagem de *E. coli* capaz de identificar a região de interseção entre uma área escura e outra iluminada de uma cultura homogênea em placa de Petri. Para isto, os genes da biossíntese do cromóforo PCB são expressos nas células de forma constitutiva, enquanto que Cph8-EnvZ/OmpR promove a produção da enzima LuxI e da proteína repressora *ci* apenas nas células da área escura. Por sua vez, LuxI realiza a síntese do autoindutor AHL (N-acil homoserina lactona), uma molécula responsável pela comunicação entre células e pela ativação da proteína LuxR (LuxR-AHL), que é expresso constitutivamente neste circuito. Conseqüentemente, a região promotora regulada pelo ativador LuxR-AHL e pelo repressor *ci* permitem a produção da enzima β -galactosidase que converte um substrato no meio em um pigmento escuro apenas nas células próximas da interseção da área iluminada, uma vez que o repressor *ci* não é produzido na presença de luz e a molécula sinalizadora AHL tem difusão extremamente limitada. Desse modo, somente as células localizadas espacialmente na área iluminada e próximas da interseção escuro/luz se tornam escuras, enquanto células mais afastadas da interseção mantêm o seu fenótipo inalterado (Figura 2). A funcionalidade deste elegante circuito genético abre um leque de possibilidades para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos ou na produção de materiais vivos, onde a expressão gênica responsável pela formação dos produtos finais precisam ser finamente controlados de forma espacial, temporal e sob condições específicas nas populações de células (DIN; DANINO; PRINDLE; SKALAK *et al.*, 2016; GURBATRI; LIA; VINCENT; COKER *et al.*, 2020; MOSER; THAM; GONZÁLEZ; LU *et al.*, 2019).

Figura 2. Detecção de borda por bactérias programadas. a) Células programadas para identificar e processar o limite entre a área escura/iluminada, resultando na produção de um pigmento para demarcar esta região. b) O sinal de comunicação AHL (círculos verdes) produzidas pelas bactérias no escuro, se difunde através da interseção escuro/claro e são recebidas apenas pelas bactérias expostas à luz e próximas da interseção. Estas células se tornam positivas para a expressão de um gene repórter pigmentoso, enquanto bactérias no escuro e bactérias da área iluminada longe da interseção são incapazes de responder ao sinal de comunicação.



Fonte: adaptado de Tabor et al., (2009).

Circuito genético responsivo à luz verde

O sistema CcaS/R é um dos mais conhecidos para o controle da expressão gênica mediada pela luz verde (532 nm). É caracterizado por ser um típico sistema de dois componentes, apresentando um sensor de histidina quinase associado a membrana (CcaS) e um regulador de resposta (CcaR) (HIROSE; SHIMADA; NARIKAWA; KATAYAMA *et al.*, 2008).

CcaS/R foi primeiramente identificado em um grupo de fotorreceptores exclusivo de cianobactérias conhecido como cianobacteriocromo (HIROSE; SHIMADA; NARIKAWA; KATAYAMA *et al.*, 2008). CcaS apresenta uma estrutura composta por uma região N-terminal com uma hélice transmembrana, seguida de um domínio *cGMP phosphodiesterase/adenylyl cyclase/FhI* (GAF), de dois domínios *Per-ARNT-Sim* (PAS) e da região C-terminal contendo o domínio da histidina quinase. Já a CcaR corresponde a um típico regulador OmpR, apresentando um domínio receptor na região N-terminal e um domínio de ligação ao DNA, na região C-terminal (Hirose *et al.*, 2008). É no domínio GAF, encontrado em CcaS, que ligações covalentes ocorrem, promovendo a associação do cromóforo PCB, responsável pela percepção da luz verde (CASTILLO-HAIR; BAERMAN; FUJITA; IGOSHIN *et al.*, 2019). Em resumo, como verificado na Figura 3b, PCB ao receber o estímulo luminoso verde, libera fótons que ativam CcaS (CASTILLO-HAIR; BAERMAN; FUJITA; IGOSHIN *et al.*, 2019). Com CcaS ativo, há o sequestro de grupos fosfato, na forma de ATPs, e sua transferência para a região histidina quinase, que por sua vez o é transferido para CcaR (HIROSE; SHIMADA; NARIKAWA; KATAYAMA *et al.*, 2008). A fosforilação de CcaR resulta em sua ativação, o que promove o aumento do acoplamento ao promotor *PcpcG2* e o aumento da expressão gênica (HIROSE;

SHIMADA; NARIKAWA; KATAYAMA *et al.*, 2008). A exposição a luz vermelha (650 nm), diferentemente da luz verde, desencadeia a desfosforilação de CcaS promovendo a reversão do processo (HIROSE; SHIMADA; NARIKAWA; KATAYAMA *et al.*, 2008).

Baseado na descoberta do funcionamento de CcaS/R, um sistema de indução por luz verde foi criado para *E. coli* (TABOR; LEVSKAYA; VOIGT, 2011). Não só essa transposição apresentou sucesso, mas também foi acompanhada da combinação com um segundo sistema, responsivo a luz vermelha (LEVSKAYA, ANSELM; CHEVALIER, AARON A.; TABOR, JEFFREY J.; SIMPSON, ZACHARY BOOTH *et al.*, 2005; TABOR; LEVSKAYA; VOIGT, 2011). Como o cromóforo PCB não é naturalmente sintetizado em *E. coli*, a indução da expressão da sua via de síntese também foi expressada de forma heteróloga. Esse foi o primeiro sistema de controle da regulação gênica multicromático, onde diferentes comprimentos de onda geram a regulação de diferentes genes em um único organismo. Esse sistema biestável abriu oportunidades para um controle espacial e local mais refinado da regulação gênica (TABOR; LEVSKAYA; VOIGT, 2011). Projetos seguintes focaram no aperfeiçoamento desse circuito através da diminuição da expressão inespecífica e do aumento da faixa dinâmica, conseguindo alcances de até 600 vezes no nível de expressão (NAKAJIMA; FERRI; RÖGNER; SODE, 2016; ONG; TABOR, 2018; SCHMIDL; SHETH; WU; TABOR, 2014). O aumento da eficácia da percepção da intensidade de luz verde ocorreu pela deleção dos domínios PAS, o qual ainda não tem sua função bem determinada (CASTILLO-HAIR; BAERMAN; FUJITA; IGOSHIN *et al.*, 2019).

Em relação às aplicações, o CcaS/R já foi utilizado em modelos integrados de *E. coli* e *Caenorhabditis elegans*, para auxiliar na compreensão das relações entre micróbios e hospedeiros. Neste estudo, feito por (HARTSOUGH; PARK; KOTLAJICH; LAZAR *et al.*, 2020), *E. coli* foi engenheirada para conter o sistema CcaS/R regulando a biossíntese do ácido colânico, exopolissacarídeo relacionado ao aumento da longevidade em *C. elegans* (HAN; SIVARAMAKRISHNAN; LIN; NEVE *et al.*, 2017). Para o estudo, o controle da expressão gênica por indutores químicos apresenta desvantagens quando o interesse se encontra na precisão, pois a velocidade e a eficiência do transporte e da degradação dos indutores não pode ser controlada e o risco da ocorrência de efeitos colaterais nos organismos modelos é uma possibilidade indesejada. Por esse motivo, a optogenética é uma alternativa viável, pois proporciona um controle quantitativo preciso, temporal e espacial. Além disso, a transparência do hospedeiro *C. elegans* também contribuiu para uma indução efetiva pela luz verde, e este conjunto de fatores permitiu a elucidação da função de 24 genes relacionado à longevidade no presente artigo (OLSON; TABOR, 2014). Por fim, visando aumentar a precisão do sistema CcaS/R, Soffer, Perez e Shih (2021), desenvolveram uma plataforma optogenética capaz de analisar, calcular e sugerir os parâmetros de luminosidade de verde

e vermelha necessários para manter em constante equilíbrio o funcionamento do circuito CcaS/R, diminuindo o estresse celular e aumentando o tempo de sobrevivência do circuito. Essa ferramenta não é restrita a CcaS/R, sendo o seu uso recomendado para outros modelos optogenéticos que desejam um controle retroativo (sistema com base em feedback).

Circuito genético responsivo à luz azul

Por último, um dos sistemas mais estudados para o controle da expressão gênica através da luz azul (470 nm) utiliza a proteína fusionada YF1, um fotorreceptor solúvel composto pelo domínio N-terminal da proteína YtvA e pela porção efetora C-terminal da enzima FixL (BAUMSCHLAGER; KHAMMASH, 2021; MÖGLICH; MOFFAT, 2010).

YtvA é originária de *Bacillus subtilis*, e composta por um domínio N-terminal LOV (Light-Oxygen-Voltage) da superfamília PAS, que utiliza FMN (flavin mononucleotide) como cromóforo. O domínio LOV atua como um sensor molecular de luz que transduz o sinal de ativação através da mudança conformacional da região C-terminal da proteína (LOSI; POLVERINI; QUEST; GÄRTNER, 2002). Uma vez ativada, YtvA é capaz de interagir com o fator de transcrição sigmaB para então expressar os genes responsáveis pela resposta e tolerância a estresses ambientais (AKBAR; GAIDENKO; KANG; O'REILLY *et al.*, 2001; AVILA-PÉREZ; HELLINGWERF; KORT, 2006; GAIDENKO TATIANA; KIM; WEIGEL ANDREA; BRODY MARGARET *et al.*, 2006). FixL/FixJ por sua vez, é um sistema de dois componentes responsável pela regulação do metabolismo do nitrogênio em resposta ao baixo nível de oxigênio na bactéria *Bradyrhizobium japonicum* (NELLEN-ANTHAMATTEN; ROSSI; PREISIG; KULLIK *et al.*, 1998). FixL também é composto por um domínio PAS e uma região C-terminal efetora que possui atividade de fosfatase e histidina quinase. Uma vez ativado, FixL fosforila FixJ, que atua como um fator de transcrição ao se ligar no promotor do gene *fixK2* e promover a sua expressão (TAYLOR; ZHULIN, 1999).

Como as proteínas YtvA e FixL possuem o domínio PAS e domínios efetores com funções distintas, (MÖGLICH; AYERS; MOFFAT, 2009) *et al.* (2008) hipotetizou que essas regiões poderiam ser intercambiáveis e propôs a fusão da região LOV de YtvA, com o domínio efetor de FixL, resultando em YF1. Curiosamente, constatou-se que YF1 possuía uma ação quinase constitutiva e, era capaz de fosforilar FixJ para a ativação do promotor FixK2 em ambiente escuro. Por outro lado, a incidência da luz azul em YF1 foi capaz de reverter a sua atividade para uma fosfatase, inibindo a expressão do gene regulado pelo promotor FixK2.

Com o intuito de construir um circuito que ativa a expressão do gene de interesse através da incidência de luz, (OHLENDORF; VIDAUSKI; ELDAR; MOFFAT *et al.*, 2012) construiu um plasmídeo denominado pDawn (Figura 3c), o qual é formado pelos genes *yf1* e *fixL* expressos constitutivamente, o promotor FixK2 controlando a expressão do gene repressor

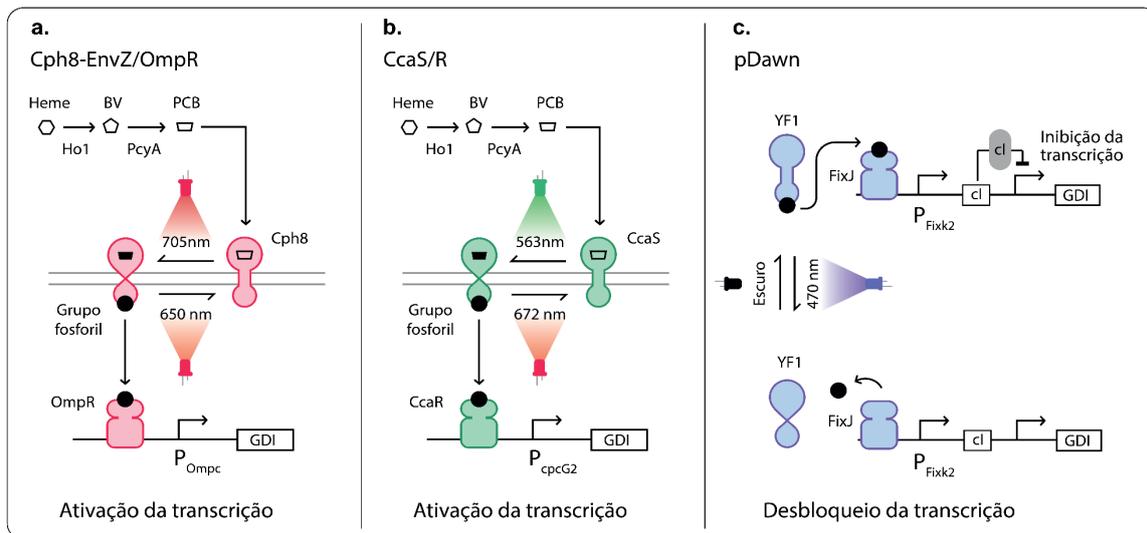
(*cl*), e o gene de interesse negativamente regulado pelo repressor *cl* (promotor pR). Esta estratégia de adicionar um repressor controlando a expressão de um segundo repressor é conhecida como um NOT *gate* em biologia sintética, uma porta lógica conceitualmente importada do campo da eletrônica que tem como objetivo inverter a polaridade do sinal de indução. Desta forma, a luz ativa a expressão do gene de interesse ao invés de reprimi-la, como havia sido constatado originalmente.

Recentemente, um grupo de pesquisadores publicou um trabalho utilizando o plasmídeo pDawn regulando a expressão de uma adesina (Ag43) (Jin e Riedel-Kruse 2018). Esta proteína aumenta a adesão entre as células e promove a formação de biofilme (KLEMM; HJERRILD; GJERMANSEN; SCHEMBRI, 2004). Ao utilizar uma fonte de luz azul para projetar uma imagem em uma cultura de *E. coli* /pDawn-Ag43, observou-se a formação de biofilme apenas na área onde a luz incidiu. A imagem formada pelo biofilme atingiu uma resolução máxima de 25 μm , e a velocidade de adesão de novas camadas celulares aumentou de acordo com a intensidade da luz, até a sua saturação em aproximadamente 41 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (JIN; RIEDEL-KRUSE INGMAR, 2018). Ainda neste estudo, a alta precisão espacial da indução de adesina, somado ao uso de modelos computacionais, permitiu demonstrar que a formação do padrão de biofilme só é possível se considerarmos que Ag43 contribui para a diminuição da constante de dessorção das células, e não devido ao aumento da constante de adsorção entre elas, como havia sido hipotetizado anteriormente. Estes resultados reforçam o imenso potencial do uso da optogenética no controle da formação de biofilmes, tanto para entender os mecanismos e processos básicos de sua estrutura, quanto para a criação de diferentes materiais biológicos baseados em biofilmes, através do controle da intensidade, espaço e tempo de indução pela luz.

Um outro exemplo simples de aplicação da optogenética na biologia sintética consistiu na construção de um circuito genético no qual o promotor Lac é regulado pela incidência de luz azul. O promotor Lac contém sítios conhecidos como operadores onde o repressor LacI pode se ligar para interferir com a expressão do gene subsequente. Normalmente, a indução da expressão é feita através da adição de IPTG, o qual interage com o LacI e libera a região promotora para que a RNA polimerase possa iniciar a transcrição. Com o intuito de modificar o modo de indução dos genes de interesse controlados pelo promotor Lac, (LALWANI, M. A.; IP, S. S.; CARRASCO-LÓPEZ, C.; DAY, C. *et al.*, 2021) *et al.* (2020) utilizaram o plasmídeo pDawn para regular a expressão de LacI em uma *E. coli* contendo circuitos gênicos para a produção de biomoléculas de interesse, que são regulados pelo promotor Lac. Desta forma, em ambiente escuro, LacI é produzido e inibe a expressão dos genes de interesse. Por outro lado, a luz azul reprime a expressão de LacI e acarreta na liberação da expressão de genes controlados pelo promotor Lac. Esta estratégia da regulação do promotor Lac

através da luz azul foi chamada de OptoLAC e, apesar da resposta de ativação ser mais lenta quando comparada ao indutor químico IPTG, possui a vantagem de ser um método de indução mais barata, menos tóxica para as células, e com um maior controle dinâmico no processo de bioprodução.

Figura 3. Funcionamento de três sistemas de percepção de luz. **a.** Sistema Cph8-EnvZ/OmpR com fotorreceptor de membrana, ativado pela luz vermelha longa (705 nm) **b.** Sistema CcaS/R com fotorreceptor de membrana, ativado pela luz verde (563 nm). **c.** Sistema pDawn com fotorreceptor solúvel, responsivo a luz azul (470 nm). GDI: Gene De Interesse.



Fonte: adaptado de Baumschlager e Khammash. (2021).

Sistema RGB: combinando as três cores (vermelho, verde e azul) em um único sistema

Tendo em vista o sucesso da aplicação de cada uma das cores de luz de forma individual, alguns estudos têm usado a combinação de 2 ou mais cores com o objetivo de modular vias metabólicas mais complexas (LALWANI, MAKOTO A.; IP, SAMANTHA S.; CARRASCO-LÓPEZ, CÉSAR; DAY, CATHERINE *et al.*, 2021). (FERNANDEZ-RODRIGUEZ; MOSER; SONG; VOIGT, 2017) construiu um sistema RGB (do inglês *Red, Green e Blue*) que possibilita a *E. coli* distinguir entre as luzes vermelha, verde e azul, e responder a esses estímulos com mudanças na expressão de diversos genes. Para isso, foi necessário a junção dos três sistemas de percepção de luz (Cph8*, CcasS/R e YF1) de forma otimizada, para que estes funcionassem em conjunto, diminuindo a interferência entre eles e equilibrando as suas respostas. A otimização consistiu em alterações nas sequências RBS (do inglês, *Ribosome binding site*) dos genes, promotores, NOT gates, peptídeo sinal de degradação e o uso de diferentes origens de replicação dos plasmídeos.

Este circuito RGB foi utilizado por Fernandez-Rodrigues *et al.* (2017) para o desenvolvimento de uma forma eficiente de reduzir a produção de acetato pelo controle das enzimas de sua via metabólica. Para isso, foi acoplado ao circuito um sistema de CRISPR de interferência, em que os produtos (*output*) dos sistemas vermelho, verde e azul, resultam na expressão

de um RNA guia específico para cada um deles, que bloqueiam os genes das enzimas da glicólise PoxB, Pta e AckA, respectivamente. Assim, foi possível acessar com facilidade a produção de acetato, com repressão dos genes das enzimas individualmente, ou em diferentes combinações, considerando também a reversibilidade do sinal de indução. Essa mesma metodologia pode ser utilizada para o estudo de diversas vias metabólicas de interesse de forma a possibilitar a otimização do rendimento de variados produtos biotecnológicos.

■ CONCLUSÃO

O design de circuitos genéticos e a sua otimização por meio de modelos matemáticos/computacionais, empregados pela biologia sintética, tem sido fundamental para a rápida evolução desta área na ciência. Além disso, o advento da modularidade e melhor caracterização das partes genéticas e o baixo custo de síntese de fragmentos de DNA, estão proporcionando a construção de circuitos genéticos cada vez mais complexos e que requerem um maior grau de controle e precisão. A partir desta demanda, a optogenética ressurgiu no campo da biologia sintética, pois o controle da expressão gênica pela luz é acurado e reversível, abrindo novas possibilidades no ramo da biotecnologia e até mesmo na terapia de doenças humanas. À exemplo disto, a luz vermelha/infravermelha, por ser menos energética, consegue penetrar de forma mais eficiente nos tecidos biológicos (STOLIK; DELGADO; PÉREZ; ANASAGASTI, 2000) e, portanto, pode ser uma ótima alternativa não invasiva na terapia celular e gênica (MANSOURI; FUSSENEGGER, 2021). A luz vermelha também se mostrou menos absorvível pelo meio de cultura, o que pode ser uma vantagem para bioprodução em larga escala, onde a densidade de células alcança valores muito elevados (LINDNER; DIEPOLD, 2021).

A optogenética também tem se expandido para além do controle de bactérias, estendendo o seu uso para células animais, vegetais e principalmente em leveduras. Por ser considerado um importante modelo eucarioto, o desenvolvimento de ferramentas da optogenética tem se focado em *Saccharomyces cerevisiae*, tanto para estudar os fundamentos do processo celular em organismos mais complexos quanto para a bioprodução na biotecnologia (FIGUEROA; ROJAS; ROMERO; LARRONDO *et al.*, 2021; XU; DU; LIU; LI *et al.*, 2018).

No entanto, vale ressaltar que ainda há alguns desafios a serem considerados. Por exemplo, alguns estudos têm mostrado que comprimentos de onda visível de alta energia (380 - 500 nm), possuem efeitos deletérios em células eucarióticas e no crescimento de organismos modelo como *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* (EL NAJJAR; VAN TEESELING; MAYER; HERMANN *et al.*, 2020; GENTILE; LATONEN; LAIHO, 2003), apesar de pulsos luminosos de curta duração aliviar esses efeitos (LINDNER; DIEPOLD, 2021).

Em síntese, como citado nos exemplos de aplicações neste capítulo, a combinação de sistemas optogenéticos oferecem interessantes abordagens para o desenvolvimento de sistemas complexos e automatizados, ao mesmo tempo que abre portas para melhorias dos processos industriais de grande porte no futuro.

■ REFERÊNCIAS

AKBAR, S.; GAIDENKO, T. A.; KANG, C. M.; O'REILLY, M. *et al.* New family of regulators in the environmental signaling pathway which activates the general stress transcription factor sigma(B) of *Bacillus subtilis*. **Journal of bacteriology**, 183, n. 4, p. 1329-1338, 2001.

AVILA-PÉREZ, M.; HELLINGWERF, K. J.; KORT, R. Blue light activates the sigmaB-dependent stress response of *Bacillus subtilis* via YtvA. **Journal of bacteriology**, 188, n. 17, p. 6411-6414, 2006.

BAUMSCHLAGER, A.; KHAMMASH, M. Synthetic Biological Approaches for Optogenetics and Tools for Transcriptional Light-Control in Bacteria. **Advanced Biology**, 5, n. 5, p. 2000256, 2022/03/05 2021.

BOYDEN, E. S.; ZHANG, F.; BAMBERG, E.; NAGEL, G. *et al.* Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. **Nat Neurosci**, 8, n. 9, p. 1263-1268, Sep 2005.

CAMERON, D. E.; BASHOR, C. J.; COLLINS, J. J. A brief history of synthetic biology. **Nature Reviews Microbiology**, 12, n. 5, p. 381-390, 2014.

CASTILLO-HAIR, S. M.; BAERMAN, E. A.; FUJITA, M.; IGOSHIN, O. A. *et al.* Optogenetic control of *Bacillus subtilis* gene expression. **Nature communications**, 10, n. 1, p. 3099-3099, 2019.

CLARKE, L.; KITNEY, R. Developing synthetic biology for industrial biotechnology applications. **Biochem Soc Trans**, 48, n. 1, p. 113-122, Feb 28 2020.

CRICK, F. H. Thinking about the brain. **Sci Am**, 241, n. 3, p. 219-232, Sep 1979.

DIN, M. O.; DANINO, T.; PRINDLE, A.; SKALAK, M. *et al.* Synchronized cycles of bacterial lysis for in vivo delivery. **Nature**, 536, n. 7614, p. 81-85, 2016.

DREPPER, T.; KRAUSS, U.; MEYER ZU BERSTENHORST, S.; PIETRUSZKA, J. *et al.* Lights on and action! Controlling microbial gene expression by light. **Appl Microbiol Biotechnol**, 90, n. 1, p. 23-40, Apr 2011.

DWIJAYANTI, A.; ZHANG, C.; POH, C. L.; LAUTIER, T. Toward Multiplexed Optogenetic Circuits. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, 9, p. 804563-804563, 2022.

EL NAJJAR, N.; VAN TEESELING, M. C. F.; MAYER, B.; HERMANN, S. *et al.* Bacterial cell growth is arrested by violet and blue, but not yellow light excitation during fluorescence microscopy. **BMC Mol Cell Biol**, 21, n. 1, p. 35, May 1 2020.

ELOWITZ, M. B.; LEIBLER, S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. **Nature**, 403, n. 6767, p. 335-338, Jan 20 2000.

ESSEN, L. O.; MAILLIET, J.; HUGHES, J. The structure of a complete phytochrome sensory module in the Pr ground state. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105, n. 38, p. 14709-14714, Sep 23 2008.

FERNANDEZ-RODRIGUEZ, J.; MOSER, F.; SONG, M.; VOIGT, C. A. Engineering RGB color vision into Escherichia coli. **Nature chemical biology**, 13, n. 7, p. 706-708, 2017.

FIGUEROA, D.; ROJAS, V.; ROMERO, A.; LARRONDO, L. F. *et al.* The rise and shine of yeast optogenetics. **Yeast**, 38, n. 2, p. 131-146, Feb 2021.

GAIDENKO TATIANA, A.; KIM, T.-J.; WEIGEL ANDREA, L.; BRODY MARGARET, S. *et al.* The Blue-Light Receptor YtvA Acts in the Environmental Stress Signaling Pathway of Bacillus subtilis. **Journal of Bacteriology**, 188, n. 17, p. 6387-6395, 2022/03/05 2006.

GARDNER, T. S.; CANTOR, C. R.; COLLINS, J. J. Construction of a genetic toggle switch in Escherichia coli. **Nature**, 403, n. 6767, p. 339-342, Jan 20 2000.

GENTILE, M.; LATONEN, L.; LAIHO, M. Cell cycle arrest and apoptosis provoked by UV radiation-induced DNA damage are transcriptionally highly divergent responses. **Nucleic acids research**, 31, n. 16, p. 4779-4790, 2003.

GURBATRI, C. R.; LIA, I.; VINCENT, R.; COKER, C. *et al.* Engineered probiotics for local tumor delivery of checkpoint blockade nanobodies. **Science translational medicine**, 12, n. 530, 2020.

HAN, B.; SIVARAMAKRISHNAN, P.; LIN, C. J.; NEVE, I. A. A. *et al.* Microbial Genetic Composition Tunes Host Longevity. **Cell**, 169, n. 7, p. 1249-1262.e1213, Jun 15 2017.

HARTSOUGH, L. A.; PARK, M.; KOTLAJICH, M. V.; LAZAR, J. T. *et al.* Optogenetic control of gut bacterial metabolism to promote longevity. **eLife**, 9, p. e56849, 2020.

HIROSE, Y.; SHIMADA, T.; NARIKAWA, R.; KATAYAMA, M. *et al.* Cyanobacteriochrome CcaS is the green light receptor that induces the expression of phycobilisome linker protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 105, n. 28, p. 9528-9533, 2022/03/05 2008.

JIANG, J.; CUI, H.; RAHMOUNI, K. Optogenetics and pharmacogenetics: principles and applications. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 313, n. 6, p. R633-r645, Dec 1 2017.

JIN, X.; RIEDEL-KRUSE INGMAR, H. Biofilm Lithography enables high-resolution cell patterning via optogenetic adhesin expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 115, n. 14, p. 3698-3703, 2022/03/05 2018.

JONES, A. M.; EDGERTON, M. D. The anatomy of phytochrome, a unique photoreceptor in plants. **Seminars in Cell Biology**, 5, n. 5, p. 295-302, 1994.

KLEMM, P.; HJERRILD, L.; GJERMANSEN, M.; SCHEMBRI, M. A. Structure-function analysis of the self-recognizing Antigen 43 autotransporter protein from Escherichia coli. **Molecular microbiology**, 51, n. 1, p. 283-296, 2004.

LALWANI, M. A.; IP, S. S.; CARRASCO-LÓPEZ, C.; DAY, C. *et al.* Optogenetic control of the lac operon for bacterial chemical and protein production. **Nat Chem Biol**, 17, n. 1, p. 71-79, Jan 2021.

LALWANI, M. A.; IP, S. S.; CARRASCO-LÓPEZ, C.; DAY, C. *et al.* Optogenetic control of the lac operon for bacterial chemical and protein production. **Nature chemical biology**, 17, n. 1, p. 71-79, 2021.

LEVSKAYA, A.; CHEVALIER, A. A.; TABOR, J. J.; SIMPSON, Z. B. *et al.* Synthetic biology: engineering Escherichia coli to see light. **Nature**, 438, n. 7067, p. 441-442, Nov 24 2005.

LEVSKAYA, A.; CHEVALIER, A. A.; TABOR, J. J.; SIMPSON, Z. B. *et al.* Synthetic biology: engineering Escherichia coli to see light. **Nature**, 438, n. 7067, p. 441-442, 2005.

LINDNER, F.; DIEPOLD, A. Optogenetics in bacteria – applications and opportunities. **FEMS Microbiology Reviews**, 46, 2021.

LIU, Z.; ZHANG, J.; JIN, J.; GENG, Z. *et al.* Programming Bacteria With Light—Sensors and Applications in Synthetic Biology. **Frontiers in Microbiology**, 9, 2018.

LOSI, A.; POLVERINI, E.; QUEST, B.; GÄRTNER, W. First Evidence for Phototropin-Related Blue-Light Receptors in Prokaryotes. **Biophysical Journal**, 82, n. 5, p. 2627-2634, 2002.

MANSOURI, M.; FUSSENEGGER, M. Synthetic biology-based optogenetic approaches to control therapeutic designer cells. **Current Opinion in Systems Biology**, 28, p. 100396, 2021.

MOSER, F.; THAM, E.; GONZÁLEZ, L. M.; LU, T. K. *et al.* Light-controlled, high-resolution patterning of living engineered bacteria onto textiles, ceramics, and plastic. **Advanced Functional Materials**, 29, n. 30, p. 1901788, 2019.

MÖGLICH, A.; AYERS, R. A.; MOFFAT, K. Design and signaling mechanism of light-regulated histidine kinases. **J Mol Biol**, 385, n. 5, p. 1433-1444, Feb 6 2009.

MÖGLICH, A.; MOFFAT, K. Engineered photoreceptors as novel optogenetic tools. **Photochem Photobiol Sci**, 9, n. 10, p. 1286-1300, Oct 28 2010.

NAKAJIMA, M.; FERRI, S.; RÖGNER, M.; SODE, K. Construction of a Miniaturized Chromatic Acclimation Sensor from Cyanobacteria with Reversed Response to a Light Signal. **Sci Rep**, 6, p. 37595, Nov 24 2016.

NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, E. A. M.; DIVISION ON EARTH AND LIFE, S.; BOARD ON LIFE, S.; BOARD ON CHEMICAL SCIENCES AND, T. *et al.* In: **Biodefense in the Age of Synthetic Biology**. Washington (DC): National Academies Press (US)

Copyright 2018 by the National Academy of Sciences. All rights reserved., 2018.

NELLEN-ANTHAMATTEN, D.; ROSSI, P.; PREISIG, O.; KULLIK, I. *et al.* Bradyrhizobium japonicum FixK2, a crucial distributor in the FixLJ-dependent regulatory cascade for control of genes inducible by low oxygen levels. **J Bacteriol**, 180, n. 19, p. 5251-5255, Oct 1998.

OHLENDORF, R.; VIDAUSKI, R. R.; ELDAR, A.; MOFFAT, K. *et al.* From dusk till dawn: one-plasmid systems for light-regulated gene expression. **J Mol Biol**, 416, n. 4, p. 534-542, Mar 2 2012.

OLSON, E. J.; TABOR, J. J. Optogenetic characterization methods overcome key challenges in synthetic and systems biology. **Nat Chem Biol**, 10, n. 7, p. 502-511, Jul 2014.

- ONG, N. T.; TABOR, J. J. A Miniaturized Escherichia coli Green Light Sensor with High Dynamic Range. **Chembiochem**, 19, n. 12, p. 1255-1258, Jun 18 2018.
- PIRANER, D. I.; ABEDI, M. H.; MOSER, B. A.; LEE-GOSSELIN, A. *et al.* Tunable thermal bioswitches for in vivo control of microbial therapeutics. **Nat Chem Biol**, 13, n. 1, p. 75-80, Jan 2017.
- POUZET, S.; BANDERAS, A.; LE BEC, M.; LAUTIER, T. *et al.* The Promise of Optogenetics for Bioproduction: Dynamic Control Strategies and Scale-Up Instruments. **Bioengineering (Basel)**, 7, n. 4, Nov 24 2020.
- RAMAN, K.; SINHA, H.; VICKERS, C. E.; NIKEL, P. I. Synthetic biology beyond borders. *In: Microb Biotechnol*, 2021. v. 14, p. 2254-2256.
- ROCKWELL, N. C.; SU, Y. S.; LAGARIAS, J. C. Phytochrome structure and signaling mechanisms. **Annu Rev Plant Biol**, 57, p. 837-858, 2006.
- SCHMIDL, S. R.; SHETH, R. U.; WU, A.; TABOR, J. J. Refactoring and optimization of light-switchable Escherichia coli two-component systems. **ACS Synth Biol**, 3, n. 11, p. 820-831, Nov 21 2014.
- SOFFER, G.; PERRY, J. M.; SHIH, S. C. C. Real-Time Optogenetics System for Controlling Gene Expression Using a Model-Based Design. **Anal Chem**, 93, n. 6, p. 3181-3188, Feb 16 2021.
- STOLIK, S.; DELGADO, J. A.; PÉREZ, A.; ANASAGASTI, L. Measurement of the penetration depths of red and near infrared light in human “ex vivo” tissues. **J Photochem Photobiol B**, 57, n. 2-3, p. 90-93, Sep 2000.
- TABOR, J. J.; LEVSKAYA, A.; VOIGT, C. A. Multichromatic control of gene expression in Escherichia coli. **J Mol Biol**, 405, n. 2, p. 315-324, Jan 14 2011.
- TAYLOR, B. L.; ZHULIN, I. B. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. **Microbiol Mol Biol Rev**, 63, n. 2, p. 479-506, Jun 1999.
- TERAUCHI, K.; MONTGOMERY, B. L.; GROSSMAN, A. R.; LAGARIAS, J. C. *et al.* RcaE is a complementary chromatic adaptation photoreceptor required for green and red light responsiveness. **Mol Microbiol**, 51, n. 2, p. 567-577, Jan 2004.
- VOIGT, C. A. Synthetic biology 2020-2030: six commercially-available products that are changing our world. **Nat Commun**, 11, n. 1, p. 6379, Dec 11 2020.
- XU, X.; DU, Z.; LIU, R.; LI, T. *et al.* A Single-Component Optogenetic System Allows Stringent Switch of Gene Expression in Yeast Cells. **ACS Synth Biol**, 7, n. 9, p. 2045-2053, Sep 21 2018.
- YEH, K. C.; WU, S. H.; MURPHY, J. T.; LAGARIAS, J. C. A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. **Science**, 277, n. 5331, p. 1505-1508, Sep 5 1997.

Potencial biotecnológico dos fungos

- | **Hortência Farias de Andrade**
Centro Universitário Tiradentes - UNIT
- | **Joana Suassuna da Nóbrega Veras**
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE
- | **Anna Paula de Oliveira Souza**
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE
- | **Palloma Lima de Oliveira**
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE
- | **Maria Betânia Melo de Oliveira**
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

RESUMO

Os fungos são representados por aproximadamente 120.000 espécies distribuídas em 19 filos e são microrganismos de grande importância biotecnológica. Mesmo com a grande diversidade fúngica, alguns autores acreditam que o número de espécies descritas atualmente é subestimado. Diante da diversidade e complexidade de características que incluem o reino Fungi, percebe-se uma grande capacidade de adaptação e sobrevivência e dessa forma possuem grande aplicação na indústria de diversas categorias, sendo largamente utilizadas desde a indústria alimentícia até a farmacêutica, entre outras. O presente trabalho teve por objetivo explorar o potencial biotecnológico dos fungos, com base na literatura. Devido à importância econômica dos fungos no meio industrial, trabalhos envolvendo a biotecnologia de fungos e seus metabólitos secundários ganhou maior destaque. Pesquisas recentes demonstram propriedades medicinais de diversas espécies, tais como antioxidante, anticonvulsivante e até inseticida e antiparasitário. Por isso deve-se enfatizar a importância da biotecnologia em tais processos de obtenção dos produtos e dar continuidade a estudos envolvendo a mesma.

Palavras-chave: Metabólito Secundário, Reino Fungi, Bioprospeção.

■ INTRODUÇÃO

Os fungos são microrganismos que possuem uma alta importância biotecnológica. Eles são utilizados na indústria desde a produção alimentícia, nas aplicações na indústria farmacêutica e até mesmo nos processos de biorremediação de fungos capazes de degradar petróleo, pigmentos entre outros. Apesar desse ramo ter ganhado força recentemente o homem em 8.000 a.C já lidavam com a Biotecnologia na produção de bebidas lácteas fermentadas no Egito e na Babilônia, mesmo sem compreender a existência dos microrganismos e que os mesmos eram responsáveis pelos processos de fermentação (HYDE; XU; RAPIOR; JEEWON *et al.*, 2019). Enfim, os fungos são microrganismos de grande interesse biotecnológico. No mundo, a produção e o investimento em biotecnologia varia entre os países, em função da disponibilidade dos recursos naturais, econômicos e políticos, das características das empresas envolvidas e do papel assumido pelos setores público e privado (TIAN; FU; ZHANG; DONG *et al.*). Portanto, o presente trabalho busca a partir de dados na literatura informações sobre o potencial biotecnológico dos fungos e seus principais metabólitos.

■ MÉTODO

Trata-se de uma pesquisa de revisão bibliográfica. Para a execução da mesma, foram utilizados artigos dispostos em plataformas com bancos de dados incluindo Pubmed, Lilacs e Scielo. Os artigos selecionados encontravam-se em língua portuguesa e inglesa com corte temporal de artigos principalmente a partir de 2005. Finalmente, no levantamento bibliográfico, foram utilizados 31 artigos, selecionados conforme a qualidade e relevância com o tema proposto.

■ RESULTADOS E DISCUSSÃO

Características gerais, identificação, biodiversidade e classificação dos fungos

Dentre os microrganismos eucarióticos, isto é, aqueles que possuem uma membrana nuclear que envolve o núcleo, destacam-se os fungos. Esse grupo de organismos não apresentam pigmentos fotossintetizantes e absorvem a energia contida nas ligações químicas de vários nutrientes através de enzimas, sendo classificados como heterotróficos. A morfologia dos fungos é variada e se apresentam de forma unicelular (levedura) e/ou pluricelulares (filamentosas). Os fungos filamentosos são constituídos por um conjunto de células cilíndricas multinucleadas separadas por septos ou não (cenocíticas). O agrupamento dessa estrutura, formam o micélio. Por outro lado, as leveduras são constituídas por pseudo-hifas,

estruturas denominadas de brotos que se multiplicam e permanecem unidas umas às outras com constrictões nos sítios septais. Essas estruturas fúngicas, cumprem tanto o papel vegetativo, como o reprodutivo.

Do ponto de vista reprodutivo, os fungos são capazes de reproduzir de maneira assexuada (fragmentação, brotamento e esporulação), sexuada (plasmogamia, cariogamia e meiose) e parassexuada (fusão das hifas e formação de um heterocarion com núcleos haplóides). No geral, a classificação taxonômica dos fungos é baseada nas características morfológicas da hifa, corpos de frutificação, esporo e ciclo de vida. Durante muito tempo, os fungos encontravam-se inseridos no reino Plantae e, apenas 1969, passaram a ser classificados em um reino à parte: o reino Fungi (WHITTAKER, 1971).

Atualmente, os fungos são representados por aproximadamente 120.000 espécies distribuídos em 19 filos: Aphelidiomycota, Ascomycota, Basidiobolomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota, Calcarisporiellomycota, Caulochytriomycota, Chytridiomycota, Entomophthoromycota, Entorrhizomycota, Glomeromycota, Kickxellomycota, Monoblepharomycota, Mortierellomycota, Mucoromycota, Neocallimastigomycota, Olpidiomycota, Rozellomycota e Zoopagomycota (JANBON *et al.*, 2019; NETO *et al.*, 2019; WIJAYAWARDENE *et al.*, 2020). Apesar da grande diversidade fúngica, alguns autores acreditam que o número de espécies descritas atualmente é subestimado e o que conhecemos é menos de 5% da real diversidade existente desse grupo (HYDE; XU; RAPIOR; JEEWON *et al.*, 2019; WU; HUSSAIN; ZHANG; STADLER *et al.*).

A diversidade de grupos e a complexidade de características que incluem o reino Fungi, fazem com que esses organismos apresentem grande capacidade de adaptação e sobrevivência e sejam extremamente importantes tanto do ponto de vista biológico, como econômico. Diariamente as pessoas são beneficiadas por produtos originados direta ou indiretamente de fungos como alimentos, fermentados e bebidas alcoólicas; fármacos, tratamento biológico de efluentes, produção de enzimas de interesse industrial e na biotransformação, entre outros (HYDE; XU; RAPIOR; JEEWON *et al.*, 2019). Em vista da sua relevância, informações sobre os principais grupos e suas características, além da distribuição no ambiente, representam um componente primordial no desenvolvimento de estratégias de busca e de exploração de novos dos recursos biológicos.

Biotechnologia

A biotecnologia é a busca e utilização de recursos biológicos industrialmente exploráveis, seja para a produção de produtos, ou seja, na mediação de processos (CDB, 1992). Apesar desse ramo ter ganhado força recentemente o homem em 8.000 a.C já lidavam com a Biotecnologia na produção de bebidas lácteas fermentadas no Egito e na Babilônia,

mesmo sem compreender que os microrganismos eram responsáveis pelos processos de fermentação. No entanto, foi apenas em 1675 que Anton Van Leeuwenhoek descobriu a existência dos microrganismos e, a partir daí, avanços científicos e tecnológicos alcançados nos últimos anos vem revolucionando as abordagens tradicionais de exploração desse grupo de organismos com avanços em biologia molecular, genômica e bioinformática (HYDE; XU; RAPIOR; JEEWON *et al.*, 2019).

No mundo, a produção e o investimento em biotecnologia varia entre os países, em função da disponibilidade dos recursos naturais, econômicos e políticos, das características das empresas envolvidas e do papel assumido pelos setores público e privado. No entanto, considerando a crescente participação da Biotecnologia na economia e a importância para o desenvolvimento do país, diversos governos estão aplicando estratégias, planos de ação e políticas de incentivo à educação, pesquisa e desenvolvimento desse ramo da Biologia. Atualmente, o mercado de culturas biotecnológicas no mundo foi avaliado em US\$ 18,15 bilhões em 2018, de acordo com o *Coherent Market Insights* e que esse valores chegarão a US\$ 37,46 bilhões até 2027, exibindo uma taxa 8,7% de ao ano.

O Brasil, devido a sua diversidade biológica, ocupa lugar de destaque no panorama mundial da Biotecnologia. Com a criação do Comitê Nacional de Biotecnologia, instituído pelo Decreto N° 6.041 de 08/02/2007 e considerando a participação crescente desse ramo na biologia na economia, o governo brasileiro assim como outros, estão aplicando estratégias, planos de ação e políticas de incentivo à educação, pesquisa e desenvolvimento da Biotecnologia. A Associação Brasileira de Bioinovação (ABBI) projetou que no país haverá um crescimento do setor de biotecnologia industrial para os próximos 20 anos. Segundo a ABBI, o setor pode agregar aproximadamente US\$53 bilhões anuais à economia brasileira.

Biotecnologia como bioproduto

Os fungos são considerados um dos maiores produtores de compostos bioativos (RANA; KOUR; SHEIKH; YADAV *et al.*, 2019), classificados em primários e secundários (WATSON, 2019). Os metabólitos primários são compostos envolvidos nos processos de crescimento vegetativo fúngico, como armazenamento de energia e estrutural. Por outro lado, os metabólitos secundários não estão envolvidos nas funções básicas dos fungos mas encontram-se envolvidos na sobrevivência do organismo ao meio ambiente, sintetizados na fase estacionária (DEVI; KAUR; GULERIA; RANA *et al.*, 2020) ABREU; RODOVIDA; PHAMPHILE, 2015). Para a biotecnologia e para o meio ambiente, os metabólitos secundários, pela riqueza de bioativos, são importantes, responsáveis por auxiliar na adaptação do fungo a estresses bióticos e abióticos (ALAMGIR, 2018; TAIZ; ZEIGER, 2006), além de possuírem atividades antimicrobiana, anti-inflamatória, antifúngica e antiviral (WINK; SCHIMMER, 2018).

Os compostos secundários originam-se de precursores do metabolismo primário que são modificados a partir de sucessivas ações enzimáticas e são convertidos em compostos bioativos (JACOBY; KOPRIVOVA; KOPRIVA, 2021). Como existe uma grande diversidade de fungo, as vias biossintéticas utilizadas para produzir os metabólitos secundários, também são múltiplas (ex: β -lactama, peptídeo cíclico, diterpenos, dicetopiperazinas, entre outras) (KELLER, 2019). De acordo com as propriedades químicas e estruturais dos metabólitos secundários, eles se dividem em quatro grupos principais: terpenóides, policetídeos, peptídeo não ribossomal e composto derivado do ácido shiquímico (DEVI; KAUR; GULERIA; RANA *et al.*, 2020). Além desses, já foram observados nos fungos a presença de compostos alcalóides, benzopirenos, chinonas, citocalasinas, depsipeptídeos, enniatinas, furandionas, flavonóides, isocumarinas, peptídeos, fenóis, policetonas, quinonas, esteróides, terpenóides e tetralonas (RANA; KOUR; SHEIKH; YADAV *et al.*, 2019).

Os metabólitos secundários, são produzidos por uma grande variedade de espécies fúngicas (Tabela 1). No entanto, sua produção predominam nos fungos filamentosos pertencentes às classes dos Ascomycetes e dos Basidiomycetes, com destaque para espécies pertencente aos subfilos Pezizomycotina e Agaricomycotina, considerados os maiores produtores de metabólitos secundários do reino Fungi (NARANJO-ORTIZ; GABALDÓN, 2020). Além dos fungos filamentosos, as leveduras também são produtoras de metabólitos secundários, encontrados em espécies mais e menos conhecidas dentro de Saccharomycetes, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis*, respectivamente (KELLER, 2019; KRAUSE; KOMINEK; OPULENTE; SHEN *et al.*, 2018).

Um grupo de microrganismos que tem se destacado nos últimos anos pela produção de metabólitos bioativos são os fungos endófitos, que representam uma importante fonte genética para a biotecnologia (BENGYELLA; IFTIKHAR; NAWAZ; FONMBOH *et al.*, 2019). Os fungos endofíticos são simbioses que ocupam a região inter e intracelular das plantas, pelo menos em alguma fase do seu ciclo de vida, habitando de modo geral as partes aéreas como folhas e caules, mas também as raízes, sem lhes causar doença no seu hospedeiro. Esses microrganismos têm estimulado o interesse da comunidade científica, devido à produção de metabólitos secundários com aplicações biotecnológicas na indústria alimentícia, farmacêutica e além disso apresentam potencial para impulsionar a agricultura com bases numa economia sustentável (BENGYELLA *et al.*, 2019) (JACOBY; KOPRIVOVA; KOPRIVA, 2021). Um aspecto interessante é que o número de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos é maior do que para qualquer outro grupo de microrganismos, o que está associado à alta diversidade encontrada em plantas.

Tabela 1. Levantamento dos metabólitos secundários produzidos pelos fungos.

Espécie	Metabólito	Autor
<i>Amphirosellinia nigrospora</i> , <i>Ascotricha sp.</i> , <i>Dematophora bunodes</i> , <i>Nemania bipapillata</i> , <i>Nemania sp.</i> , <i>Rosellinia sanctae-cruciana</i> , <i>Xylaria cf. curta</i> , <i>Xylaria sp.</i> , <i>X. cubensis</i> , <i>X. longipes</i> , <i>X. granatum</i> , <i>X. nigripes</i> , <i>X. papulis</i> , <i>X. allantoidea</i> , <i>Hypoxylon pulicicidum</i> , <i>H. rubiginosum</i> , <i>H. guilanense</i> , <i>H. fuscum</i> , <i>H. fendleri</i> , <i>H. rickii</i> , <i>Daldinia concentrica</i> , <i>Daldinia eschscholtzii</i>	corloxin	(BECKER; STADLER, 2021)
	(2R,3R)-1,2,3,4,-butanetetraol-1,4-diosellinate	
	demathophorane A	
	nemenonediol A (2R,4S,5R,8S)-4-deacetyl-5-hydroxy-botryenalol	
	19,20-epoxycytochalasin C	
	phoenixilane A e B	
	jamosporin A	
	curachalasin A e C	
	xylarichalasin A	
	cytochalasin P1	
	epoxyrosellichalasin	
	xylarisin B	
	xylochalasin	
	nigriterpene C	
	xylarilongipin A	
	xylarinoditerpene I	
	xylapapuside A	
	xylariane B	
	xylareremophil	
	hydroxydecandrin G	
	mannosylxylarinolide	
	chaxine C	
	ellisiamide A	
	xylapeptide A e B	
	pentaminolarin	
	E10111	
	clonostachydiol	
	(5e)-10-heptyl-3,4,5,8,9,10-hexahydro-5,8,9-trihydroxy-2H-oxecin-2-one	
	fimbriether B	
	xylarianin A	
	penixylarin C	
	arugosin O	
	(-)-mangostafeejin A	
	xylarodon A	
	xylarianin B	
	6-ethyl-7,8-dihydroxy-4h-chromen-4-one	
	xylaromanone A	
	xylaropyranone C	
	xylariahgin A	
	xylarianin C	
	6-heptanoyl-4-methoxy-2H-pyran-2-one	
(3S)-3,4-dihydro-5,7,8-trihydroxy-3-methylisocoumarin		
xylarphthalide A		
griseofulvin		
7-fluoro-7-dechloro-griseofulvin		
wheldone		
(+)-xylaridine A		
(+)-xylaridine D		
allantoside		
2,5-diamino-N-(1-amino-1-imino-3-methylbutan-2-yl) pentanamide		
fragiformin D		
daldinin		
rutilin C		
hybridorubrin A		
fragirubrin A		
fendlerinine D		
fendleral A		
fendlerin D		
16-D-glucopyranosyl-oxypimar-7-en-19-oic acido		

Espécie	Metabólito	Autor
	hypoxyside brasilane D hpoxylide 5,6-epoxyphomol viridistratin B daldiquinone fendleryl A (-)-dalescone D (-)-galewone daldinione E flaviolin 3,3'-biflaviolin daldinium A 7-O-alfa-D-ribosyl-5-hydroxy-2-methyl-4H-chromen-4-one daldinisin hypoxyolide trienylfuranol A hypotien A dalesindoloid A nodulisporic acid phomopsidin 10-hydroxyphomopsidin emodepside	
<i>Alternaria alternata</i>	Capsaicina	LEE, 2016
<i>Ascomycota</i> sp.	Ascomicotina A; Diorcinol	ZAIN et al., 2020
<i>Aspergillus</i> sp.	-7 ácido -desoxi-7,8-didesidro-12-hidroxissidônico; -7,10-ácido epoxysydonic	(WANG; YU; ZHU; WANG et al., 2018)
<i>Dothiorella</i> sp	dothiorelones K – M	(ZHENG; HUANG; LIAO; MEI et al., 2019)
<i>Drechmeria</i> sp.	indol, 2'-epiterpendol A	(ZHAO; LUAN; LIANG; CHENG et al., 2018)
<i>Penicillium</i> sp.	7-hidroxi-paxilina-13eno; ; Viridicatol; Ciclopenol; Penerpenos A; Penerpenos B; Penerpenos E-H; Paxiline; Emindole SB; Frutigenina A; Echinulin.	NAZIR et al., 2021
<i>Phoma</i> sp.	1-metoxi-3,5'-dimetil-2,3'-oxibifenil-5,1',2'-triol; Ciperina; (10'S) - Ver-ruculida B.	NAZIR et al., 2021
<i>Stemphylium lycopersici</i>	Stemfilina; Stemfipirona; Infectopirona; Fomapirona A	MEDINA et al., 2021
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	Koninginóis A – C	(CHEN; LI; CHEN; LI et al., 2019)
<i>Trichoderma harzianum</i>	10-cicloneren-3,5,7-triol; 11-metoxi-9-cicloneren-3,7-diol; metil 3,7-dihidroxi-15-cicloneranato	(SONG; FANG; MIAO; YIN et al., 2018)

Fonte: O autor.

Fungos e suas aplicações biotecnológicas

A utilização de compostos bioativos de origem fúngica traz diversos benefícios tanto para a saúde humana, quanto ao ecossistema (JACOBY; KOPRIVOVA; KOPRIVA, 2021). Biotecnologia é a definição dada a aplicação dos organismos, sistemas ou processos, assim como qualquer fração, tecidos ou células presentes nestes para fins de aplicação industrial através do uso das ciências biológicas e engenharias (MUKHERJEE et al., 2018). Enquanto que a micotecnologia é o termo utilizado para fazer referência a diversos processos onde os fungos conferem impacto biotecnológico e econômico (MUKHERJEE et al.,

2018). A biotecnologia de fungos promete estimular a transição da economia, atualmente baseada na exploração de petróleo, para uma arquitetura econômica sustentável com consonância às necessidades das sociedades, contribuindo para redução do efeito estufa, mitigação das mudanças climáticas e oferecendo soluções para o abastecimento alimentício frente ao crescimento populacional (MEYER; BASENKO; BENZ; BRAUS *et al.*, 2020).

A produção biotecnológica baseada em produtos derivados de fungos é responsável por um mercado milionário e de rápido crescimento, envolvido na indústria alimentícia, farmacêutica, onde os fungos filamentosos ocupam posição de destaque, participando da produção de enzimas, fármacos e químicos (MEYER; BASENKO; BENZ; BRAUS *et al.*, 2020). Além dos produtos disponíveis, especialistas de diferentes áreas, como das engenharias e ciências biológicas, projetam a utilização dos fungos na formulação de produtos com pegada de carbono reduzida para além das áreas clássicas com aplicações em produtos espaciais, automobilísticos, têxteis e de construção civil; com qualidade semelhante ou superior aos atualmente disponíveis (Tabela 2) (MEYER; BASENKO; BENZ; BRAUS *et al.*).

Tabela 2. Principais áreas, produtos e espécies de fungos com potencial Biotecnológico.

Área	Produto	Espécie
Têxtil	Couro vegano	
Química	Ácidos orgânicos	
Química	Biocombustível	Bipolaris Curvularia
Farmacêutica	Antibióticos	<i>Dematophora bunodes</i> , <i>Nemania sp.</i> , <i>Xylaria sp.</i> (BECKER; STADLER, 2021) <i>Flavodon flavus</i> (SILVA; POLONIO; POLLI; OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2021)
Farmacêutica	Antimicrobiano	<i>Stromatoneurospora phoenix</i> , <i>Annulohyphoxylon viridistratum</i> (BECKER; STADLER, 2021)
Farmacêutica	Antifúngico	<i>Xylaria cf. curta</i> (BECKER; STADLER, 2021)
Farmacêutica	Anticancerígeno	<i>Xylaria cf. curta</i> e <i>Xylaria sp</i> (BECKER; STADLER, 2021)
Farmacêutica	Vitaminas	
Farmacêutica	Proteínas	
Farmacêutica	Anticonvulsivante	<i>Nemania bipapillata</i> (BECKER; STADLER, 2021)
Farmacêutica	Coagulantes	<i>Rosellinia sanctae-cruciana</i> (BECKER; STADLER, 2021)
Farmacêutica	Imunossuppressores	<i>Xylaria longipes</i> (BECKER; STADLER, 2021)
Farmacêutica	Anti-neuroinflamatório	<i>Xylaria nigripes</i> (BECKER; STADLER, 2021)
Alimentícia	Alternativas à carne	
Agricultura	Controle de pragas/herbicida	<i>Xylaria cubensis</i> , <i>Xylaria sp.</i> (BECKER; STADLER, 2021)
Agricultura	Inseticida e antiparasitário	<i>H. pulicidum</i> (BECKER; STADLER, 2021)
Agronomia	Antiparasitário	<i>H. pulicidum</i> (BECKER; STADLER, 2021)

Fonte: O autor.

A biotecnologia fúngica é baseada na capacidade desses microrganismos em produzir compostos de interesse humano a partir de matéria orgânica; sua aplicação para produção de itens alimentícios está presente na vida social há milênios com a manipulação das leveduras e ainda hoje é um importante componente da indústria global (MEYER; BASENKO; BENZ; BRAUS *et al.*, 2020). A produção industrial de artigos biotecnológicos derivados de

fungos é uma realidade desde 1919 quando a Pfizer iniciou a comercialização de ácido cítrico para as indústrias farmacêutica, química e alimentícia (MEYER; BASENKO; BENZ; BRAUS *et al.*, 2020). Produzido pela ação do *Aspergillus niger*, uma espécie de fungo potencialmente produtora de ácidos, a exemplo o itaconato e o galactarato com aplicações na indústria de polímeros e plásticos; a produção do ácido cítrico baseada na fermentação submersa por ação de estirpes de *Aspergillus niger* em matéria-prima rica em açúcar é ainda hoje uma área de interesse crescente da indústria (MEYER; BASENKO; BENZ; BRAUS *et al.*, 2020).

Os fungos ocupam um papel fundamental entre os processos biotecnológicos modernos, onde além da sua participação em reações geração de produtos de interesse, a própria célula fúngica também apresenta potencial biotecnológico ao permitir a produção de proteínas para fins específicos a partir do uso de ferramentas da biologia molecular, funcionando como estrutura para fabricação (ADRIO, 2003).

Biotecnologia de fungos e a produção de fármacos

Os microrganismos em geral são fornecedores de uma quantidade abundante de produtos naturais para fins de interesse à saúde de animais e plantas, como fármacos e drogas (KATZ, 2016). O uso da biotecnologia de fungos está presente na produção de antibióticos, antitumorais e imunossupressores e reflete a importância dos fungos nas ciências médicas. Os antibióticos estão entre os fármacos obtidos pelo uso da biotecnologia de fungos desde a descoberta da possibilidade de utilização desses microrganismos como ferramenta biotecnológica e, ainda hoje, contribuem para a obtenção de produtos naturais de interesse humano (KATZ, 2016). Anterior a medicina moderna, no Egito antigo e na China, os metabólitos produzidos por fungos filamentosos ou bolores já eram utilizados no tratamento de feridas, e até hoje os bioprodutos desses microrganismos possibilitam o desenvolvimento de uma diversidade de medicamentos como imunossupressores e anti-hipercolesterolêmicos (KAWAGUCHI *et al.*, 2013). A penicilina foi o primeiro antibiótico produzido em escala comercial com ampla aplicação durante as duas guerras mundiais, este fármaco é um antibiótico eficaz contra muitas doenças graves produzido a partir do *Penicillium fungi* (KATZ, 2016).

Algumas espécies fúngicas apresentam capacidade de produzir até 50 metabólitos secundários, fato que somado a grande diversidade de espécies fúngicas e a importante participação dos produtos naturais como fontes de insumos farmacêuticos, a utilização desses microrganismos e seus metabólitos secundários se revela como uma alternativa potencial para indústria farmacêutica (BEEKMAN, 2014; KATZ, 2016). Os fungos filamentosos são destacáveis produtores de antibióticos, enquanto que os fungos terrestres saprófitos e os marinhos apresentam potencial impacto, sendo esperada uma grande quantidade de novos bioativos, visto a exploração ainda limitada desse ecossistema, e a expressiva competitividade

neste ecossistema, gerando enorme biodiversidade ambiental nos oceanos (SILBER *et al.*, 2016). Somada a estes fatores, a possibilidade de estimulação dos conjuntos de genes não expressos através de estímulos externos poderá possibilitar a descoberta de novos compostos (SILBER *et al.*, 2016).

O uso de microrganismos como fontes para produção de bioprodutos é uma alternativa interessante devido a possibilidade de cultivo em grande escala com bom custo-benefício (SILBER *et al.*, 2016). A participação dos fungos é marcante na produção de antibióticos, onde os fungos filamentosos ocupam 20% do total dessa classe de fármacos com produção anual de 60.000 toneladas de penicilinas, 5.500 toneladas de tetraciclina e 2.500 toneladas de cefalosporinas (SILBER *et al.*, 2016). Dessa forma é possível perceber que a produção de antibióticos para todas as necessidades apresentadas pela demanda atual é diretamente ligada a capacidade de manipulação de diferentes espécies desses microrganismos, assim relacionada à biotecnologia de fungos que surge como propulsora de estratégias realistas para o fornecimento de bioprodutos de interesse a indústria farmacêutica (SILBER *et al.*, 2016). Entre as espécies fúngicas utilizadas para produção de diferentes proteínas farmacêuticas destaca-se a *Saccharomyces cerevisiae* apresentando viabilidade de cultivo rápido e vetor seguro (por ter conhecimento de seus mecanismos moleculares), permitindo assim a possibilidade de seu uso para fins de consumo alimentar (ADRIO, 2003).

A mimetização de condições ambientais, a possibilidade de co-cultivo, assim como a geração de diferentes estímulos estressores a diferentes espécies fúngicas são métodos que podem possibilitar o desenvolvimento de novos bioprodutos a partir da biotecnologia de fungos (SILBER *et al.*, 2016). A incorporação das técnicas de biologia molecular, e os avanços da bioinformática e das ciências ômicas, permitindo a manipulação de características dos microrganismos contribuem para a seleção de fungos viáveis, possibilitando a descoberta de novos produtos naturais, assim como também semissintéticos e sintéticos (KATZ, 2016; SILBER *et al.*, 2016).

Biotecnologia de fungos e produção enzimática

Enzimas microbianas contribuem significativamente com a indústria ao catalisar várias reações químicas e reduzirem o impacto ambiental da produção, no entanto estas enzimas precisam apresentar especificidade ao substrato, estabilidade e eficiência catalítica em condições industriais de produção, para viabilizar sua utilização (GUDYNAITE-SAVITCH; 2016). Dentre os microrganismos viáveis nas condições de produção em escala, os fungos apresentam características que os tornam bons sistemas de produção de enzimas com capacidade de secretar grandes quantidades das enzimas de interesse, de modo que metade das enzimas atualmente utilizadas na indústria são de origem fúngica (GUDYNAITE-SAVITCH,

2016; MCKELVEY AND MURPHY, 2017). A produção das enzimas fúngicas ocorre principalmente pelos métodos de fermentação submersa ou em estado sólido, sendo estas enzimas principalmente aplicadas na elaboração de detergentes com adição de proteases e amilases; enquanto que no comércio as proteases, celulases, xilanases, lipases, amilases e fitases são as enzimas em destaque (MCKELVEY AND MURPHY, 2017).

Os fungos filamentosos são importantes para a produção de enzimas em escala industrial devido a alta capacidade de produção de enzimas extracelulares úteis na facilitação de processos de fabricação de produtos, fácil cultivo e resistência a condições ambientais estressantes (GUIMARÃES, 2006). Além da ampla aplicação dessas substâncias na industrialização de detergentes, amido, bebidas, alimentos, pigmentos, ração animal, papel, couro, e produtos de interesse químico e biomédico (GUIMARÃES, 2006). A utilização das ferramentas de biologia molecular para a manipulação de cepas alvo direcionadas à geração de produtos enzimáticos de interesse industrial através de processos robustos e genéricos é uma realidade especialmente porque a indústria de enzimas está voltada à redução de custos (Tabela 3) (ARNAU, 2020).

Tabela 3. Enzimas fúngicas com potencial biotecnológico.

Enzima	Aplicação	Autor
β -glucanases	Empregadas no preparo do mosto para fabricação de cerveja, bem como inseridas nas rações animais para aumentar a digestibilidade das β -glucanas presentes em grãos como trigo, cevada, aveia e centeio	Orlandelli et al., 2012
Fosfatases alcalinas	Utilizadas em ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), sondagem não isotópica, sistemas de blotting e sequenciamento	Guimarães, 2006
Fosfatase ácida	Utilizadas nas etapas de produção de ração animal com capacidade de liberação de menor teor de fitato liberado canas excretas animais	Guimarães, 2006
Glicose oxidase	Aplicação em testes biomédicos, com utilização para a quantificação de glicose e também para a marcação de antígenos ou anticorpos utilizados em técnicas imunológicas para a identificação de moléculas específicas para pesquisa em saúde	Guimarães, 2006
Lignina peroxidase	Aplicação ambiental, responsáveis pela mineralização de grande quantidade de compostos aromáticos recalcitrantes	Orlandelli et al., 2012
Proteases	Utilizadas em todos os tipos de detergentes e tem como função a degradação de compostos tipicamente proteínicos, como sangue e leite.	Orlandelli et al., 2012
Xilantases	Presente nas indústrias de alimentos, papel e no setor têxtil sendo importante para o processo de branqueamento com redução do uso de cloro	Guimarães, 2006

Fonte: O autor.

Biotecnologia de fungos e a sustentabilidade agrícola

Uma das principais preocupações da intensificação da produção agrícola é um cenário de mudanças climáticas vem afetando negativamente a produtividade agrícola e podem

comprometer a segurança alimentar em vários estágios, sendo necessárias medidas para atenuar os desdobramentos negativos da produção de alimentos através de práticas agrícolas sustentáveis capazes de garantir a segurança alimentar em um cenário de aumento populacional crescente sem comprometer a saúde do solo (BAHUGUNA, 2020). O uso de microrganismos surge como alternativa segura para substituir o emprego de fertilizantes químicos; neste contexto os fungos podem atuar sob uma ampla variação de condições do solo, como em solos alcalinos ou ácidos, suportando variações de temperaturas e déficit nutricional (BAHUGUNA, 2020).

A utilização dos fungos, seus processos e metabólitos para fins de uso eficiente e sustentável dos recursos naturais, possibilita associar progresso econômico à sustentabilidade e desempenha um papel importante na abordagem dos principais desafios globais com a criação de sistemas sustentáveis (SOMOLON, 2019). Os fungos podem participar do sistema agrícola como agentes de biocontrole, biofertilização e na lixiviação de resíduos, contribuindo para a segurança ambiental e para o aumento da produtividade agrícola através de agropráticas modernas (HYDE; XU; RAPIOR; JEEWON *et al.*, 2019) (KHALID *et al.*, 2017; ODOH, 2020).

O uso prolongado de fertilizantes químicos provoca desequilíbrio na qualidade e na estrutura da comunidade microbiana do solo e um impacto adverso no ecossistema agrícola, assim os biofertilizantes são uma possível solução sustentável para reduzir as agressões ao meio ambiente e manter os altos níveis de produção (ODOH, 2020; BAHUGUNA, 2020). O uso de microrganismos é uma das estratégias mais efetivas como estratégias de controle de pragas através de diferentes mecanismos como antibiose, parasitismo e disputa nutricional (VINALE, 2014). Os biofertilizantes fúngicos suprimem as condições de estresse abiótico, interferem em funções bioquímicas das plantas e fornecem nutrientes ao influenciar na aquisição e transporte de substâncias, aumentando seu crescimento e protegendo-a contra patógenos (ODOH, 2020). Os fungos e/ou seus metabólitos secundários utilizados como biofertilizantes interagem com outros microrganismos encontrados no solo para promover a resistência das plantações e expansão de safras (VINALE, 2014). Entre os agentes frequentemente utilizados estão *Mycorrhiza sp.*, *Trichoderma sp.*, *Chaetomium sp.* e *Gliocladium sp.* (ODOH, 2020). A capacidade de espécies fúngicas como *Empusa sepulchris*, *Metarhizium anisopliae* e *Cordyceps melothac* também são úteis para a agricultura porque podem ser utilizadas no controle de pragas como insetos (YUVARAJ, 2020).

Grupos de fungos são importantes para a sustentabilidade agrícola (TABELA 2), os micorrízicos vesiculares arbustulares (MVA), do filo Glomeromycota, possuem a capacidade de formar ligações do tipo micorrízicas com uma variedade de plantas através de esporocarpos, possibilitando benefícios a planta hospedeira devido ampliação da absorção de

nutrientes, disponibilização de metabólitos que contribuem para o crescimento e resistência a ambientes insalubres, através de uma relação comensal (YUVARAJ, 2020). As alterações morfológica e bioquímica permitem a sobrevivência da planta em situações desafiadoras como solos secos, excessivamente salinos por ampliar a capacidade da planta de extrair os nutrientes e volumes necessários de água (YUVARAJ, 2020). A inoculação da micorriza arbuscular também pode ser útil para absorção em níveis eficientes de fósforo pela planta, aumentando a capacidade de produção da espécie; estando esses fungos envolvidos também na regulação da absorção de outros minerais como cálcio, zinco (YUVARAJ, 2020).

Biotecnologia de fungos e a indústria têxtil

A necessidade de conservação ambiental impulsiona as indústrias de produção na busca por processos que possibilitem a melhoria dos produtos de base biológica, com redução da pegada de carbono e dos impactos ambientais, associada a diminuição dos custos de fabricação (AZIZAN, 2016). A biotecnologia branca consiste na aplicação de células vivas ou enzimas para fabricação de produtos facilmente degradáveis, com redução do gasto de energia e da geração de resíduos. A aplicação de microrganismos como fungos, seus metabólitos primários e secundários são importantes para os processos de industrialização tanto para a produção quanto para a etapa de lixiviamento de resíduos (AZIZAN, 2016). Neste sentido os fungos são relevantes contribuintes por sua versatilidade e por facilidades no seu cultivo sendo explorados em diferentes áreas da indústria como para a produção de alimentos; medicamentos antitumorais, antibióticos, antifúngicos; pesticidas; melhoria de safras; silvicultura; cosméticos; enzimas; conservantes; pigmentos têxteis e ácidos orgânicos (HYDE *et al.*, 2019).

Os pigmentos produzidos por fungos estão envolvidos na produção de cosméticos, alimentos e na indústria têxtil para tingir tecidos, sendo a busca pela identificação de corantes naturais eficazes e com baixo impacto ambiental um dos objetivos dessa indústria (SUWANNARACH, 2019; AGURTO, 2020). Pigmento vermelho e magenta foram extraídos dos fungos *Scytalidium cuboideum* e *Phoma herbarum*, respectivamente; a busca por pigmentos fúngicos é essencial visto o desafio ecológico provocado pela liberação de substâncias tóxicas por corantes sintéticos comumente utilizados na indústria têxtil (AGURTO, 2020; CHIBA, 2006; VENIL, 2020). Além desses pigmentos, o uso de ferramentas biotecnológicas possibilitaria a produção e extração de outros corantes fúngicos como carotenóides, melanina, índico e violacepina em escala industrial (VENIL, 2020).

Fungos e a indústria de alimentos e bebidas

A contribuição dos fungos na produção de alimentos e bebidas é uma realidade conhecida, no entanto a participação desses microrganismos na produção de artigos para indústria alimentícia não se restringe aos processos de fermentação, envolvendo a síntese de vitaminas, aminoácidos e lipídios, para incorporação de valor nutritivo e saborização (YUVARAJ, 2020). Os corpos frutíferos formados por cogumelos comestíveis, células de leveduras e micélios de fungos comestíveis são comercializados a fins de consumo humano (YUVARAJ, 2019).

O uso de enzimas fúngicas como as pectinases são aplicadas na produção industrial de vinhos e sucos de frutas ao ajudar na decomposição da parede celular, facilitando a liberação do suco (GUIMARÃES, 2006).

Biotecnologia de fungos e impacto econômico

Os benefícios da aplicação das enzimas fúngicas na indústria alcançou a marca de 6 bilhões de dólares em 2017, e a indústria de alimentos foi a principal beneficiada pelo uso dos fungos e seus metabólitos, correspondendo a cerca de 2 bilhões de dólares em 2017. Nos mercados emergentes onde a preocupação dos consumidores e as agências ambientais incentivam o consumo de produtos com menor impacto ecológico é esperado um crescimento de 6%, com ampliação da aplicação das enzimas fúngicas nos setores industriais têxtil, e da produção de papel biodiesel e biocombustível (ARNAU, 2020).

■ CONCLUSÃO

A partir desse levantamento foi possível observar que existe um aumento no interesse da comunidade científica em pesquisar compostos bioativos dos fungos na síntese de produtos ou processos de interesse econômico. Os fungos são onipresentes no ambiente e capazes de produzir inúmeras substâncias benéficas. Os metabólitos secundários produzidos por esse microrganismos possuem aplicabilidade em diversos setores econômicos (ex: agricultura, indústria farmacêutica, alimentícia, entre outros). No entanto, apesar da importância dos fungos para a Biotecnologia, ainda há muito a ser explorado e é perceptível a lacuna existente sobre algumas informações. Além disso, atender a demanda industrial para a produção em larga escala, ainda é um problema. Dessa forma, pesquisas futuras são importantes sobre a classificação das espécies de fungos e a sua interação com o meio ambiente, propiciando efeitos significativos tanto ambientais quanto econômicos. Além disso, aumentar as abordagens das vias biossintéticas, as reações de biotransformação e avaliar

alvos de novos compostos secundários do ponto de vista industrial facilitará ainda mais a utilização dos fungos e o fortalecimento frente à Bioeconomia.

■ REFERÊNCIAS

ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de Interesse: Aplicações Biotecnológicas. Universidade Estadual de Maringá – UEM. Revista UNINGÁ Review - Vol.21,nº 1, pp.55-59 (Jan – Mar 2015).

ADRIO JL, DEMAIN AL. FUNGAL BIOTECHNOLOGY. *Int Microbiol. Sep*;6(3):191-9. doi: 10.1007/s10123-003-0133-0. Epub 2003 Jul 29. PMID: 12898399, 2003.

AGURTO, M.P., GUTIERREZ, S.M.V., COURT, R.C.V., CHEN, H., ROBINSON, S.C., Oil-Based Fungal Pigment from *Scytalidium cuboideum* as a Textile Dye. *Journal Fungi* (Basel), 2020.

ALAMGIR, A. N. M. **Therapeutic use of medicinal plants and their extracts: Volume 2: phytochemistry and bioactive compounds.** Springer, 2018.

ARNAU, J., YAVER, D., HJORT, C.M., Strategies and Challenges for the Development of Industrial Enzymes Using Fungal Cell Factories. *Grand Challenges in Fungal Biotechnology.* 179–210, 2020.

AZIZAN, M.S., ZAMANI, A.I., STAHMANN, K., CHY., NG, C.L., Fungal metabolites and their industrial importance: A brief review. *Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 19(3):15-23, 2016.

BAHUGUNA, A.; JOE, A.-R.; KUMAR, V.; LEE, J.S.; KIM, S.-Y.; MOON, J.-Y.; CHO, S.-K.; CHO, H.; KIM, M. Study on the Identification Methods for Effective Microorganisms in Commercially Available Organic Agriculture Materials. *Microorganisms.* 8, 1568. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101568>, 2020.

BECKER, K.; STADLER, M. Recent progress in biodiversity research on the Xylariales and their secondary metabolism. **The Journal of Antibiotics**, 74, n. 1, p. 1-23, 2021.

BEEKMAN, A.M., BARROW, R.A., Fungal Metabolites as Pharmaceuticals. Australian Journal of Chemistry 67(6):827, 2014.

BENGYELLA, L.; IFTIKHAR, S.; NAWAZ, K.; FONMBOH, D. J. *et al.* Biotechnological application of endophytic filamentous bipolaris and curvularia: a review on bioeconomy impact. **World J Microbiol Biotechnol**, 35, n. 5, p. 69, Apr 22 2019.

BOGNER, C. W.; KAMDEM, R. S.; SICHTERMANN, G.; MATTHÄUS, C.; HÖLSCHER, D.; POPP, J.; SCHOUTEN, A. Bioactive secondary metabolites with multiple activities from a fungal endophyte. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 175-188, 2017.

CDM. Convenção sobre Diversidade Biológica (Artigo 2. Utilização de Termos). ONU. 1992.

CHEN, S.; LI, H.; CHEN, Y.; LI, S. *et al.* Three new diterpenes and two new sesquiterpenoids from the endophytic fungus *Trichoderma koningiopsis* A729. **Bioorg Chem**, 86, p. 368-374, May 2019.

CHIBA, S., TSUYOSHI, N., FUDOU, R., OJIKI, M., MURAKAMI, Y., OGOMA, Y., OGUCHI, M., YAMANAKA, S. Magenta pigment produced by fungus. *Journal Gen Appl Microbiol*, Aug;52(4):201-7, 2006.

DEVI, R.; KAUR, T.; GULERIA, G.; RANA, K. L. *et al.* Chapter 9 - Fungal secondary metabolites and their biotechnological applications for human health. *In: New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*: Elsevier, 2020. p. 147-161.

GUDYNAITE–SAVITCH, L., & WHITE, T.C. Fungal biotechnology for industrial enzyme production: focus on (Hemi)cellulase production strategies, advances and challenges. En M. Schomoll & C. Dateenböck (Eds.). *Gene expression systems in fungi: advancements and applications* (pp. 395-439). Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2016.

Guimarães, L.H.S., Peixoto-Nogueira, S.C., Michelin, M., Rizzatti, A.C.S., Sandrim, V.C., Zanoelo, F.F., Aquino, A.C.M.M., Junior, A. B., Polizeli, M.L.T.M. Seleção de fungos filamentosos para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Brazilian Journal Microbiol.* 37 (4), 2006.

HYDE, K. D.; XU, J.; RAPIOR, S.; JEEWON, R. *et al.* The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. **Fungal Diversity**, 97, n. 1, p. 1-136, 2019.

JANBON G, QUINTIN J, LANTERNIER F, D'ENFERT C. Studying fungal pathogens of humans and fungal infections: fungal diversity and diversity of approaches. *Genes Immun* 20: 403–414, 2019.

JACOBY, R. P.; KOPRIVOVA, A.; KOPRIVA, S. Pinpointing secondary metabolites that shape the composition and function of the plant microbiome. **J Exp Bot**, 72, n. 1, p. 57-69, Jan 20 2021.

KATZ ME, BRAUNBERGER KS, KELLY JM. Role of HxkC, a mitochondrial hexokinase-like protein, in fungal programmed cell death. *Fungal Genet Biol.* 2016 Dec;97:36-45. doi: 10.1016/j.fgb.2016.11.002. Nov 9. PMID: 27836782, 2016.

KAWAGUCHI, M., NONAKA, K., MASUMA, R. *et al.* New method for isolating antibiotic-producing fungi. *J Antibiot* 66, 17–21. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.79>, 2013.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 937-947, 2005.

KELLER, N. P. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. **Nature Reviews Microbiology**, 17, n. 3, p. 167-180, 2019.

KHALIDA, S., SHAHIDA, M., KHAN, N., NIAZI, N.K., MURTAZA, B., BIBI, I., DUMATE, C., A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. Volume 182, Part B, Pages 247-268, 2017.

KRAUSE, D. J.; KOMINEK, J.; OPULENTE, D. A.; SHEN, X. X. *et al.* Functional and evolutionary characterization of a secondary metabolite gene cluster in budding yeasts. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 115, n. 43, p. 11030-11035, Oct 23 2018.

LINO-NETO, GOMES, T., PEREIRA, J.A., T. *et al.* Bacterial disease induced changes in fungal communities of olive tree twigs depend on host genotype. *Sci Rep* 9, 5882 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42391-8>

- MCKELVEY, S.M., MURPHY, R., **Biotechnological Use of Fungal Enzymes: Biology and Applications**. In book: *Fungi* (pp.201-225), 2017.
- MEDINA, R.; FRANCO, M. E.; DA CRUZ CABRAL, L.; BAHIMA, J. V.; PATRIARCA, A.; BALATTI, P. A.; SAPARRAT, M. C. The secondary metabolites profile of *Stemphylium lycopersici*, the causal agent of tomato grey leaf spot, is complex and includes host and non-host specific toxins. **Australasian Plant Pathology**, v. 50, n. 1, p. 105-115, 2021.
- MEYER, V.; BASENKO, E. Y.; BENZ, J. P.; BRAUS, G. H. *et al.* Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper. **Fungal Biology and Biotechnology**, 7, n. 1, p. 5, 2020.
- MUKHERJEE, S., TUCKER-BURDEN, C., KAISSI, E., NEWSAM, A., DUGGIREDDY, H., CHAU, M., ZHANG, C., DIWEDI, B., RUPJI, M., SEBY, S., KOWALSKI, J., KONG, J., READ, R., BRAT, D.J. CDK5 Inhibition Resolves PKA/cAMP-Independent Activation of CREB1 Signaling in Glioma Stem Cells. *Cell Rep.* 23(6): 1651 –1664, 2018.
- NARANJO-ORTIZ, M. A.; GABALDÓN, T. Fungal evolution: cellular, genomic and metabolic complexity. **Biol Rev Camb Philos Soc**, 95, n. 5, p. 1198-1232, Oct 2020.
- NAZIR, M.; SALEEM, M.; ALI, I.; ABBAS, G.; REHMAN, N. U.; GREEN, I. R.; HUSSAIN, H. Metabólitos fúngicos como agentes antidiabéticos: Ênfase nos inibidores de PTP1B. **Avaliações de fitoquímica**, p. 1-25, 2021.
- ODOH, C.K., EZE, C.N., OBI, C., FRANCIS, A., Fungal Biofertilizers for Sustainable Agricultural Productivity. (pp.199-225), 2020.
- ORLANDELLI, R.C. , ALBERTO, R.N., RUBIN FILHO, C.J., PAMPFILE, J.A. Diversity of endophytic fungal community associated with Piper hispidum (Piperaceae) leaves. *Genetics and Molecular Research* 11 (2): 1575-1585 (2012)
- POTT, D. M.; OSORIO, S.; VALLARINO, J. G. From central to specialized metabolism: An overview of some secondary compounds derived from the primary metabolism for their role in conferring nutritional and organoleptic characteristics to fruit. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 2019.
- RANA, K. L.; KOUR, D.; SHEIKH, I.; YADAV, N. *et al.* Biodiversity of Endophytic Fungi from Diverse Niches and Their Biotechnological Applications. In: **Advances in Endophytic Fungal Research: Present Status and Future Challenges**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 105-144.
- RUSTAMOVA, N.; BOZOROV, K.; EFFERTH, T.; YILI, A. Novel secondary metabolites from endophytic fungi: synthesis and biological properties. **Phytochemistry Reviews**, v. 19, n. 2, p. 425-448, 2020.
- SILBER, J. H., ROSENBAUM, P. R., MCHUGH, M. D., LUDWIG, J. M., SMITH, H. L., NIKNAM, B. A., EVEN-SHOSHAN, O., FLEISHER, L. A., KELZ, R. R., & AIKEN, L. H. Comparison of the Value of Nursing Work Environments in Hospitals Across Different Levels of Patient Risk. *JAMA surgery*, 151(6), 527–536, 2016.
- SILVA, A. A.; POLONIO, J. C.; POLLI, A. D.; OLIVEIRA, J. A. D. S. *et al.* Metabolic extract of the endophytic fungus *Flavodon flavus* isolated from *Justicia brandegeana* in the control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in commercial orange juice. **International Journal of Food Microbiology**, 338, p. 109019, 2021.

SOLOMON, S.E., RABELING, C., SOSA-CALVO, J., LOPES, C.T., RODRIGUES, A., VASCONCELOS, H.L., JR, M.B., MUELLER, U.G., SCHULTZ, T.R. **The molecular phylogenetics of Trachymyrmex Forel ants and their fungal cultivars provide insights into the origin and coevolutionary history of 'higher-attine' ant agriculture.** *Systematic Entomology*, 44, 939–956, 2019.

SONG, Y. P.; FANG, S. T.; MIAO, F. P.; YIN, X. L. *et al.* Diterpenes and Sesquiterpenes from the Marine Algicolous Fungus *Trichoderma harzianum* X-5. **J Nat Prod**, 81, n. 11, p. 2553-2559, Nov 26 2018.

SUWANNARACH, N., KUMLA, J., NISHIZAKI, Y., SUGIMOTO, N., MEERAK, J., MATSUI, K., LUMYONG, S. Optimization and characterization of red pigment production from an endophytic fungus, *Nigrospora aurantiaca* CMU-ZY2045, and its potential source of natural dye for use in textile dyeing. *Appl Microbiol Biotechnol*, Sep;103(17):6973-6987, 2019.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** Universitat Jaume I, 2006.

TIAN, J.; FU, L.; ZHANG, Z.; DONG, X. *et al.* Dibenzo- α -pyrones from the endophytic fungus *Alternaria* sp. Samif01: isolation, structure elucidation, and their antibacterial and antioxidant activities. n. 1478-6427 (Electronic).

VENIL, C.K., VELMURUGAN, P., DUFOSSÉ, L., DEVI, P.R., RAVI, A.V., Fungal Pigments: Potential Coloring Compounds for Wide Ranging Applications in Textile Dyeing. *Journal Fungi*, 6(2), 68, 2020.

VINALE, F., SIVASITHAMPARAM, K., GHISALBERTI, E.L., WOO, S.L., NIGRO, M., MARRA, R., LOMBARDI, N., PASCALE, A., RUOCCO, M., LANZUISE, S., MANGANIELLO, G., LORITO, M. **Trichoderma Secondary Metabolites Active on Plants and Fungal Pathogens.** *The Open Mycology Journal*, 8: 127-139, 2014.

WANG, Y.; NIU, S.; LIU, S.; GUO, L.; CHE, Y. The first naturally occurring thiepinols and thienol from an endolichenic fungus *Coniochaeta* sp. **Organic letters**, v. 12, n. 21, p. 5081-5083, 2010.

WANG, P.; YU, J. H.; ZHU, K.; WANG, Y. *et al.* Phenolic bisabolane sesquiterpenoids from a Thai mangrove endophytic fungus, *Aspergillus* sp. xy02. **Fitoterapia**, 127, p. 322-327, Jun 2018.

WATSON, R. R. Index. *In: Polyphenols in Plants (Second Edition):* Academic Press, 2019. p. 421-424.

WHITTAKER, R.H. 1971. **Communities and Ecosystems** Fourth Printing. New York, The Macmillan Co.

WIJAYAWARDENE, N. N. *et al.* Outline of Fungi and fungus-like taxa. **Mycosphere**, v. 11, n. 1, p. 1060-1456, 2020.

WINK, M.; SCHIMMER, O. Molecular Modes of Action of Defensive Secondary Metabolites. *In*, 2018. p. 21-161.

WU, B.; HUSSAIN, M.; ZHANG, W.; STADLER, M. *et al.* Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. n. 2150-1203 (Print).

ZAIN UL ARIFEEN, M.; MA, Y. N.; XUE, Y. R.; LIU, C. H. Os fungos do fundo do mar podem ser o novo arsenal para moléculas bioativas. **Drogas marinhas**, v. 18, n. 1, pág. 9, 2020.

ZHAO, J. C.; LUAN, Z. L.; LIANG, J. H.; CHENG, Z. B. *et al.* Drechmerin H, a novel 1(2), 2(18)-diseco indole diterpenoid from the fungus *Drechmeria* sp. as a natural agonist of human pregnane X receptor. **Bioorg Chem**, 79, p. 250-256, Sep 2018.

ZHENG, C. J.; HUANG, G. L.; LIAO, H. X.; MEI, R. Q. *et al.* Bioactive cytosporone derivatives isolated from the mangrove-derived fungus *Dothiorella* sp. ML002. **Bioorg Chem**, 85, p. 382-385, Apr 2019.

Anfíbios como fonte não convencional de moléculas com potencial antimicrobiano

- | **Johana Becerra**
Universidade de São Paulo - USP
- | **Faride Lamadrid-Feris**
Universidad del Atlántico - UA
- | **Raul Vitor Ferreira de Oliveira**
Universidade de São Paulo - USP
- | **Jorge Arboleda-Valencia**
Universidad de Antioquia - UDEA
- | **Felipe Vásquez-Ponce**
Universidade de São Paulo - USP
- | **Gabriel Padilla**
Universidade de São Paulo - USP
- | **Nilton Lincopan**
Universidade de São Paulo - USP

RESUMO

A resistência aos antibióticos é um grave problema de saúde pública. Adicionalmente, o uso de antibióticos para tratamento de pacientes com COVID-19 aumentou a incidência de bactérias multirresistentes (MDR), agravando o problema de escassez global de antibióticos. Neste cenário, fontes não convencionais como os anfíbios têm surgido como uma nova fonte de peptídeos e probióticos. Sendo que a pele é a primeira linha de defesa contra patógenos, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) presentes nas secreções cutâneas e bactérias cutâneas produtoras de metabólitos (BPMs) fornecem compostos com potencial atividade antimicrobiana. Esta revisão apresenta o potencial dos PAMs e dos BPMs contra bactérias patogênicas de interesse clínico, assim como sua atividade sinérgica em combinação com os antibióticos comercialmente disponíveis. Evidências elucidaram que os PAMs apresentam atividade antimicrobiana contra isolados clínicos, porém são limitados na sua aplicação farmacológica devido à toxicidade. Por outro lado, os BPMs têm se mostrado promissores na inibição de patógenos, entretanto seu espectro de ação é reduzido. O estudo de anfíbios demonstra ser promissor na busca de novos antibióticos, assim como também para potencializar o efeito terapêutico dos antibióticos disponíveis. Estes fatos são relevantes no Brasil, o país com maior diversidade de anfíbios no mundo.

Palavras-chave: Atividade Antimicrobiana, Secreções Dérmicas, Microbiota Cutânea, Probióticos, Anfíbios.

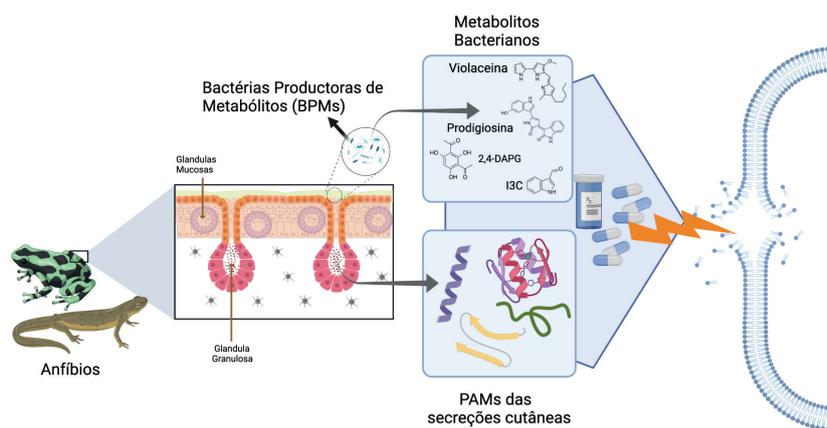
■ INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos é um grave problema de saúde pública (CDC, 2019). Devido ao aumento de patógenos multirresistentes (MDR), a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou em 2017 uma lista de patógenos de prioridade global de acordo com a urgência de novos antibióticos, classificados como: crítica, alta e média (**SS1**). Adicionalmente, o uso de antibióticos para tratamento de pacientes com COVID-19 aumentou o surgimento de resistência, diminuindo as opções terapêuticas disponíveis (LAI *et al.*, 2021; LUCIEN *et al.*, 2021).

Enfrentar a crise de resistência requer da pesquisa de compostos com novos mecanismos de ação, capazes de inibir patógenos para os quais os antibióticos se tornaram ineficazes, e de moléculas capazes de potencializar o efeito terapêutico dos antibióticos disponíveis (WANG *et al.*, 2020). Neste sentido, a busca de novos antimicrobianos está sendo direcionada a fontes pouco exploradas, que geralmente fornecem moléculas com estruturas complexas, importantes para o reconhecimento específico por alvos de bactérias patogênicas (COATES *et al.*, 2020).

Fontes naturais com interações ecológicas complexas como os anfíbios podem resultar na descoberta de compostos quimicamente diversos e biologicamente ativos (MARTIN *et al.*, 2020). Os anfíbios possuem uma pele mucosa que produz centos de moléculas úteis na luta contra patógenos. Como parte dos seus mecanismos de defesa inata produzem secreções dérmicas, ricas em alcaloides e peptídeos antimicrobianos (PAMs), e como mecanismos de defesa adquirida possuem barreiras biológicas como bactérias cutâneas produtoras de metabólitos (BPMs) com atividade inibitória (BARROS *et al.*, 2021; (FLECHAS; ACOSTA-GONZÁLEZ; ESCOBAR; KUENEMAN *et al.*, 2019; WOODHAMS *et al.*, 2020).

Desde que os anfíbios são afetados pelos fungos *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) e *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*), aumentaram os esforços para conhecer a contribuição destas defesas químicas contra patógenos. A partir disto foram descritas moléculas que além de apresentar função anti-*Bd* e anti-*Bsal* também inibem patógenos de importância clínica. Esta revisão apresenta o potencial dos PAMs e dos BPMs contra bactérias patogênicas de interesse clínico, assim como sua atividade sinérgica em combinação com os antibióticos comercialmente disponíveis.



■ PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE ANFÍBIOS

A natureza oferece múltiplas fontes de compostos com potencial biotecnológico como: antibióticos, analgésicos, imunomoduladores, inibidores enzimáticos e agentes antitumorais (SPINELLI *et al.*, 2020). Dentro destes, os PAMs dos anfíbios são considerados um recurso importante para o desenvolvimento destas moléculas. Estes peptídeos são produzidos nas glândulas granulares (venenosas e serosas) e mucosas, que atuam como uma primeira linha de defesa contra patógenos como *Bd* e *Basal* (BARROS *et al.*, 2021).

Em termos gerais, os PAMs podem ser definidos como biomoléculas formadas pela ligação de dois ou mais aminoácidos unidos por meios de ligações peptídicas (XU *et al.*, 2015). Em anfíbios já foram descritos mais de mil PAMs, observando-se que cada espécie tem sua própria assinatura de peptídeos com espectro de ação diferente (LADRAN e NICOLAS, 2016; MOOKHERJEE *et al.*, 2020). O principal mecanismo de ação é a ruptura da membrana fosfolipídica, que mata patógenos MDR antes de que elas possam desenvolver resistência (CASCIARO *et al.*, 2017; SCHMIDTCHEN *et al.*, 2014).

Sendo uma fonte promissora de antibióticos naturais, a produção de peptídeos antimicrobianos faz parte do sistema imune inato, e exercem funções de extrema importância para a sobrevivência, atuando em sinergia com a microbiota, o protegendo a um custo metabólico mínimo (FLECHAS *et al.*, 2019). Muitas espécies de rãs têm um ciclo de vida bifásico, na qual os girinos residem em um ambiente aquático seguido por uma transição pós-metamorfose para um ambiente terrestre. A exposição a ambos ambientes pode ter exigido a evolução de um amplo arsenal de defesa antimicrobiana em sua secreção cutânea (VARGA *et al.*, 2019).

Foi reportado que o PAM japonicin-2LF, isolado da secreção da rã *Limnonectes fujianensis* (**Figura 1. A**), inibiu *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) com Concentração Mínima Inibitória (CIM) e Concentração Mínima de Erradicação de Biofilme (CMEB) de 4 µg/mL. Adicionalmente, ao ser injetada em larvas de *Galleria mellonella* diminuiu em 50% a mortalidade de larvas infectadas com MRSA (YUAN *et al.*, 2019). Da mesma forma,

o peptídeo CPF-B1 obtido de *Xenopus borealis* (**Figura 1. B**) demonstrou atividade contra isolados de MRSA e *Acinetobacter baumannii* multirresistente (MDRAB) (MECHKARSKA *et al.*, 2010), e peptídeos de *Agalychnis callidryas* (**Figura 1. C**) inibindo a formação de biofilme de *S. aureus* (GONG *et al.*, 2020).

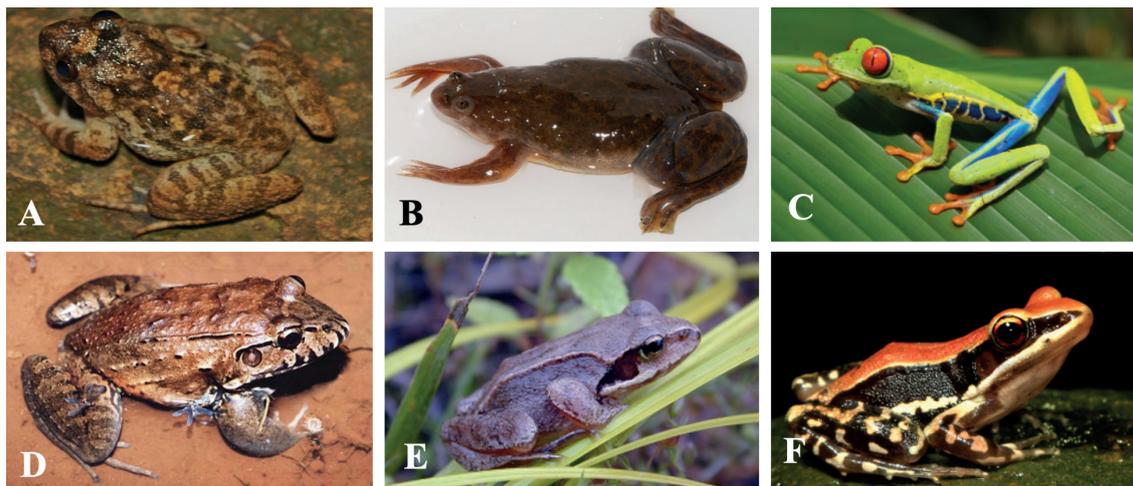
No entanto, o potencial terapêutico desses peptídeos é limitado devido a sua baixa seletividade que pode ocasionar citotoxicidade e hemólises em células eucarióticas, prejudicando sua possível aplicação farmacológica sistêmica (VERLY *et al.*, 2008). Um exemplo são os peptídeos de ocelatina, obtidos da rã *Leptodactylus labyrinthicus* (**Figura 1. D**). Estes apresentam atividade contra bactérias e fungos, mas também atividade hemolítica e citotoxicidade em células humanas. Adicionalmente, verificou-se que embora os peptídeos isolados tivessem alta homologia entre si, seus espectros de atividade antimicrobiana e atividade hemolítica diferiam, estando a maior atividade antimicrobiana diretamente relacionada a sua capacidade disruptiva de membrana (GUSMÃO *et al.*, 2017).

Apesar desses reveses, devido à falta de alternativas terapêuticas para combater o crescente problema de resistência, o uso de PAMs é considerado uma nova fonte de fármacos para tratamento de infecções por organismos multirresistentes (GUSMÃO *et al.*, 2017). Dessa forma, as pesquisas estão sendo direcionadas para desenvolver metodologias que permitam diminuir os problemas relativos à sua toxicidade em células eucarióticas.

Uma alternativa para diminuir os efeitos anteriormente mencionados é o uso dos PAMs em combinação com os antibióticos convencionais. Desta forma reduz as concentrações ativas individuais (antibióticos e peptídeos), diminuindo também os efeitos indesejáveis. Adicionalmente, podem apresentar efeito sinérgico no tratamento de infecções, e retardar o surgimento da resistência (CASCIARO *et al.*, 2017).

Combinações testadas com sucesso para inibição de MRSA foram baseadas nos AMPs da *Rana chensinensis* (**Figura 1. E**), e antibióticos como: penicilina, ampicilina e eritromicina. As CIMs foram reduzidas em 16 vezes para eritromicina e 32 vezes para penicilina (SHANG *et al.*, 2019). Para *Pseudomonas aeruginosa* e *Vibrio vulnificus* os peptídeos de *Hydrophylax bahuvistara* (**Figura 1. F**), em combinação com canamicina, tetraciclina e ciprofloxacina mostraram interação sinérgica reduzindo de 4 a 25 vezes as CIMs (LEKSHMIPRIYA *et al.*, 2021).

Figura 1. Anfíbios produtores de peptídeos antimicrobianos. (A) *Limnonectes fujianensis*; (B) *Xenopus borealis*; (C) *Agalychnis callidryas*; (D) *Leptodactylus labyrinthicus*; (E) *Rana chensinensis*; (F) *Hydrophylax bahuvistara*.



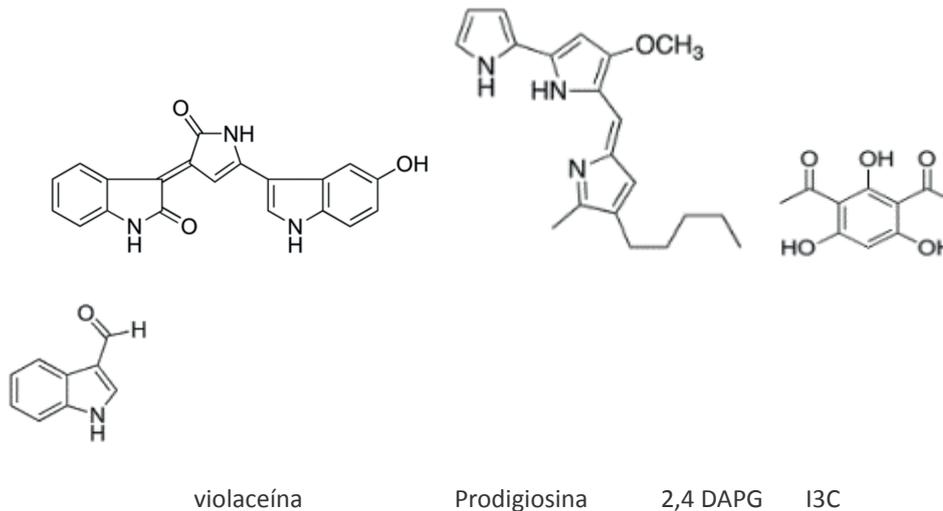
Fonte: Wikimedia Commons.

■ METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DAS BACTÉRIAS CUTÂNEAS

As bactérias presentes na pele de anfíbios produzem uma ampla gama de metabólitos envolvidos na defesa contra predadores e patógenos como os fungos *Bd* e *Bsal* (MARTIN *et al.*, 2020; WOODHAMS *et al.*, 2018). Conseqüentemente, com a relevância ecológica destes patógenos a procura de moléculas capazes de controlá-los tem sido o maior foco das pesquisas.

No entanto, estudos recentes demonstram que os metabólitos das bactérias cutâneas dos anfíbios inibem bactérias clinicamente relevantes como bactéria produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (CTX-M) e/ou produtoras de carbapenemases (KPC-2, OXA-23, NDM-1) (BECERRA *et al.*, 2021). Até a data, somente quatro compostos com atividade antimicrobiana foram descritos: (A) violaceína; (B) prodigiosina (C) (2,4 DAPG); (D) Indol-3-carboxaldeído (I3C) (Figura 2).

Figura 2. Principais compostos com atividade anti-*Bd* e anti-*Bsal* com potencial antimicrobiano.



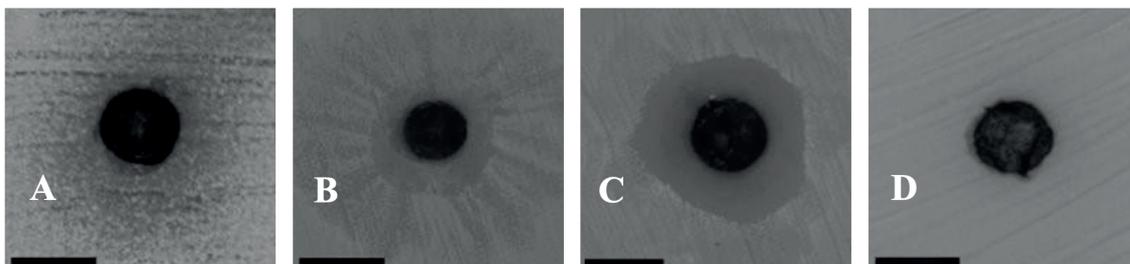
Fonte: Woodhams *et al.*, 2018.

Violaceína

A violaceína (VIO) (**Figura 2**) é um pigmento de cor púrpura, produzido principalmente por bactérias ambientais dos gêneros *Chromobacterium* spp., *Alteromonas* spp., *Duganella* spp., e *Janthinobacterium* spp. (DURÁN *et al.*, 2021). Estas bactérias podem ser isoladas de mar profundo, rios, solos, glaciares, pele de anfíbios, entre outros. Estudos relatam o potencial farmacológico da violaceína como molécula antimicrobiana, antitumoral, tripanocida, antileishmania, imunomoduladora, antiviral, antinematóide e antiulcerogênica (DURÁN *et al.*, 2021; WOODHAMS *et al.*, 2018).

Uma das aplicações mais promissórias atribuídas à violaceína reside no seu potencial para inibir patógenos (**Figura 3**). O principal mecanismo de ação associado a esta atividade é a disrupção da bicamada lipídica (CAUZ *et al.*, 2019). Estudos mostram a atividade da violaceína contra bactérias Gram-positivas como *Bacillus subtilis* e MRSA (CAUZ *et al.*, 2019), e contra Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae* e *Salmonella typhi*, entre outros (BARICZ *et al.*, 2018; SUBRAMANIAM *et al.*, 2014).

Figura 3. Inibição de violaceína produzida por *Janthinobacterium lividum* contra *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina. (A, B) Efeito bacteriostático; (C) Efeito bactericida; (D) Controle. Barra preta=6mm.



Fonte: Baricz *et al.*, (2018).

A VIO apresenta efeito sinérgico quando usada conjuntamente com antibióticos. No estudo de Subramaniam *et al.*, (2014), foi calculado índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) para violaceína em combinação com antibióticos (**Tabela 1**). Este índice classifica o tipo de interação dos antimicrobianos, quando o valor é menor a 0,5 a interação é considerada sinérgica, entre 0,5–1,0 aditivo, entre 1,0–2,0 não interação, e superior a 2,0 antagônica. O valor é calculado baseado na CIM. Por exemplo, para *S. aureus* o valor do ICIF da combinação VIO + GEN pode ser calculado como: [CIM de VIO em combinação (1,0) /CIM da VIO sozinha (5,7)] + [CIM de GEN em combinação (1,0) /CIM de GEN sozinha (4,0)] = 0,4.

Tabela 1. Concentração Mínima Inibitória (CIM) da violaceína e em combinação com antibióticos contra bactérias patogênicas.

AG (µg/ml)	<i>P. aeruginosa</i>				<i>K. pneumoniae</i>				<i>S. aureus</i>			
	I ^b	C	F	R	I	C	F	R	I	C	F	R
VIO	31,7	-	-	-	15,6	-	-	-	5,7	-	-	-
VAN	15,0	11,7	1,3	N	10,4	8,9	1,2	N	8,0	4,4	0,5	S
ERT	20,0	12,5	1,0	A	15,6	7,4	0,4	S	5,0	3,8	1,0	A
TET	16,0	8,8	0,5	S	46,7	13,3	0,5	S	8,0	4,4	0,6	A
GEN	2,5	2,0	0,9	A	3,0	2,0	0,7	A	4,0	1,0	0,4	S
CIP	1,5	0,5	0,4	S	2,0	1,0	0,5	S	3,5	2,0	0,9	A
OTC	12,0	4,0	0,5	S	34,0	10,0	1,0	A	8,0	1,8	0,5	S
CLO	6,2	5,0	1,0	A	3,9	1,8	0,5	S	16	4,0	0,9	A
KAN	64,0	14,0	1,0	A	16,0	8,0	1,0	A	2,0	0,8	0,5	S
POL	4,0	1,5	0,4	S	2,0	1,0	0,5	S	32,0	8,0	1,6	N

aAgentes (AG): VIO: violaceína; VAN: vancomicina; ERT: eritromicina; TET: tetraciclina; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacina; OTC: oxitetraciclina; CLO: cloranfenicol; KAN: canamicina; PMB: polimixina B. bl: individual; C: combinação violaceína + antibiótico (1:1); F: Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF): <0,5 (sinergia); 0,5–1,0 (aditivo), 1,0–2,0 (não interação) e >2,0 (antagonismo); R: resultados (N: não interação, S: sinergia, A: aditivo).

Modificado de Subramaniam *et al.*, (2014).

Neste estudo, a VIO em combinação com os antibióticos em proporção de 1 a 1 apresentou sinergismo nas classes tetraciclina, macrolídeos e aminoglicosídeos. A combinação de VIO + TET foi eficiente contra todos patógenos, com um ICIF de $\cong 0,5$. As combinações CIP + VIO e POL + VIO apresentaram sinergismo contra as bactérias Gram-negativas *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. Por sua parte, as combinações de VIO + VAN, VIO + GEN, VIO + OTC e VIO + KAN agiram sinergicamente contra o Gram-positivo *S. aureus* (tabela 2) (SUBRAMANIAM *et al.*, 2014).

As bactérias patogênicas podem aumentar sua resistência aos antibióticos quando estabelecem a formação de biofilme. Estudos de Dodou *et al.*, (2020), mostram que a VIO inibe a formação de biofilme em *S. epidermidis* nas concentrações de 20 µg.mL⁻¹ de concentração inibitória mínima em biofilme (CIMB), e 160 µg.mL⁻¹ de concentração mínima de erradicação de biofilme (CMEB). Ao avaliar o efeito modulador da VIO sobre a ação de antibióticos como vancomicina, cefepime, ciprofloxacina e meropenem, observou-se sinergismo, especialmente na associação VIO-CIP, que erradicou completamente o biofilme.

Prodigiosina

A prodigiosina (PG) (**Figura 2**) é um pigmento vermelho derivado principalmente do metabolismo da bactéria Gram-negativa *Serratia marcescens*, e em menor grau produzida por bactérias do gênero *Janthinobacterium* spp., *Streptomyces* spp., *Vibrio* spp., e *Pseudoalteromonas* spp. (CHOI *et al.*, 2021; WOODHAMS *et al.*, 2017). Estas podem ser isoladas de água de mar, água doce, pele de anfíbio e de ambientes terrestres. Diversas atividades biológicas têm sido descritas como função antimicrobiana, antitumoral, antimalárica, algicida, inseticida e imunossupressora, com potencial aplicação na clínica, meio ambiente, alimentos, entre outros (CHOI *et al.*, 2021).

Um dos mecanismos de ação para sua atividade é a ruptura da membrana lipídica, como foi descrito para a VIO. No entanto, estudos de Darshan e Manonmani (2016) descrevem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que interagem com o DNA, clivando a fita dupla. Estudos de Feng *et al.*, (2015), demonstram a atividade inibitória de PG contra *B. burgdorferi* resistente à amoxicilina, diminuindo a CIM para $< 0,2 \mu\text{g/mL}$.

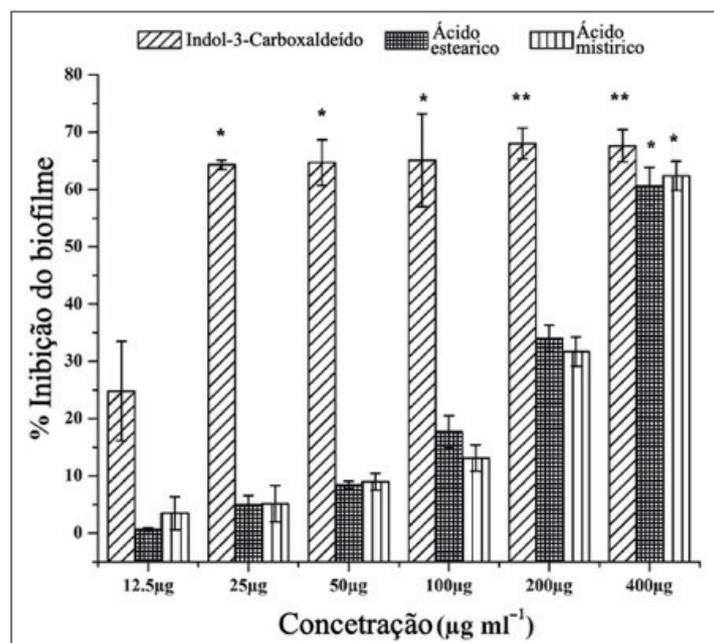
No trabalho de Gohil *et al.*, (2020), foi calculado o Índice de Concentração Bactericida Fracionada (IFBC), o qual está baseado nos valores da Concentração Bactericida Mínima (CBM). A partir destes, foi observado que a combinação de PRO com os antibióticos comerciais ampicilina, cloranfenicol, canamicina, tetraciclina e ácido nalidíxico mostraram sinergia para inibir *S. aureus*, com um valor de IFBC $\leq 0,25$, e para *Pseudomonas aeruginosa* somente houve sinergia nas combinações PRO + cloranfenicol e PRO + ácido nalidíxico.

Indol-3-Carboxaldeído

O Indol-3-Carboxaldeído (I3CA) (**Figura 2**) pertence a uma classe de compostos naturais bioativos encontrados em plantas, bactérias e fungos. Suas complexas estruturas têm sido atribuídas a potentes atividades como: antimicrobiana, anticancerígena, anti-inflamatória, antimalárica (EL-SAWY *et al.*, 2018; FU *et al.*, 2015). Este composto é produzido por bactérias como *Janthinobacterium* spp., simbiote da salamandra *Plethodon cinereus* (BRUCKER *et al.*, 2008), *Marinomonas* spp., presente em ambientes marinhos (RAJALAXMI *et al.*, 2016), e *Chromobacterium violaceum* (DAVIS *et al.*, 1976).

Em experimentos *in-vitro* verificou-se que o I3C atua reduzindo a formação de biofilme e a expressão do fator de virulência, precisando de concentrações ainda mais baixas do que os ácidos mirístico e esteárico utilizando como controle (**Figura 4**) (RAJALAXMI *et al.*, 2016). Da mesma forma, derivados do indol apresentam atividade inibitória contra MRSA e *Escherichia coli* (SHIRINZADEH *et al.*, 2011).

Figura 4. Efeito do indol-3-carboxaldeído e de ácido esteárico, ácido mistirico na inibição (%) de biofilme de *Vibrio cholerae*. *Significância estatística de $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação aos controles.



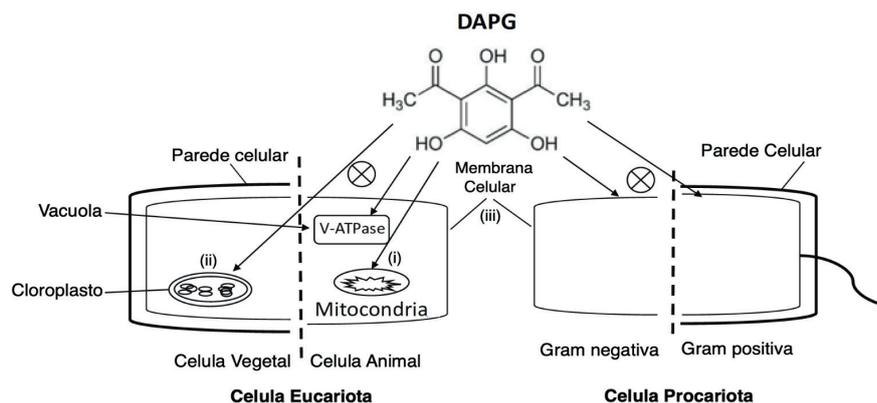
Fonte: Rajalaxmi et al., 2016.

2,4-diaetilfloroglucinol

O 2,4-diaetilfloroglucinol (2,4 DAPG) (**Figura 2**), possui uma estrutura única com grupos acil, alquil e hidroxil que o permite interagir múltiplos alvos tanto de células eucarióticas como procarióticas. Inicialmente foi descrito como um metabólito produzido por bactérias rizosféricas, como *Pseudomonas* spp., (KANKARIYA et al., 2019). Também foi encontrado em *Staphylococcus* spp., e *Microbacterium* spp., isoladas dos anfíbios *Craugastor fitzingeri* e *Ranamuscosa*, com função anti-*Bd* e anti-*Bsal* (MYERS et al., 2012; BRUCKER et al., 2008; REBOLLAR et al., 2018). Para este composto tem sido descritas atividades de interesse biotecnológico e farmacológico como: antimicrobiana, anti-helmínticas, antiviral, antiparasitária e anticancerígena (KANKARIYA et al., 2019).

Uma das suas características promissórias é a inibição de patógenos MDR como MRSA (MITTAL et al., 2019), e de vírus como o SARS-CoV-2 (KANKARIYA et al., 2022). O mecanismo de ação antimicrobiana desse metabólito inclui a inibição e disfunção em três pontos chave na função celular (**Figura 5**), é apontado para: (i) disfunções mitocondriais, nas quais interrompe o potencial de membrana, altera a homeostase celular e libera oxigênio reativo em *Saccharomyces cerevisiae*, (ii) inibe a fotossíntese no cloroplasto, e (iii) altera a integridade da membrana celular bacteriana (KANKARIYA et al., 2019; RAJALAXMI et al., 2016).

Figura 5. Mecanismos de ação do DAPG em células eucariotas e células procariotas.



Fonte: Kankariya et al., (2019).

■ PERSPECTIVAS

Estudos que têm usado os anfíbios como fonte não convencional de moléculas com potencial antimicrobiano mostram que os compostos produzidos nas peles dos anuros são uma rica fonte de princípios ativos com potencial aplicação clínica e no desenho de produtos de inovação biotecnológica. Atualmente, com o advento das ômicas e com novas ferramentas de sequenciamento e análises de dados *in silico*, será cada vez mais eficiente a pesquisa de novas moléculas a partir de fontes naturais.

Para possibilitar o contínuo acesso ao potencial biotecnológico das moléculas produzidas nas peles dos anfíbios devemos adotar estratégias que contribuam para a conservação da rica biodiversidade desses organismos. Essas iniciativas requerem um trabalho colaborativo que envolva perspectivas econômicas, científicas, tecnológicas, políticas, ambientais e sociais que além de preservar, promovam o aproveitamento dessa riqueza.

Apesar de promissoras, tanto os PAMs, quanto os BPMs apresentam algumas limitações inerentes do seu mecanismo de ação sobre células eucariotas que impedem sua rápida implementação como produtos antimicrobianos. Considerando isso, se faz importante não apenas descobrir novas moléculas, mas também garantir que seu mecanismo de ação seja seletivo e não tóxico. Inovações dos últimos anos como sistema de liberação controlada com direcionamento para alvos específicos podem ser um caminho para garantir que as biomoléculas descobertas a partir dos anfíbios atuem em alvos celulares específicos dos patógenos, a nível sistêmico, reduzindo sua toxicidade. Por outro lado, existem outras limitações relacionadas a concentração plasmática máxima atingida por alguns peptídeos as quais muitas vezes são menores que a concentração inibitória mínima CIM, porém este fator não se aplica para uso tópico onde teriam um maior potencial de aplicação. O custo da obtenção e purificação dos peptídeos também pode inviabilizar a aplicação sistêmica que muitas vezes requer uso prolongado em altas concentrações.

Com relação aos probióticos existe um enorme potencial pela biodiversidade microbiana pouco estudada. Embora estes probióticos estejam associados com produção de bacteriocinas de espectro restrito, o uso de um cocktail de probióticos poderia aumentar o espectro de atividade. Especificamente na hora de obter as bacteriocinas deve ser considerada a solubilidade dos composto como um fator limitante.

Finalmente, a atividade sinérgica de antibióticos disponíveis comercialmente em combinação com os PAMs demonstraram ser alternativas terapêuticas contra patógenos MDR. Esta terapia combinada permite reduzir a dose dos antibióticos enquanto mantém as atividades terapêuticas, o que é útil para retardar o aparecimento de novas resistências. No contexto atual, a terapia combinatória poderá ser a base da próxima geração de antibióticos no combate para patógenos resistentes.

MATERIAL SUPLEMENTAR

SS1. Lista de agentes patogênicos prioritários da OMS para a Pesquisa e Desenvolvimento (P & D) de novos antibióticos.

Prioridade 1: Crítica#

Acinetobacter baumannii, resistente a carbapenema
Pseudomonas aeruginosa, resistente a carbapenema
*Enterobacteriaceae**, resistente a carbapenema, produtoras de ESBL

Prioridade 2: Alta

Enterococcus faecium, resistente à vancomicina
Staphylococcus aureus, resistente à meticilina, com sensibilidade intermediária à vancomicina
Helicobacter pylori, resistente à claritromicina
Campylobacter spp., resistente às fluoroquinolonas
Salmonella spp., resistentes às fluoroquinolonas
Neisseria gonorrhoeae, resistente às cefalosporina, resistente às fluoroquinolonas

Prioridade 3: Média

Streptococcus pneumoniae, sem sensibilidade à penicilina
Haemophilus influenzae, resistente à ampicilina
Shigella spp., resistente às fluoroquinolonas

#*Mycobacteria* (incluindo *Mycobacterium tuberculosis*).

**Enterobacteriaceae*: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp, e *Morganella* spp.

■ REFERÊNCIAS

BARICZ, A.; TEBAN, A.; CHIRIAC, C. *et al.* Investigating the potential use of an Antarctic variant of *Janthinobacterium lividum* for tackling antimicrobial resistance in a One Health approach. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018. doi.org/10.1038/s41598-018-33691-6.

BARROS, A. L. A. N.; HAMED, A.; MARANI, M.; MOREIRA, D.C.; EATON, P.; PLÁCIDO, A.; KATO, M.J.; LEITE, J.R.S.A. The Arsenal of Bioactive Molecules in the Skin Secretion of Urodele Amphibians. *Frontiers in Pharmacology*, v. 12, 2022. . doi:10.3389/fphar.2021.810821.

BECERRA, J.; LAMADRID-FERIS, F.; GOMES, F. *et al.* Inhibition of WHO critical priority multidrug-resistant pathogens by cutaneous bacteria of *Phyllomedusa distincta* (Anura: Phyllomedusidae). 31º Congresso Brasileiro de Microbiologia – CBM 2021.

BRUCKER, R.; HARRIS, R.; SCHWANTES, L. *et al.* Amphibian chemical defense: antifungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the salamander *Plethodon cinereus*. *Journal of Chemical Ecology* v. 34, n. 11, p. 1422–1429. 2008. doi:10.1007/s10886-008-9555-7.

CASCIARO, B.; CAPPIELLO, F.; CACCIAFESTA, M. *et al.* Promising Approaches to Optimize the Biological Properties of the Antimicrobial Peptide Esculentin-1a(1-21)NH₂: Amino Acids Substitution and Conjugation to Nanoparticles. *Front Chem*, v. 25, n. 5. doi: 10.3389/fchem.2017.00026.

CAUZ, A.; CARRETERO, G.; SARAIVA, G. Violacein targets the cytoplasmic membrane of bacteria. *ACS Infect Dis*, v. 5, n. 4, p. 539-549, 2019. doi:10.1021/acsinfectdis.8b00245.

CDC. Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019.

COATES, A.; HU, Y.; HOLT, J. *et al.* Antibiotic combination therapy against resistant bacterial infections: synergy, rejuvenation and resistance reduction. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 0, n. 0, p. 1, 2020. doi.org/10.1080/14787210.2020.1705155.

EL-SAWY, E. R.; ABDELWAHAB, A. B.; KIRSCH, G. Utilization of 1H-Indole-3-carboxaldehyde as a Precursor for the Synthesis of Bioactive Indole Alkaloids. *Synthesis*, v. 50, n. 23, p. 4525–4538, 2018. doi:10.1055/s-0037-1610288.

FENG J, SHI W, ZHANG S, ZHANG Y. *et al.* Identification of new compounds with high activity against stationary phase *Borrelia burgdorferi* from the NCI compound collection. *Emerg Microbes Infect.* v. 4, n. 1, 2015. doi:10.1038/emi.2015.31.

FLECHAS, S. V.; ACOSTA-GONZÁLEZ, A.; ESCOBAR, L. *et al.* Microbiota and skin defense peptides may facilitate coexistence of two sympatric Andean frog species with a lethal pathogen. *The ISME Journal*, v. 13, n. 2, p. 361–373, 2019. doi.org/10.1038/s41396-018-0284-9.

FU, S. F. WEI, J.Y.; CHEN, H.W. *et al.* Indole-3-acetic acid: A widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. *Plant Signaling & Behavior*, v. 10, n. 8, 2015. doi: 10.1080/15592324.2015.1048052.

GOHIL N, BHATTACHARJEE G, SINGH V. *et al.* Synergistic bactericidal profiling of prodigiosin extracted from *Serratia marcescens* in combination with antibiotics against pathogenic bacteria. *Microb Pathog.* v. 149. n. 104508, 2020. doi:10.1016/j.micpath.2020.104508.

GONG, Z.; PEI, X.; REN, S. *et al.* Identification and Rational Design of a Novel Antibacterial Peptide Dermaseptin-AC from the Skin Secretion of the Red-Eyed Tree Frog *Agalychnis callidryas*. *Antibiotics*, v. 9, n.5, p. 243. 2020. doi:10.3390/antibiotics9050243

GUSMÃO, K.; DOS SANTOS, D.; SANTOS, V. *et al.* Ocellatin peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus labyrinthicus* (Leptodactylidae): characterization, antimicrobial activities and membrane interactions. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseasees*, v. 3, n. 1, 2017. doi:10.1186/s40409-017-0094-y.

KANKARIYA, R. A.; CHAUDHARI, A. B.; DANDI, N. D. *et al.* Inhibitory efficacy of 2, 4-diacetylphloroglucinol against SARS-COV-2 proteins: *in silico* study. *Biologia*, v. 77, n. 3, p. 815–828, 2022. doi:10.1007/s11756-021-00979-4.

- LADRAM, A.; NICOLAS, P. Antimicrobial peptides from frog skin: biodiversity and therapeutic promises. *Frontiers in Bioscience-Landmark*. 2016. 21(7); 1341-1371.
- LAI, C. CHEN, S.; KO, W. *et al.* Increased antimicrobial resistance during the COVID-19 pandemic, *International journal of antimicrobial agents*, v. 57, n. 4, 2021. doi:10.1016/j.ijantimicag.2021.106324.
- LEKHMIPRIYA, P.; VINEETHKUMAR, T.; JOSEPH. *et al.* Synergistic Effect of Frog Skin Antimicrobial Peptides in Combination with Antibiotics Against Multi host Gram-Negative Pathogens. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. v. 27, n. 1, p. 1529-1540, 2021. doi.org/10.1007/s10989-021-10189-w.
- LUCIEN M.; CANARIE, M.; KILGORE, P. *et al.* Antibiotics and antimicrobial resistance in the COVID-19 era: Perspective from resource-limited settings. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 104, n. 52, p. 250–254, 2021. doi.org/10.1016/j.ijid.2020.12.087 1201-9712.
- MARTIN, C.; IBAÑEZ, R.; NOTHIAS, L. *et al.* Viscosin-like lipopeptides from frog skin bacteria inhibit *Aspergillus fumigatus* and *Batrachochytrium dendrobatidis* detected by imaging mass spectrometry and molecular networking. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019. doi:10.1038/s41598-019-39583-7.
- MECHKARSKA, M.; AHMED, E.; COQUET, L. *et al.* Antimicrobial peptides with therapeutic potential from skin secretions of the Marsabit clawed frog *Xenopus borealis* (Pipidae). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. v. 152, n. 4, p. 467-472, 2010. doi:10.1016/j.cbpc.2010.07.007.
- MOOKHERJEE, N.; ANDERSON, M.; HAAGSMAN, H. *et al.* Antimicrobial host defense peptides: functions and clinical potential. *Nat Rev Drug Discov*, v. 19, n. 5, p. 311-332, 2020. doi: 10.1038/s41573-019-0058-8.
- MYERS, J.; RAMSEY, J.; BLACKMAN, A. *et al.* Synergistic Inhibition of the Lethal Fungal Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*: The Combined Effect of Symbiotic Bacterial Metabolites and Antimicrobial Peptides of the Frog *Rana muscosa*. *Journal of Chemical Ecology*, v. 38, n. 8, p. 958–965, 2012. doi:10.1007/s10886-012-0170-2.
- OMS, 2017. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Disponível em: https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf
- RAJALAXMI, M. BEEMA, R.; LYER, P. *et al.* An in silico, *in vitro* and *in vivo* investigation of indole-3-carboxaldehyde identified from the seawater bacterium *Marinomonas* sp. as an anti-biofilm agent against *Vibrio cholerae* O1. *Biofouling*, v. 32, n. 4, p. 439–450, 2016. doi:10.1080/08927014.2016.1154545.
- REBOLLAR, E.; GUTIERREZ-PRECIADO, A.; NOECKER, C. *et al.* The Skin Microbiome of the Neotropical Frog *Craugastor fitzingeri*: Inferring Potential Bacterial-Host-Pathogen Interactions From Metagenomic Data. *Frontiers in Microbiology*, v. 0, n. MAR, p. 466, 2018.
- SCHMIDTCHEN, A.; PASUPULETI, M.; MALMSTEN, M. *et al.* Effect of hydrophobic modifications in antimicrobial peptides. *Adv Colloid Interface Sci*, v. 205, n. 1, p. 265-274, 2014. doi:10.1016/j.cis.2013.06.009.

SHANG, D.; LIU, Y.; JIANG, F. *et al.* Synergistic Antibacterial Activity of Designed Trp-Containing Antibacterial Peptides in Combination with Antibiotics Against Multidrug-Resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Front Microbiol.* v. 10, n. 1, 2719, 2019. doi:10.3389/fmicb.2019.0271.

SHIRINZADEH, H.; SHIRINZADEH, H.; ALTANLAR, N.; *et al.* Antimicrobial evaluation of indole-containing hydrazone derivatives. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, v. 66 C, n. 7–8, p. 340–344, 2011. doi:10.1515/znc-2011-7-804.

SPINELLI, R.; BARRERO-GUEVARA, L.; LÓPEZ, J. *et al.* Cytotoxic and antiproliferative activities of amphibian (anuran) skin extracts on human acute monocytic leukemia cells. *Toxicon*, v. 177, p. 25–34, 2020. doi:10.1016/j.toxicon.2020.01.008.

SUBRAMANIAM, S.; RAVI, V.; SIVASUBRAMANIAN, A. *et al.* Synergistic antimicrobial profiling of violacein with commercial antibiotics against pathogenic microorganisms. *Pharmaceutical biology*, v. 52, n. 1, p. 86-90, 2014. doi.org/10.3109/13880209.2013.815634.

VARGA, J.; BUI-MARINOS, M & KATZENBACK, B. *et al.* Frog Skin Innate Immune Defenses: Sensing and Surviving Pathogens. *Frontiers in immunology*, v. 9, n. 1, p. 3128, 2019. doi.org/10.3389/fimmu.2018.03128.

VERLY, R.; RODRIGUES, M.; DAGHASTANLI, K. *et al.* Effect of cholesterol on the interaction of the amphibian antimicrobial peptide DD K with liposomes. *Peptides*, v. 29, n. 1, p. 15-24, 2008. doi:10.1016/j.peptides.2007.10.028.

YUAN Y, ZAI Y, XI X, *et al.* A novel membrane-disruptive antimicrobial peptide from frog skin secretion against cystic fibrosis isolates and evaluation of anti-MRSA effect using *Galleria mellonella* model. *Biochimica biophysica acta*. v. 1863 n. 5, p. 849-856, 2019. doi:10.1016/j.bbagen.2019.02.013.

WANG, C.; HSIEH, Y.; POWERS, Z.; KAO, C. *et al.* Defeating Antibiotic-Resistant Bacteria: Exploring Alternative Therapies for a Post-Antibiotic Era. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 3, p. 2020, doi:10.3390/ijms21031061.

WOODHAMS, D.; BLETZ, M.; BECKER, C. *et al.* Host-associated microbiomes are predicted by immune system complexity and climate. *Genome biology*, v. 21, n. 1, p. 1–20, 2020. doi:10.1186/s13059-019-1908-8.

Estabilidade e composição bromatológica da silagem de milho produzida com actinobactéria

| **Andréa Krystina Vinente Guimarães**

Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA

| **Eloinny Karina Figueira Castro**

Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA

| **Silvia Katrine Rabelo da Silva**

Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA

| **Sara Freitas de Sousa Ramos**

Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA

| **José Jeosafá de Sousa Júnior**

Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA

| **Andressa Costa Santana**

Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA

RESUMO

Objetivou-se avaliar a silagem de milho com diferentes inoculantes bacterianos, utilizando-se cepas de bactérias isoladas de silagem de sorgo. Para isso, a silagem foi armazenada em silos laboratoriais de PVC com adicionados de inoculante e água peptonada estéril. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições. Após 33 dias de fermentação, procedeu-se a análise sensorial e em seguida foram retiradas as amostras para a análise do nitrogênio amoniacal (N-NH₃), pH, MS e PMS (perda total de matéria seca), e avaliações químico-bromatológicas. Para o ensaio da estabilidade aeróbica foi coletada uma amostra composta de cada tratamento e acondicionada em baldes de poli-propileno. As temperaturas da sala foram monitoradas duas vezes ao dia (8:00 h e 18:30 h), durante sete dias. As avaliações sensoriais apresentaram classificação “Boa a Muito Boa” e resultados sanitários positivos. Houve diferença significativa entre os tratamentos na relação N-NH₃/N-Total. Não houve diferença significativa às variáveis de pH, MS e PMS. Todas as silagens apresentaram temperatura máxima entre 31°C e 36°C, mantendo-se menores do que a temperatura ambiente até aproximadamente 32 horas, a partir de então houve deterioração aeróbica. Os valores da relação N-NH₃/N-total das silagens produzidas com inoculantes podem ser consideradas de boa qualidade. Contudo, a adição de inoculantes à silagem de milho promoveu uma deterioração aeróbica mais rápida da mesma. Foram observados menores teores de matérias secas nas silagens sem inoculantes. O uso dos inoculantes não foram suficientes para melhorar os teores de proteína, digestibilidade e NDT.

Palavras-chave: Deterioração Aeróbica, *Streptomyces* sp., Proteína.

■ INTRODUÇÃO

A sazonalidade climática no Brasil promove grandes oscilações na oferta de alimentos aos animais domésticos, refletindo em sua produtividade e desempenho, já que a ação direta sobre a produção de forragens torna, por vezes, a exploração de herbívoros vulneráveis (MOTA *et al.*, 2010). Entre os alimentos usados na produção agropecuária está a forragem, que consiste em tornar a produção agropecuária menos dependente das condições climáticas, desta forma a disponibilidade deste alimento é um ponto estratégico para o produtor (CALESCURA; GAI, 2012). Diante desse contexto, nos últimos anos houve a ampliação das técnicas de conservação de forragens, sendo a ensilagem o processo mais preponderante nos sistemas produtivos (ASSIS *et al.*, 2014).

Entre as culturas mais utilizadas para essa finalidade, encontra-se o milho (*Zea mays*), pois apresenta características desejáveis na produção de silagem, como alta produtividade, alto valor nutritivo e adequado processo de fermentação (BASSO *et al.*, 2012). No entanto, muitos fatores podem afetar a qualidade da silagem de milho, dentre eles destacam-se a cultivar, adubação, controle de pragas e plantas daninhas, colheita, tamanho de partícula e o processo de ensilagem (CALESCURA; GAI, 2012).

A microbiota da silagem encontra-se dividida em dois grupos distintos, os micro-organismos desejáveis e os indesejáveis. Os desejáveis são as bactérias do ácido lático e as bactérias do ácido propiônico e os indesejáveis são aqueles micro-organismos prejudiciais a conservação da forragem (leveduras, fungos filamentosos, bactérias do gênero *bacillus*), podendo apresentar um alto consumo de nutrientes ou causarem a deterioração aeróbica (ASSIS *et al.*, 2014).

A qualidade dessas silagens pode ser avaliada através da quantidade de nitrogênio amoniacal contido na mesma. O nitrogênio amoniacal presente na silagem é um indicador da eficiência fermentativa dos clostrídios, podendo levar ao aumento do pH e revelar a ação deletéria de enzimas da planta e de micro-organismos sobre a parte proteica da forragem (NEUMANN *et al.*, 2010). Além disso, ele é um indicativo da degradação da proteína durante o processo de ensilagem (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Quando a silagem é exposta ao ar, sua deterioração é inevitável, podendo resultar em perda substancial de matéria seca. Isso ocorre principalmente, em silagens resultantes de fermentação desejável, sugerindo a busca por novas cepas de micro-organismos que promovam o aumento da estabilidade aeróbica das mesmas (BASSO *et al.*, 2012). Diante do exposto, foi realizado um experimento com objetivo de avaliar o nitrogênio amoniacal, a estabilidade aeróbica e a composição bromatológica de silagem de milho com diferentes inoculantes bacterianos.

■ MÉTODO

O plantio do milho híbrido utilizado à silagem do experimento foi realizado na Fazenda Experimental da Universidade Federal Do Oeste Do Pará (UFOPA), Km 37 da PA-370, na cidade de Santarém-Pará. A região caracteriza-se pelo tipo climático Am com características gerais de clima quente e úmido de acordo com a classificação de Köppen, e uma pluviosidade média anual de 2150 mm (CLIMA-DATA, 2017). Para a elaboração da silagem colheu-se todo o milho entre 90 e 100 dias, quando o grão estava no estágio farináceo. Empregou-se a colheita manual rente ao chão com o auxílio de uma picareta estacionária com tamanho de partículas de 4.0 cm.

Foram utilizadas cepas de bactérias isoladas de silagem de sorgo, denominadas Actino 2, Actino 9 e Actino 1 e como controle positivo um inoculante comercial LactoSilo Gold (BASF) que continha as bactérias *Lactobacilus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus acidilactici*, *Enterococcus faecium*, *Bactéria láctica Sorgo S1*. Os inoculantes foram preparados no Laboratório de Microbiologia da UFOPA, onde as actinobactérias estavam em um bloco com 165 mL de caldo ALA, em quadruplicata e o inoculante comercial (4 g) em 165 mL de caldo ALA. Os inoculantes ficaram 24 horas em agitação, shaker, à 25°C e 180 RPM. Após o período de incubação obteve-se a contagem de células de 9 log UFC mL⁻¹ do caldo, conforme metodologia desenvolvida por ASSIS *et al.* (2014). Utilizou-se as cepas das actinobactérias para os testes, considerando-se o inoculante comercial como o controle positivo e sem inoculantes o controle negativo, cada um contendo 165 mL de caldo ALA.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições: 1- Tratamento sem inoculante (Caldo - controle negativo), 2- inoculante comercial (Lactobacilos-controle positivo), 3- inoculante 2 (Actino 2), 4- inoculante 3 (Actino 9), e 5- inoculante 4 (Actino 1).

No Laboratório de Bromatologia da UFOPA, o material foi compactado manualmente nos silos laboratoriais PVC (100 mm) com altura de 30 cm e raio de 5 cm, utilizando soquete de madeira, de modo a atingir a densidade de 600 kg/m³ (1.650 kg de silagem em cada silo), e adicionados de 165 ml de inoculantes diluídos em 44 mL de água peptonada estéril cada. Os silos foram dotados de válvula do tipo Bunsen para o escape dos gases e vedados com tampas comerciais de PVC a fim de evitar a entrada de ar e em seguida foram pesados e armazenados.

Após 33 dias de fermentação, os silos foram abertos, as partes deterioradas foram descartadas e procedeu-se a avaliação sensorial das silagens conforme os critérios estabelecidos por Meyer, Bronsch e Leibetseder (1989), quanto aos aspectos de odor, coloração

e manipulação (MS), para os quais as silagens receberam pontuações e a partir da soma destas, foram classificadas em boa a muito boa, satisfatória, regular e insatisfatória.

Para a determinação dos teores de Matéria Seca (MS) foram retiradas amostras de 500 g de silagem pré-secas, em estufa de circulação de ar a 55°C por 72 horas, e posteriormente determinados os valores de Matéria Seca e Nitrogênio Total, conforme os métodos da AOAC (1990).

Para a análise do nitrogênio amoniacal (N-NH₃) foram retiradas 25g de amostras de silagens e as análises foram determinadas seguindo a metodologia de Bolsen *et al.* (1992). Para a determinação dos valores de pH das silagens utilizou-se a metodologia descrita por Silva e Queiroz (2002). A determinação das perdas totais de Matéria Seca (PMS) foi calculada pela diferença entre o peso bruto de MS inicial e final dos silos, em relação a quantidade de forragem ensilada. Foi descontado o peso do silo na ensilagem e na abertura, conforme equação descrita por Schmidt (2006): $PMS = [(MSi - MSf) \times 100] / MSi$, onde PMS = Perda Total da MS e MSi = Quantidade de MS inicial, ou seja peso do silo após o enchimento, menos o peso do conjunto vazio sem a forragem, antes do enchimento (tara seca) multiplicados pelo teor de MS da forragem na ensilagem; MSf = Quantidade de MS final, onde o peso do silo cheio antes da abertura menos o peso do conjunto vazio sem a forragem, após a abertura dos silos (tara úmida) multiplicados pelo teor de MS da forragem na abertura.

Para o ensaio da estabilidade aeróbica juntou-se uma amostra de cada tratamento com 2 kg de silagem não compactados, acondicionadas em baldes de polipropileno com capacidade para 15 kg, onde ficaram por 7 dias em uma sala fechada com temperatura ambiente. As temperaturas da sala foram monitoradas duas vezes ao dia (8:00 h e 17:00 h) durante sete dias, com o uso de um termômetro inserido a 10 cm da massa e a temperatura ambiente foi monitorada com o mesmo termômetro. Foram analisados 14 tempos de avaliação (0, 24, 31, 48, 55, 72, 79, 96, 103, 120, 127, 144, 151, 168 horas) após a abertura dos silos e nos mesmos horários foram aferidos também os valores de pH, segundo a metodologia descrita por Silva e Queiroz (2002).

A estabilidade aeróbica foi calculada em horas, assim como o tempo, para que as silagens, após a abertura do silo, elevassem sua temperatura em 2°C acima da temperatura média ambiente (O'KIELY; CLANCY; DOYLE, *et al.*, 2001).

Para a determinação dos teores de Matéria Seca foram retirados 500 g de amostras de silagem de cada repetição e, estas foram pré-secas, em estufa de circulação forçada de ar a 55°C por 72 horas, pesadas e em seguida, foram trituradas em moinho de facas com peneira de 1 mm.

Para a determinação da MS definitiva, uma amostra do material triturado foi levado em estufa a 105°C, por 12 horas, conforme a metodologia de Silva e Queiroz (2002).

A proteína bruta (PB) foi determinada pelo método micro Kjeldahl, conforme a metodologia descrita por Silva e Queiroz (2002).

As fibras em detergente neutro (FDN) e em detergente ácido (FDA) foram determinadas conforme a metodologia de Van Soest, Robertson e Lewis (1991). A FDN foi corrigida para cinzas e a FDA foi corrigida para nitrogênio insolúvel em detergente ácido.

Os teores de compostos nitrogenados insolúveis em detergente ácido (NIDA) foram estimados a partir dos resíduos obtidos após a extração das amostras nos detergentes neutro e ácido, respectivamente (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991), por intermédio do procedimento de Kjeldahl (AOAC, 1990). O nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) foi realizado a partir da análise do nitrogênio presente no resíduo na FDA, pelo método de micro Kjeldahl.

O extrato etéreo (EE) foi determinado pelo método de Goldfish segundo AOAC (1990).

Os nutrientes digestíveis totais (NDT), digestibilidade da matéria seca (DMS), fibra bruta (FB) e extrativo não nitrogenado (ENN), foram estimados, respectivamente, pelas fórmulas: $NDT = 87.84 - (0.7 \times FDA)$, $DMS = 88.9 - (0.779 \times FDA)$, $FB = FDA \times 0.83$, $ENN = 100 - (\%EE + \%PB + \%FB + \%MM)$, descritas por Rodrigues (2010). Os carboidratos não fibrosos (CNF) da silagem foram obtidos pela equação: $100 - (\%FDN + \%PB + \%EE + \%MM)$ de acordo com Weiss (1999). Os carboidratos totais (CT) foram obtidos por intermédio da equação: $100 - (\%PB + \%EE + \%MM)$ (SNIFFEN; O'CONNOR; VAN SOEST, 1992).

Os valores da composição bromatológica da planta inteira de milho picada antes de ensilar está na Tabela 1.

Tabela 1. Composição bromatológica planta inteira de milho picada antes de ensilar.

Variável	% MS
MS (%)	30.0
EE (%)	13.0
PB (%)	12.0
MM (%)	6.0
FDN (%)	42.0
FDA (%)	25.0
CT (%)	65.0
CNF (%)	25.0
ENN (%)	45.0
NDT (%)	70.0
DMS (%)	68.0

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o programa SISVAR 5.6 e as médias comparadas pelo teste de Tukey, considerando o valor de $P < 0.05$ como nível de significância estatística (FERREIRA, 2011).

■ RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença estatística entre os tratamentos sem e com inoculação à silagem de milho para os parâmetros MS, pH e PMS.

Os dados obtidos nos níveis de pH nas silagens produzidas variaram de 5.95 a 6.04 (Tabela 2) e a adição dos inoculantes actinobactérias não acelerou sua diminuição. Van Soest, Robertson e Lewis (1991) mencionam que em silagens com alto teor de MS (> 35%), o pH torna-se um parâmetro de pouca importância, pois o desenvolvimento da acidez é inibido pela deficiência de água e pela alta pressão osmótica. Segundo Neumann *et al.* (2010) as silagens que apresentam pH superior a 4.2 podem ser classificadas como de boa qualidade, se levarem em consideração seu teor de matéria.

As silagens produzidas neste trabalho apresentaram teores de matéria seca adequados (Tabela 2), tanto no tratamento sem inoculação (32.07%), como nos demais (33.67 a 39.9%). A MS próxima à faixa de 30% a 35% é sugerida como ideal para uma boa fermentação, pois abaixo desse nível ocorre a proliferação de bactérias do gênero *Clostridium*, as quais são responsáveis pela fermentação indesejável (McDONALD, 1981).

As perdas de matéria seca não variaram em função dos tratamentos avaliados, entretanto, os valores variaram de 4,4 a 5,6 (inoculante 4- actino1 e sem inoculante, respectivamente) (Tabela 2).

Houve diferença significativa entre os valores de relação N-NH₃/N-Total (Tabela 2) ($P < 0.0001$). O tratamento sem inoculação foi o único que apresentou maior percentagem de N-NH₃/N-Total, indicando uma possível atividade de bactérias do gênero *Clostridium*. Segundo Silva (2015) maiores concentrações são obtidas quando as plantas são colhidas com teor de matéria seca abaixo do ideal (30 a 35 %), proporcionando uma fermentação indesejável devido à baixa pressão osmótica, ocorrendo um aumento populacional de bactérias do gênero *clostridium*. Os tratamentos 2, 4 e 5 com o inoculante comercial actino 2, actino 9 e actino 1, foram os que apresentaram menor relação N-NH₃/N-Total, indicando que o uso desses inoculantes representou menores perdas de nitrogênio comparada aos demais tratamentos.

Tabela 2. Valores de matéria seca (MS), potencial hidrogeniônico (pH), perdas de matéria seca (PMS) e relação de nitrogênio amoniacal e nitrogênio total (N-NH₃/NT) de silagens de milho em função dos tratamentos: 1- Sem inoculante, 2- inoculante comercial (*Lactobacilos*-controle positivo), 3- inoculante 2 (Actino 2), 4- inoculante 3 (Actino 9), e 5- inoculante 4 (Actino 1).

Variáveis	TRATAMENTO						
	1	2	3	4	5		
MS	32.07	33.67	33.83	35.97	39.9		
pH	5.95	5.95	5.99	6.01	6.04		
PMS	5.6	5.3	5.3	5.05	4.4		
N-NH ₃ /NT	0.043	a	0.035	b	0.036	b	
				0.029	b	0.025	b

Médias seguidas por letras iguais na linha não diferiram entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$). T1- Tratamento sem inoculante, T2- inoculante comercial (*Lactobacilos*-controle positivo), T3- inoculante 2 (Actino 2), T4- inoculante 3 (Actino 9), e T5- inoculante 4 (Actino 1).

Os valores da relação N-NH₃/N-Total obtidos nesse trabalho foram bem menores do que os obtidos Guimarães Júnior *et al.* (2005), que variaram de 3.39% a 5.27%.

De maneira geral as silagens apresentaram uma relação N-NH₃/N-Total dentro do preconizado por Neumann *et al.* (2010), onde valores inferiores a 10% de nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total indicam que o processo de fermentação não resultou em quebra excessiva da proteína em amônia e os aminoácidos constituem a maior parte do nitrogênio não-proteico. Os valores de nitrogênio amoniacal em percentagem do nitrogênio total obtidos nesse estudo podem ser considerados baixos, demonstrando uma baixa redução nos níveis de proteína verdadeira ao longo da fermentação.

No ensaio de estabilidade aeróbica da silagem houve maior estabilidade naquelas que foram inoculadas. No entanto, todas as silagens apresentaram temperatura máxima entre 31°C e 36°C, mantendo-se menores do que a temperatura ambiente até aproximadamente 32 horas, com exceção do tratamento 3 (inoculante Actino 9), cuja temperatura da silagem se manteve abaixo da temperatura até 48 horas. Segundo Jobim *et al.* (2007), a avaliação da temperatura em ambiente controlado pode apresentar baixa acurácia para estimar a velocidade de deterioração da silagem, por não se assemelhar à situação de campo.

Em silagens de milho adequadamente fermentadas, a maior preocupação ocorre durante a exposição ao oxigênio, uma vez que as leveduras utilizam o ácido láctico como substrato.

Neste trabalho as silagens ficaram estáveis, não apresentando aquecimento superior a 2°C em relação ao ambiente até 32 horas. Houve grande variação nos valores de pH durante o período de exposição aeróbica (Tabela 3), verificando-se valores próximos a 3.5 e superiores a 7.0, o que segundo Kung Jr, Stokes e Lin (2003) pode ser um indicativo prático de que a silagem está sendo deteriorada devido à degradação dos ácidos orgânicos.

Tabela 3. Comportamento temporal das silagens de milho em aerobiose com relação ao pH dos tratamentos: 1- Sem inoculante, 2- inoculante comercial (*Lactobacilos*-controle positivo), Tra 3- inoculante 2 (Actino 2), Tra 4- inoculante 3 (Actino 9), e Tra 5- inoculante 4 (Actino 1).

Tempo (h)/ Tratamentos	pH				
	1	2	3	4	5
0	3.52	3.41	3.37	3.35	3.45
24	3.36	3.76	3.55	3.54	3.37
31	3.4	5.82	3.7	3.59	3.56
48	3.58	5.92	3.95	3.79	3.75
55	6.06	6.0	4.94	4.46	6.03
72	6.38	6.29	6.11	5.42	6.0
79	6.79	6.4	6.5	6.2	6.62
96	6.88	6.44	6.62	6.34	6.87
103	7.0	6.49	6.61	6.39	6.78
120	6.3	6.52	6.64	6.64	6.8
127	6.6	6.56	6.7	6.7	6.86
144	6.82	6.68	6.87	6.68	6.93
151	7.3	6.69	6.9	6.7	6.73
168	7.12	6.84	7.09	6.83	6.77

No presente estudo encontrou-se um pH médio de 5.79 para o tratamento sem inoculante e para os tratamentos 2; 3; 4 e 5, as médias de pH foram 5.98; 5.68; 5.47 e 5.75, respectivamente. As condições ácidas foram estabelecidas rapidamente com a utilização de inoculantes, contudo, o pH não foi suficientemente baixo para inibir a atividade proteolítica. O desenvolvimento de micro-organismos foi acompanhado de alterações na composição química da silagem, o que promoveu a elevação dos valores de pH.

Barbosa *et al.* (2011) avaliando a estabilidade aeróbica de silagens de milho e soja exclusivas ou associadas, encontraram valores semelhantes de pH aos encontrados neste trabalho em relação à deterioração aeróbica, assim como Gimenes *et al.* (2006) que relataram um valor médio de pH de 6.64 em silagem de milho, sem utilização de inoculantes, após 72 horas de exposição aeróbica.

No ensaio de estabilidade aeróbica, foram observados teores de MS menores, nas silagens sem inoculantes ($P=0.04$), entretanto, todas as silagens inoculadas apresentaram teores de MS superiores a 30%, critério indicativo de silagens de boa qualidade. Os resultados deste trabalho discordam dos observados por Rodrigues *et al.* (2004) que apresentaram incrementos nos teores de MS de todas as silagens, nos híbridos da Agrocere AG510 e AG5011, usando inoculantes.

Os teores de extrato etéreo foram inferiores nas silagens com inoculante 2 (Actino 2) ($P=0.03$) (Tabela 4).

Os teores de proteína bruta não variaram em função dos tratamentos ($P=0.37\%$) (Tabela 4), entretanto, todas as silagens apresentaram valores superiores a 7%. Todos os valores de PB deste trabalho foram superiores aos obtidos por Rocha *et al.* (2006), que registraram

valores médios de 6.3; 6.7 e 6.7%, respectivamente, para a silagem controle e as tratadas com Maize All e Biomax, de modo que o teor de PB das silagens inoculadas foi superior ao da não inoculada.

Os maiores teores de matéria orgânica foram observados nas silagens sem inoculantes e com o inoculante 2 (actino 2) ($P < 0.0001$). Valores superiores de matéria mineral foram observados em silagens com o inoculante comercial (*Lactobacilos*-controle positivo), nas silagens com o inoculante 3 (Actino 9) e com o inoculante 4 (Actino 1) ($P < 0.0001$) (Tabela 4).

Os teores de fibra em detergente neutro das silagens não foram afetados em virtude dos tratamentos ($P = 0.31$) (Tabela 4), todos os valores ficaram abaixo de 50%, o que é adequado para silagens de milho. Nos estudos de Rodrigues *et al.* (2004) os valores de FDN foram superiores a 55%, em silagens de híbridos da Agrocere AG510 e AG5011, usando inoculantes.

Os teores de fibra em detergente ácido foram menores em silagens sem inoculante, e nas silagens com inoculante comercial (*Lactobacilos*-controle positivo) ($P = 0.0001$) (Tabela 4). Nos estudos de Rocha *et al.* (2006) o teor de FDA, também foi influenciado somente pela ausência de inoculante, estimando valor mínimo de 30.27%, em silagens de milho produzidas com inoculantes enzimo-bacterianos.

Os teores de nutrientes digestíveis totais, extrativos não nitrogenados e digestibilidade da matéria seca diminuíram com os tratamentos com os inoculantes 2 (Actino 2), 3 (Actino 9) e 4 (Actino 1) (Tabela 4). Silva *et al.* (2005) observaram um menor valor de DIVMS na silagem de milho não tratada com inoculante, estimando-se, valores máximos em torno de 71%.

Tabela 4. Composição bromatológica das silagens de milho com diferentes inoculantes dos tratamentos: 1- Sem inoculante, 2- Inoculante comercial (*Lactobacilos*-controle positivo), 3- Inoculante 2 (Actino 2), 4- Inoculante 3 (Actino 9), e 5- Inoculante 4 (Actino 1).

Variável	Tratamento										Probabilidade
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
MS (%)	29.0	b	30.8	ab	30.9	ab	32.8	ab	36.3	a	0.04
EE (%)	12.9	a	11.4	ab	10.6	b	11.5	ab	12.4	ab	0.03
PB (%)	14.3		17.5		16.3		15.2		14.9		0.37
MO (%)	94.1	ab	93.5	bc	94.7	a	93.2	c	93.6	bc	<0.0001
MM (%)	5.9	bc	6.5	ab	5.3	c	6.7	a	6.4	ab	<0.0001
FDN (%)	41.1		42.6		45.9		41.5		43.8		0.31
FDA (%)	26.0	b	25.6	b	35.4	a	37.9	a	37.6	a	0.0001
CT (%)	66.9		64.5		67.8		66.6		66.2		0.58
CNF (%)	25.8		22.0		21.8		25.1		22.4		0.66
ENN (%)	45.2	a	43.3	ab	38.4	bc	35.1	c	34.9	c	0.00001
NDT (%)	69.6	a	69.9	a	63.1	b	61.2	b	61.5	b	0.0001
DMS (%)	68.6	a	68.9	a	61.4	b	59.3	b	59.6	b	0.0001

Médias seguidas de letras distintas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Teor de matéria seca (MS), extrato etéreo (EE), proteína bruta (PB), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), carboidratos totais (CT), carboidratos não fibrosos (CNF), extrativo não nitrogenado (ENN), nutrientes digestíveis totais (NDT), digestibilidade da matéria seca (DMS).

■ CONCLUSÃO

A silagem de milho com diferentes inoculantes, apresentou características fermentativas e análises sensoriais aceitáveis. Os valores da relação do nitrogênio amoniacal pelo nitrogênio total (N-NH₃/N-Total) indicam que as silagens com inoculantes são de boa qualidade. Contudo, a adição dos inoculantes promoveu uma deterioração aeróbica mais rápida à silagem de milho.

O uso dos inoculantes não foram suficientes para melhorar os teores de proteína, digestibilidade, NDT e extrativos não nitrogenados, entretanto, foram eficientes para reduzir a FDA.

■ REFERÊNCIAS

ASSIS, F. G. V.; Ávila, C. L. D; Pinto, J. C. et al. New inoculants on maize silage fermentation. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 43: 395-40, 2014.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY - AOAC. **Official methods of analysis**. 15.ed. Arlington: AOAC International, 1990. 1117p.

BARBOSA, L. A.; REZENDE, A. V.; RABELO, C. H. S. et al. Estabilidade aeróbia de silagens de milho e soja exclusivas ou associadas. *Ars Veterinaria*, 27: 255-262, 2011.

BASSO, F. C.; LARA, E. C.; ASSIS, F. B. D. et al. Características da fermentação e estabilidade aeróbia de silagens de milho inoculadas com "Bacillus subtilis". *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 13: 1009-1019, 2012.

BOLSEN, K.K.; LIN, C.; BRENT, B. et al. Effect of silage additives on the microbial succession and fermentation process of alfalfa and corn silage. *Journal of Dairy Science*, 75: 3066- 3083,1992.

CALESCURA, P. L.; GAI, V. F. Uso de inoculante microbiano em silagem de milho. *Acta Iguazu*, Cascavel, 1: 67-74, 2012.

CLIMA-DATA. Clima: Santarém. Disponível em: <<https://pt.climate-data.org/location/4512/>>. Acesso em: 21/09/2020.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35: 1039-1042, 2011.

GIMENES, A. L. G.; MIZUBUTI, I. Y.; MOREIRA, F. B. et al. Composição química e estabilidade aeróbia em silagem de milho preparadas com inoculantes bacteriano e/ou enzimático. *Acta Scientiarum*, 28: 153-158, 2006.

GUIMARÃES JÚNIOR, R.; GONÇALVES, L.C.; RODRIGUES, J.A.S. et al. Matéria seca, proteína bruta, nitrogênio amoniacal e pH das silagens de três genótipos de milho (*Penisetum glaucum* (L). R. Br.) em diferentes períodos de fermentação. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 4: 251-258, 2005.

JOBIM, C.C.; NUSSIO, L.G.; REIS, R.A.; SCHMIDT, P. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 36: 101-119, 2007.

KUNG JR., L.; STOKES, M. R.; LIN, C. J. Silage additives. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J.H. (Eds.) **Silage science and technology**. Wisconsin: ASA/CSSA/SSSA, 2003, p.305-360.

McDONALD, P. **The biochemistry of silage**. New York: John Willey & Sons. 1981. 226 p.

MEYER, H.; BRONSCH, K.; LEIBETSEDER, J. **Supplemente zu vorlesungen und übungen in der tierernährung**. Hannover: Verlag M. e H. Schaper, 1989. 255p.

MOTA, D. A.; OLIVEIRA, M. D. S. D.; DOMINGUES, F. N. et al. Hidrólise da cana-de-açúcar com cal virgem ou cal hidratada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39: 1186-1190, 2010.

NEUMANN, M.; OLIBONI, R.; OLIVEIRA, M.R. et al. Girassol (*Helianthus annuus* L.) para produção de silagem de planta inteira. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, 2: 181, 2010.

O'KIELY, P.O.; CLANCY, M.; DOYLE, E.M. Aerobic stability of grass silage mixed with a range of concentrate feedstuffs at feed-out. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 19, 2001, São Pedro-SP. **Proceedings...** São Pedro: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 2001. p.794-795.

OLIVEIRA, L.B.; PIRES, A.J.V.; CARVALHO, G.G.P. et al. Perdas e valor nutritivo de silagens de milho, sorgo-sudão, sorgo forrageiro e girassol. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39: 61-67, 2010.

ROCHA, K. D.; PEREIRA, O. G.; VALADARES FILHO, S. C. et al. Valor nutritivo de silagens de milho (*Zea mays* L.) produzidas com inoculantes enzimo-bacterianos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 35: 389-395, 2006.

Rodrigues, P. H. M.; Ruzante, J. M.; Senatore, A. L. et al. Avaliação do Uso de Inoculantes Microbianos sobre a Qualidade Fermentativa e Nutricional da Silagem de Milho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 33: 538-545, 2004.

RODRIGUES, R.C. **Métodos de análises bromatológicas de alimentos: métodos físicos, químicos e bromatológicos**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 177 p.

SCHMIDT, P. **Perdas fermentativas na ensilagem, parâmetros digestivos e desempenho de bovinos de corte alimentados com rações contendo silagens de cana-de-açúcar**. 2006. Piracicaba, 228 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Curso de Pós graduação em Agronomia, Universidade de São Paulo.

Silva, A. V.; Pereira, O. G.; Garcia, R. et al. Composição Bromatológica e Digestibilidade in Vitro da Matéria Seca de Silagens de Milho e Sorgo Tratadas com Inoculantes Microbianos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 34: 1881-1890, 2005.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos** (Métodos químicos e biológicos). 2.ed. Viçosa, MG: UFV. 2002, 178p.

SILVA, M. S. J. D.; JOBIM, C. C.; POPPI, E. C. et al. Production technology and quality of corn silage for feeding dairy cattle in Southern Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 44: 303-313, 2015.

SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P. J. Carbohydrate and Protein System for Evaluating Cattle Diets: 11. Carbohydrate and Protein Availability. **Journal of Animal Science**, 70: 3562–3577, 1992.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B. AND LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, 74: 3583-3597, 1991.

WEISS, W.P. Energy prediction equations for ruminant feeds. In: **Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers**, 61., 1999, Proceedings...Ithaca: Cornell University, 1999. p.176-185.

Substâncias fitoestimulantes produzidas por cepas de *Streptomyces* spp. isolados da rizosfera de *Aniba parviflora* Syn *A. fragans* (macacaporanga)

- | **Fernanda Alves Ferreira**
Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA
- | **Élcio Meira da Fonseca Júnior**
Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA
- | **José Jeosafá de Sousa Júnior**
Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA
- | **Sara Freitas de Sousa Ramos**
Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA
- | **Raphael Carlos Ferrer de Santana**
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE
- | **Silvia Katrine Rabelo da Silva**
Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA

RESUMO

Objetivo: Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de substâncias fitoestimulantes por cepas de actinobactérias *in vitro*, isoladas da rizosfera na Amazônia. **Método:** Foram analisadas 10 cepas de actinobactérias (*Streptomyces* spp.), pertencentes ao acervo da Bacterioteca do Laboratório de Microbiologia da UFOPA, obtidos de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn. *A. fragans* (Macacaporanga), em área de transição entre floresta ombrófila densa e Savana no município de Santarém-PA. Para a confirmação do gênero *Streptomyces* spp. foram avaliados morfológicos e moleculares pelo gene 16S rRNA, sendo assim nomeadas MPO1, MPO2, MPO3, MPO4, MPO5, MPO6, MPO7, MPO8, MPO10, MPO11. Os morfotipos foram avaliadas quanto a capacidade de produção dos fitoestimulantes ácido indolacético, sideróforos, amônia, produção de fosfatases e solubilização de fosfato. Para tanto, foram realizados ensaios biológicos qualitativos, todos em triplicata. **Resultados:** Este estudo apresenta pela primeira vez a capacidade de actinobactérias do gênero *Streptomyces* spp. nativas da rizosfera de *Aniba parviflora* na Amazônia em produzir substâncias fitoestimulantes. Os isolados com melhor desempenho foram *Streptomyces* spp. MPO11 para produção sideróforos e AIA; *Streptomyces* spp. MPO1, *Streptomyces* spp. MPO2, *Streptomyces* spp. MPO11 na solubilização de fosfato, e *Streptomyces* spp. MPO6, *Streptomyces* sp. MPO7 na produção de amônia (NH₃); e *Streptomyces* spp. MPO1 e *Streptomyces* spp. MPO10 na produção de fosfatases. **Conclusão:** As cepas de actinobactérias produzem substâncias fitoestimulantes, com destaque para *Streptomyces* spp. MPO 11, produtora de sideróforos, ácido indol-3-acético e solubilização de fosfato, apontando potencial uso na indução do crescimento vegetal.

Palavras-chave: Ácido Indolacético, Sideróforos, Fosfatase, Actinomiceto, Amazônia.

■ INTRODUÇÃO

Os microrganismos presentes na rizosfera possuem diversidade genética que os permitem se adaptar em diferentes condições naturais, possibilitando sua ação nos variados bioprocessos de ecossistemas terrestres. Entre as interações da microbiota do solo e os vegetais, a relação de simbiose é uma das formas mais valiosas do ponto de vista biotecnológico, uma vez que resulta no aporte de nutrientes limitantes, e na produtividade ao regular processos importantes de mineralização de substâncias fitoestimulantes, como fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de sideróforos, entre outros (BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

Os metabólitos secundários estão sendo obtidos graças as pesquisas que envolvem microrganismos, os quais elucidam a estrutura e ação biológica de uma gama de compostos de estruturas complexas e variada atividade biológica (SOUZA; RESCAROLLI; NUNEZ, 2018). São diversos os metabólitos secundários de origem microbiana responsáveis por estimular o desenvolvimento vegetal, substâncias da classe dos sideróforos, os quais são quelantes com massa molecular entre 400 e 2000 Da, têm função na ligação com o Fe (III), em condições de baixo ferro livre. O ferro é um elemento essencial para os vegetais e bactérias, entretanto, apesar de abundante na maioria dos solos, está indisponível pois se encontra no estado férrico. Assim, para assimilar o ferro do solo, os microrganismos e plantas gramíneas (estratégia I) produzem sideróforos, para quelar as moléculas férricas (BENITE; MACHADO; MACHADO, 2002; MORRISSEY; GUERINOT, 2009).

O ácido indol-3-acético (AIA) é um importante fitohormônio com capacidade de influenciar a fisiologia vegetal de maneiras benéficas e deletérias. A capacidade de sintetizar AIA é um atributo que muitas bactérias apresentam, incluindo aquelas promotoras de crescimento de plantas (ROCHA; SANTOS; COLONIA; CHAGAS JUNIOR, 2018). O Fósforo (P) é um dos nutrientes mais requeridos no crescimento das plantas, sendo um componente estrutural de muitas coenzimas, fosfo-proteínas, fosfolipídeos, do ácido desoxirribonucléico (DNA) de todos os organismos vivos e, é responsável pela transferência e armazenamento da energia utilizada para o crescimento e reprodução. O fósforo é importante em vários processos fisiológicos das plantas, especialmente na fotossíntese, metabolismo de carbono e formação de membrana (CRUZ; SOUZA; PELACANI, 2015).

De acordo com (RIBEIRO; CARDOSO, 2012), a principal fonte de fosfatase no solo é de origem microbiana, e sua atividade na rizosfera aumenta gradualmente, tendo ação sobre compostos de fósforo, podendo hidrolisar uma variedade de ésteres e anidridos do ácido fosfórico, resultando na liberação de fosfato. Adicionalmente, atuam em reações de transfosforilação de fosfoésteres de glicerol. O aumento da atividade das fosfatases na rizosfera

influencia positivamente estimulando o crescimento vegetal, visto a biodisponibilidade do solo e a absorção de fosfato pelas plantas (YOUNG; HAMEED; PENG; SHAN *et al.*, 2013).

Para muitos microrganismos principalmente bactérias e fungos, a amônia (NH₃), é a fonte de nitrogênio preferencial, já para as plantas, o nitrogênio na forma (NO₃⁻) serve como fonte principal para o seu crescimento e desenvolvimento, sendo também usado como forma de recuperação de nitrogênio pelas folhas (Ty *et al.*, 2017).

As actinobactérias são bactérias Gram-positivas amplamente distribuídas nos ecossistemas terrestres e aquáticos. Este grupo apresenta ampla diversidade morfológica como cocos (*Micrococcus*), coco-bacilo (*Artobacter*), hifas curtas e rudimentares (*Nocardia* spp.) e micélio ramificado (*Streptomyces* spp.) (VENTURA; CANCHAYA; TAUCH; CHANDRA *et al.*, 2007).

Segundo (BENTLEY; CHATER; CERDEÑO-TÁRRAGA; CHALLIS *et al.*, 2002), as actinobactérias são abundantemente distribuídas no solo, correspondendo a cerca de 10 a 50% dessa comunidade. Esse grupo bacteriano, têm sido associado como agente de biocontrole em vários estudos, especialmente no controle de fungos patogênicos para plantas e microrganismos patogênicos de interesse médico (LOQMAN; BARKA; CLÉMENT; OUHDOUCH, 2009). Segundo (HAMDALI; HAFIDI; VIROLLE; OUHDOUCH, 2008), também são capazes de promover o crescimento das plantas pela produção de fitohormônios e compostos de ácido indolacético, segundo (HAMDALI; HAFIDI; VIROLLE; OUHDOUCH, 2008). Neste grupo, *Streptomyces*, ganha destaque pela grande quantidade de metabólitos secundários descritos, a exemplo os antibióticos, antiparasitários e imunossupressores (PROCÓPIO; SILVA; MARTINS; AZEVEDO *et al.*, 2012).

Estudos de prospecção de substâncias estimulantes do desenvolvimento vegetal produzidas por actinobactérias tem sido de grande relevância, pois colaboram para a obtenção de novos métodos para desenvolvimento de bens e produtos na agricultura. Diante do potencial de aplicação biotecnológico, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de substâncias fitoestimulantes por cepas de actinobactérias *in vitro*, isoladas da rizosfera de *Aniba parviflora* Syn *A. fragans* (Macacaporanga) na Amazônia.

■ MÉTODO

OBTENÇÃO DAS ACTINOACTÉRIAS

Foram analisadas 10 cepas de actinobactérias pertencentes ao acervo da Bacterioteca do Laboratório de Microbiologia, do Instituto de Saúde Coletiva, da Universidade Federal do Oeste do Pará. Estes isolados obtidos de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *A. fragans* (Macacaporanga), são provenientes de uma área de transição entre floresta ombrófila

densa e Savana Amazônica no município de Santarém-PA, Brasil (Latitude 20 28' 01.28" S e Longitude 54 49' 45.32" O).

As cepas foram analisadas através de aspectos morfológicos e moleculares pelo gene RNAr 16S, para confirmação do gênero *Streptomyces* spp., correspondendo a similaridade de 99% das sequências nucleotídicas, entretanto diferindo quanto aspectos bioquímicos, sendo assim nomeadas como *Streptomyces* spp. MPO1, MPO2, MPO3, MPO4, MPO5, MPO6, MPO7, MPO8, MPO10, MPO11. Os isolados foram preservados em óleo mineral e reativados pelo cultivo em meio de cultura *International Streptomyces Project* n°2 (ISP2) (PRIDHAM; ANDERSON; FOLEY; LINDENFELSER *et al.*, 1956) durante 7 dias a 30°C, até a completa esporulação bacteriana. Então foram realizadas as análises descritas abaixo.

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS FITOESTIMULANTES POR MORFOTIPOS DE *Streptomyces* spp.

A produção de sideróforos foi determinada de acordo com a metodologia de (ALEXANDER; ZUBERER, 1991).

A produção de ácido 3-indolacético (AIA) foi determinada quantitativamente através do método de (GLICKMANN; DESSAUX, 1995).

A avaliação da produção de amônia foi realizada segundo (KAVAMURA; SANTOS; SILVA; PARMA *et al.*, 2013). Para quantificação de amônia produzida pelas linhagens de *Streptomyces* spp. foi realizada uma curva-padrão em concentrações de sulfato de amônio variando de 1,25 a 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo obtida a equação $y=36,255x+0,5801$, correspondendo a $R^2=0,98$.

Deteção da produção de fosfatases

A produção de fosfatases bacteriana foi determinada por meio da metodologia de (RIBEIRO; CARDOSO, 2012).

Avaliação da solubilização de fosfato em meios sólidos NBRIP E VERMA

A avaliação da solubilização de fosfato em meio sólido foi realizada segundo metodologia descrita por (VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001) e (KUMAR; BHARTI; NEGI; GUSAIN *et al.*, 2012).

Análise dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância, e se significativos, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados apresentados como média \pm desvio padrão.

■ RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo apresenta pela primeira vez a capacidade de actinobactérias do gênero *Streptomyces* spp. nativas da rizosfera de *Aniba parviflora* na Amazônia em produzir substâncias fitoestimulantes. Os isolados com melhor desempenho foram *Streptomyces* spp. MPO11 para produção sideróforos e AIA; *Streptomyces* spp. MPO1, *Streptomyces* spp. MPO2, *Streptomyces* spp. MPO11 na solubilização de fosfato, e *Streptomyces* spp. MPO6, *Streptomyces* sp. MPO7 na produção de amônia (NH₃); e *Streptomyces* spp. MPO1 e *Streptomyces* spp. MPO10 na produção de fosfatases (Tabela 1).

Apenas *Streptomyces* spp. MPO11 produziu sideróforos (Tabela 1). De acordo com (J B NEILANDS; LEONG, 1986), os sideróforos de *Streptomyces* se ligam ao Fe³⁺ do meio ambiente e podem ser utilizados pelas plantas como estratégia para obtenção de ferro, podendo inibir o crescimento de fitopatógenos pela competição pelo ferro nos solos da rizosfera, promovendo o crescimento das plantas (HORSTMANN, 2017) estudaram 11 isolados de actinobactérias obtidos da rizosfera de plantas de Fabaceae, e verificaram que todos os isolados produziram sideróforos, com maior potencial o isolado CLV46.

Em um estudo realizado com cinco isolados de *Streptomyces* spp. (CAI-17, CAI-68, CAI-78, KAI-26 E KAI-27) do solo na Índia, GOPALAKRISHNAN *et al.* (2015) detectaram em análise qualitativa produção de sideróforos em todos os isolados (GOPALAKRISHNAN; SRINIVAS; ALEKHYA; PRAKASH *et al.*, 2015).

Já (DA SILVEIRA; IÓRIO; MARCOS; FERNANDES *et al.*, 2019) analisaram 13 linhagens de *Streptomyces*, isoladas de caules sadios e de raízes de cana-de-açúcar em Campinas-SP, cultivadas em campo observaram que (69,2%) produziram sideróforos. Esses isolados apresentaram um índice de sideróforo que variou entre 0,07 à 5,37 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os dados apresentados por esses autores revelam que a maioria dos isolados de actinobactérias rizosféricas apresentam a capacidade de produzir sideróforos, diferentemente dos resultados obtidos neste estudo, onde somente o isolado *Streptomyces* spp. MPO11 apresentou resultado positivo.

Dos 10 isolados de *Streptomyces* spp. avaliados quanto a produção de auxina, foi observado que (30%), sendo eles *Streptomyces* spp. MPO1, MPO2 e MPO11, foram capazes de produzir o (AIA). Em estudo realizado por (RODRIGUES; FORZANI; SOARES; SIBOV

et al., 2016), 136 isolados bacterianas foram isoladas de folhas, caule, raízes e rizosfera da cana-de-açúcar, onde a produção de AIA foi observada em 57% dos isolados, variando 21,05-139,21 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em 72 h, o que mostra uma diferença significativa com os resultados obtidos no presente trabalho, o qual 30% dos isolados mostraram eficiência para produção de ácido 3-indolacético, variando entre 0,68 e 0,69 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

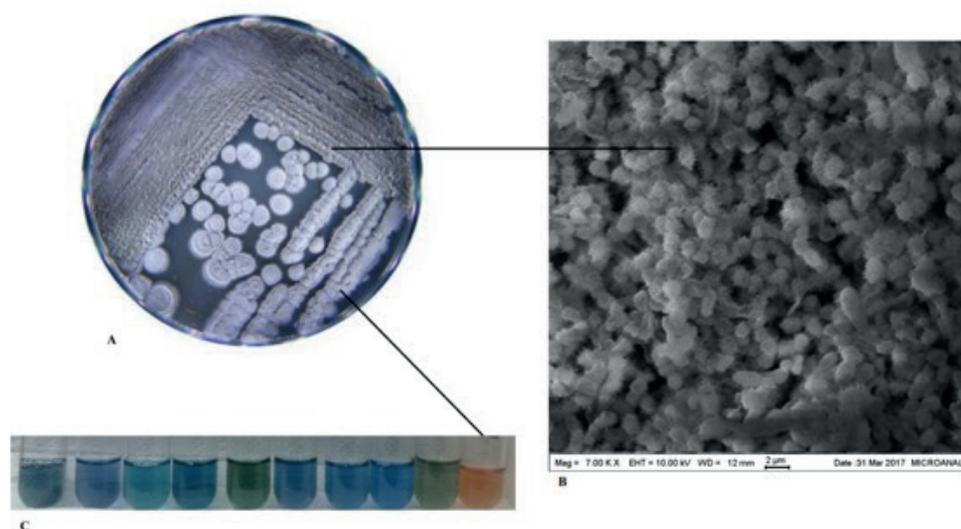
(SOUZA; RESCAROLLI; NUNEZ, 2018) avaliaram 81 bactérias isoladas da cana-de-açúcar, sob manejo orgânico, e estas foram isoladas em meio de cultura livre de nitrogênio, observaram a produção de AIA em pelo menos 46% dos isolados e, as concentrações produzidas tiveram uma variação nos períodos avaliados, de 0,5 a 36,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 24 h, de 0,5 a 59,48 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em 48 h e de 0,23 a 87,07 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em 72 h. A maioria dos isolados produziram mais de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AIA no período de 72 h. Já no trabalho realizado por (KAVAMURA; SANTOS; SILVA; PARMA et al., 2013), foram feitos testes com 48 rizobactérias isoladas de plantas do bioma Caatinga, onde foi possível detectar que cerca de 30% das cepas produzem AIA em concentrações variando 1,0 a 135,22 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, corroborando assim, com resultados obtidos no presente trabalho.

Aris et al., (2019), estudaram 53 isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera da soja, desse total, 18 isolados foram capazes de produzir AIA, com concentração de AIA produzida por essas actinobactérias variando de 2,08 a 16,70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A maior concentração de AIA foi produzida pelo isolado ARK 48 (16,70 ppm), enquanto que a menor produção foi observada no isolado ARK 86 (2,08 ppm). Conforme os resultados obtidos em nosso trabalho, de acordo com a média de 5,22 ppm, os isolados de *Streptomyces* spp. apresentam potencial fitoestimulante a partir da produção de ácido indolacético.

O teste qualitativo realizado no presente trabalho, indicou que 30% dos isolados, sendo eles *Streptomyces* spp. MPO6, MPO7 e MPO8 produzem NH_3 . No trabalho de (RODRIGUES; FORZANI; SOARES; SIBOV et al., 2016), foram avaliados 136 actinobactérias isoladas de folhas, caule, raízes e rizosfera de cana-de-açúcar, onde a produção de amônia foi observada em (45%) isolados.

(DAGNAW; ASSEFA; GEBREKIDAN; ARGAW, 2015), estudaram 116 isolados de actinobactérias da rizosfera da cana-de-açúcar, observaram que, 75 isolados foram capazes de produzir amônia. Com isso, pode-se observar que a capacidade de produzir amônia é um aspecto comum entre o grupo das actinobactérias.

Figura 1. A: Morfologia do micélio aéreo da *Streptomyces* sp. MPO11; B – Microscopia eletrônica da *Streptomyces* sp. MPO11 C: Produção de ácidoindolacético, em amarelo, da MPO11.



Em análise qualitativa, os resultados do presente trabalho mostraram que (50%) dos isolados de *Streptomyces* spp. produzem fosfatases. (RIBEIRO; CARDOSO, 2012) avaliaram 96 actinobactérias associadas a raízes de *Araucaria angustifolia* e observaram que (85%) foram capazes de produzir fosfatases. Este resultado tem uma diferença dos resultados encontrados neste trabalho, o qual 50% dos isolados foram capazes de produzir fosfatase.

Lins *et al.*, (2013), estudaram 80 actinobactérias isoladas da rizosfera da Caatinga, pertencentes à coleção de cultura de microrganismos do departamento de antibióticos (UFPEDA), desse total, 97% actinobactérias produziram fosfatases. Já (MEENA; RAJAN; VINITHKUMAR; KIRUBAGARAN, 2013) observaram que das 26 actinobactérias isoladas de ambientes marinhos, 30,77% foram capazes de produzir fosfatases. Os resultados obtidos neste trabalho mostram uma grande diferença diante do encontrado na literatura.

Todos *Streptomyces* spp. (100%) isolados de *Aniba parviflora* são solubilizadores de fosfato, sendo capazes de atuar nos dois meios de cultura utilizados. No estudo realizado por (SOUZA; RESCAROLLI; NUNEZ, 2018) com bactérias isoladas da rizosfera da cana-de-açúcar, a solubilização do fosfato foi observada em 86,5% dos isolados, com índice de solubilização variando de 1,82 a 53,78 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Estes dados são inferiores ao resultado encontrado no presente estudo, o qual 100% das cepas estudadas foram capazes de solubilizar fosfato.

(PONTES; SOUZA; GRANADA, 2015), avaliaram 160 cepas bacterianas isoladas do solo rizosférico e de raízes de plantas de cevada coletadas em três diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Dessas 160 cepas, 28 foram capazes de solubilizar fosfato, sendo que, as raízes rizosféricas de solo e cevada obtidas na localidade de São Borja apresentaram o maior número de cepas solubilizadoras de fosfato totalizando 65%,

comparadas aos demais locais, enquanto neste trabalho, todas os isolados avaliados apresentaram resultados positivos.

No trabalho de Aris *et al.*, (2019), foram estudadas 18 cepas de actinobactérias isoladas da rizosfera da soja, onde todos os 18 isolados foram capazes de solubilizar fostato, com índice de variação entre $2,05 \pm 0,06$ - $2,72 \pm 0,08 \mu\text{g.mL}^{-1}$. (VERMA; YADAV; TIWARI; LAVAKUSH *et al.*, 2010), avaliaram 3 cepas de actinobactérias isolados de tecidos do caule e da raiz de *Azadirachta indica* Juss (Meliaceae), em análise qualitativa, e também observaram que todas elas apresentaram capacidade de solubilizar fosfato.

Tabela 1. Produção de fitoestimulantes por morfotipos de *Streptomyces* spp. isoladas de *Aniba parviflora* Syn. *A. fragans* (Macacaporanga), em área de transição entre floresta ombrófila densa e Savana, no município de Santarém-PA.

Isolado	Ácido Indolacético (AIA)	Amônia (NH ₃)	Fosfatase	Solubilização de Fosfato	Sideróforos
	168 h	48 h	120 h	37°C	336 h
	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C±2°C
MPO1	+	-	+	+	-
MPO2	+	-	+	+	-
MPO3	-	-	-	+	-
MPO4	-	-	-	+	-
MPO5	-	-	-	+	-
MPO6	-	+	+	+	-
MPO7	-	+	-	+	-
MPO8	-	+	-	+	-
MPO10	-	-	+	+	-
MPO11	+	-	+	+	+

Positivo (+) Negativo (-)

■ CONCLUSÃO

As cepas de actinobactérias isoladas da rizosfera de *Aniba parviflora* A. Syn *Fragans* na Amazônia produzem substâncias fitoestimulantes, com destaque para *Streptomyces* spp. MPO 11, produtora de sideróforos e ácido indol-3-acético, além de apresentar capacidade de solubilizar fosfato, característica esta que interfere positivamente na fisiologia vegetal.

■ REFERÊNCIAS

ALEXANDER, D. B.; ZUBERER, D. A. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. **Biology and Fertility of Soils**, 12, n. 1, p. 39-45, 1991.

ARIS TRI WAHYUDI, JEPRI AGUNG PRIYANTO, RESTI AFRISTA, DENI KURNIATI, RIKA INDRI ASTUTI, ALINA, A. Plant Growth Promoting Activity of Actinomycetes Isolated from Soybean Rhizosphere. **OnLine Journal of Biological Sciences**, (19, n. 1, p. 1-8, Jan. , pub_date = 2020-04-09 2019.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. D. P.; MACHADO, B. D. C. Sideróforos: uma resposta dos microorganismos. **Química Nova**, 25, n. 6B, p. 1155-1164, 2002.

BENTLEY, S. D.; CHATER, K. F.; CERDEÑO-TÁRRAGA, A. M.; CHALLIS, G. L. *et al.* Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Nature**, 417, n. 6885, p. 141-147, 2002.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World J Microbiol Biotechnol**, 28, n. 4, p. 1327-1350, Apr 2012.

CRUZ, J.; SOUZA, L.; PELACANI, C. Influência da adubação fosfatada sobre o crescimento do camapu (*Physalis angulata* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 17, p. 360-366, 2015.

DA SILVEIRA, A. P. D.; IÓRIO, R. P. F.; MARCOS, F. C. C.; FERNANDES, A. O. *et al.* Exploitation of new endophytic bacteria and their ability to promote sugarcane growth and nitrogen nutrition. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 112, n. 2, p. 283-295, Feb 2019.

DAGNAW, F.; ASSEFA, F.; GEBREKIDAN, H.; ARGAW, A. Characterization of plant growth promoting bacteria from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) rhizosphere of Wonji-Shoa Sugar Estate and farmers landraces of Ethiopia. **Biotechnology**, 14, n. 2, p. 58, 2015.

GLICKMANN, E.; DESSAUX, Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Appl Environ Microbiol**, 61, n. 2, p. 793-796, Feb 1995.

GOPALAKRISHNAN, S.; SRINIVAS, V.; ALEKHYA, G.; PRAKASH, B. *et al.* The extent of grain yield and plant growth enhancement by plant growth-promoting broad-spectrum *Streptomyces* sp. in chickpea. **Springerplus**, 4, p. 31, 2015.

HAMDALI, H.; HAFIDI, M.; VIROLLE, M. J.; OUHDOUCH, Y. Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24, n. 11, p. 2565-2575, 2008.

HORSTMANN, J. L. **Caracterização de isolados de *Streptomyces* spp. provenientes de raízes de Fabaceae como rizobactérias promotoras de crescimento e indutoras de respostas de defesa em soja [*Glycine max* (L.) Merrill].** 2017. -, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

J B NEILANDS, A.; LEONG, S. A. Siderophores in Relation to Plant Growth and Disease. **Annual Review of Plant Physiology**, 37, n. 1, p. 187-208, 1986.

- KAVAMURA, V. N.; SANTOS, S. N.; SILVA, J. L.; PARMA, M. M. *et al.* Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiol Res**, 168, n. 4, p. 183-191, May 6 2013.
- KUMAR, V.; BHARTI, A.; NEGI, Y. K.; GUSAIN, O. *et al.* Screening of actinomycetes from earthworm castings for their antimicrobial activity and industrial enzymes. **Braz J Microbiol**, 43, n. 1, p. 205-214, Jan 2012.
- LINS, C. V.; DE ARAÚJO, J. M. Mahanty T, Bhattacharjee S, Goswami M, Bhattacharyya P, Das B, Ghosh A, *et al.* Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2017;24(4):3315-35
- LOQMAN, S.; BARKA, E. A.; CLÉMENT, C.; OUHDOUCH, Y. Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 25, n. 1, p. 81-91, 2009.
- MEENA, B.; RAJAN, L. A.; VINITHKUMAR, N. V.; KIRUBAGARAN, R. Novel marine actinobacteria from emerald Andaman & Nicobar Islands: a prospective source for industrial and pharmaceutical byproducts. **BMC Microbiol**, 13, p. 145, 2013.
- MORRISSEY, J.; GUERINOT, M. L. Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. **Chem Rev**, 109, n. 10, p. 4553-4567, Oct 2009.
- PONTES, A. P.; SOUZA, R. D.; GRANADA, C. E. Screening of plant growth promoting bacteria associated with barley plants (*Hordeum vulgare* L.) cultivated in South Brazil. **Biota Neotropica**, 15, n. 2, 2022/03/01 2015.
- PRIDHAM, T. G.; ANDERSON, P.; FOLEY, C.; LINDENFELSER, L. A. *et al.* A selection of media for maintenance and taxonomic study of Streptomyces. **Antibiot Annu**, p. 947-953, 1956.
- PROCÓPIO, R. E.; SILVA, I. R.; MARTINS, M. K.; AZEVEDO, J. L. *et al.* Antibiotics produced by Streptomyces. **Braz J Infect Dis**, 16, n. 5, p. 466-471, Sep-Oct 2012.
- RIBEIRO, C. M.; CARDOSO, E. J. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). **Microbiol Res**, 167, n. 2, p. 69-78, Jan 20 2012.
- ROCHA, W. S.; SANTOS, M. M. D.; COLONIA, B. S. O.; CHAGAS JUNIOR, A. F. The ability of rhizobacteria to solubilize phosphate and synthesize of indoleacetic acid in cowpea. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, 13, n. 1, p. 116 - 121, 2022/03/01 2018.
- RODRIGUES, A. A.; FORZANI, M. V.; SOARES, R. D. S.; SIBOV, S. T. *et al.* Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. **Tropical agricultural research**, 46, p. 149-158, 2016.
- SOUZA, J. C. D.; RESCAROLLI, C. L. D. S.; NUNEZ, C. V. Produção de metabólitos secundários por meio da cultura de tecidos vegetais. 2018.
- VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; TAUCH, A.; CHANDRA, G. *et al.* Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology and molecular biology reviews**, 71, n. 3, p. 495-548, 2007.

VERMA, J.; YADAV, J.; TIWARI, K.; LAVAKUSH, S. *et al.* Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. **International journal of agricultural research**, 5, n. 11, p. 954-983, 2010.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **J Biotechnol**, 91, n. 2-3, p. 127-141, Oct 4 2001.

YOUNG, L.-S.; HAMEED, A.; PENG, S.-Y.; SHAN, Y.-H. *et al.* Endophytic establishment of the soil isolate Burkholderia sp. CC-A174 enhances growth and P-utilization rate in maize (*Zea mays* L.). **Applied Soil Ecology**, 66, p. 40-47, 2013.

Prospecção de biossurfactantes a partir de *Streptomyces* sp. isolados da rizosfera de *Aniba parviflora Fragans* (macacaporanga)

- | **Amanda de Lima Silva**
Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA
- | **José Jeosafá de Sousa Júnior**
Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA
- | **Sara Freitas de Sousa Ramos**
Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA
- | **Silvia Katrine Rabelo da Silva**
Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA
- | **Raphael Carlos Ferrer de Santana**
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

RESUMO

Cresce a procura por fontes naturais de produtos para os mais diversos usos, como indústrias e métodos de biorremediação, visto que os bioprodutos apresentam vantagens como menor toxicidade e geração de resíduos. Dentre os microrganismos geradores de bioprodutos estão as actinobactérias, reconhecidas por produzirem uma diversidade de moléculas bioativas como antibióticos, antitumorais, enzimas e biossurfactantes. **Objetivo:** Neste estudo foi verificada a capacidade de cepas de actinobactérias isoladas da rizosfera de *Aniba parviflora* Syn Fragans, em produzir substâncias biossurfactantes, avaliando sua ação emulsificante em substratos lipídicos e fósseis. **Método:** As cepas bacterianas foram isoladas e identificadas através de dados morfológicos, bioquímicos e moleculares. Posteriormente, foi realizada a seleção das cepas produtoras das enzimas lipase e esterase, sendo que as cepas com maiores índices enzimáticos foram selecionadas para os testes de produção de biossurfactantes. **Resultados:** Os 11 isolados foram identificadas como pertencentes ao gênero *Streptomyces* sp., e os valores de índice de emulsificação encontrados são promissores quando comparadas a estudos com o gênero *Bacillus*. **Conclusão:** A maior ação emulsificante foi registrada para o líquido do cultivo bacteriano das cepas *Streptomyces* sp. MPO2 e *Streptomyces* sp. MPO11, indicando que a ação biossurfactante seja resultante de moléculas associadas à biomassa bacteriana.

Palavras-chave: *Streptomyces* sp., Emulsão, Óleos Vegetais, Biossurfactante.

■ INTRODUÇÃO

A Amazônia constitui-se de um enorme conjunto de ecossistemas de diferentes dimensões e complexidades nas interações ambientais. Dessa forma, torna-se uma grande contribuinte para a regulação da dinâmica ambiental global (Miguel, 2007). A região Amazônica é apontada como detentora de uma importante biodiversidade, o que desperta o interesse da indústria farmacêutica na prospecção de substâncias bioativas aplicáveis em processos industriais em setores produtivos (Diniz, 2019).

A obtenção de bioprodutos de microrganismos potencialmente exploráveis tem possibilitado o desenvolvimento de tecnologias de grande aplicação em diversos ramos da indústria, como por exemplo, a produção de compostos químicos como álcool, ácido acético, biogás; bioinseticidas, inoculantes agrícolas, enzimas como lipase, amilase e proteases; biossurfactantes, antibióticos, anti-inflamatórios e antiparasitários (Canhos e Manfio, 2001; Barnum, 2005).

Entre as substâncias microbianas de interesse, destacam-se moléculas biossurfactantes, que apresentam caráter anfipático. Estas moléculas despertam grande interesse devido sua aplicação na redução da tensão superficial e interfacial, formando microemulsões onde hidrocarbonetos podem ser solubilizados. Moléculas surfactantes podem ser obtidas de origem sintética, a partir de sínteses químicas, ou biológicas, classificadas como biossurfactantes.

Os biossurfactantes apresentam grande capacidade de detergência, emulsificação e formação de espuma, tornando-se de grande interesse para a indústria (Greek, 1990), além de sua aplicação em diversos processos, diferentemente dos surfactantes sintéticos. São descritas aplicações de biossurfactantes na proteção ambiental (Rahman *et al.*, 2002), biodegradabilidade (Costa *et al.*, 2006) e formação de espuma em ampla faixa de temperatura e pH (Banat, 1995). Além disso, os biossurfactantes são utilizados como antimicrobianos por possuir ação desestabilizante da parede celular de alguns microrganismos (Nitschke, 2004).

Biossurfactantes de origem microbiana possuem algumas vantagens quando comparados àqueles de origem química, como maior biodegradabilidade, baixa toxicidade, maior taxa de redução da tensão superficial, estabilidade térmica, estabilidade quando submetidos a valores extremos de pH. Além disso, são produzidos a partir de substratos renováveis e passíveis de modificação estrutural através da engenharia genética ou de técnicas bioquímicas (Colla, 2007).

Muitos microrganismos são capazes de produzir moléculas biossurfactantes com ação bactericida, fungicida e herbicida, além de apresentar alta capacidade de detergência. Dentre eles, estão as actinobactérias, que são microrganismos de grande interesse biotecnológico devido sua versatilidade metabólica, de onde são obtidos diversos metabólitos secundários de estrutura química e ação biológica variada. Actinobactérias são bactérias Gram-positivas,

filamentosas, com grande distribuição no solo, onde exercem papel fundamental na ciclagem de nutrientes através da ação de suas diversas enzimas hidrolíticas e lipolíticas sobre a matéria orgânica (Nguyen *et al.*, 2015).

Dos 23.000 metabólitos secundários descritos produzidos por microrganismos cerca de 10.000 são metabólitos bioativos produzidos por Actinobactérias, sendo que o gênero *Streptomyces* é responsável pela produção de mais de 70% destes compostos (Arasu *et al.*, 2009; Jorgensen *et al.*, 2010).

Dentre os mais de 130 gêneros de actinobactérias, o gênero *Streptomyces* sp. se destaca na produção de diversas moléculas bioativas como antibióticos (Dastager *et al.*, 2008; Ruan, 2013), antitumorais, antiparasitários, vitaminas, biossurfactantes e enzimas de interesse industrial como lipases, pectinases, amilases (Manivasagan *et al.*, 2015).

É crescente a preocupação com a prospecção e desenvolvimento de novos produtos de origem biológica visto as vantagens que estes apresentam sobre os sintéticos. Assim, a microbiota Amazônica vem sendo cada vez mais explorada e tem demonstrado ser uma inesgotável fonte de moléculas bioativas com as mais diversas aplicações.

Tendo em vista o grande potencial Amazônico e a possibilidade de obter uma diversidade de moléculas produzidas por actinobactérias, este estudo buscou isolar actinobactérias do gênero *Streptomyces* sp. presentes na rizosfera de *Aniba parviflora* Syn *Fragans* (macacaporanga) e avaliar a capacidade de produção de substâncias biossurfactantes.

■ MÉTODO

Isolamento, caracterização fenotípica e identificação molecular

As actinobactérias foram isoladas a partir da inoculação de 100 μ L de suspensões microbianas preparadas a partir de 10 g de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *Fragans* (macacaporanga) em tampão fosfato (PBS). A amostra de solo foi coletada em uma zona de transição de floresta ombrófila densa e savana (Latitude 20 28' 01.28" S e Longitude 54 49' 45.32" O) na cidade de Santarém, Pará, Brasil.

A suspensão microbiana foi obtida por agitação mecânica a 180 rpm por 30 minutos, e posteriormente preparado diluições para obtenção das suspensões de semeadura nas concentrações 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵.

O meio de isolamento foi Agar Asparagina Levedura (ALA) (Nonomura e Ohara, 1969) suplementado com Nistatina (64 μ g/mL), sendo as placas inoculadas e mantidas em estufa bacteriológica durante 21 dias a 37°C. As colônias de actinobactérias foram previamente selecionadas através de caracteres fenotípicos das colônias, seguindo os padrões de colônias

pequenas, rígidas, opacas, com formação de micélio aéreo compacto e rasteiro, além da produção de pigmento (Williams *et al.*, 1983).

Após obtenção das culturas puras, foram realizadas análises bioquímicas (Williams *et al.*, 1989) e morfológicas através da técnica de Gram e microcultivo (Holt *et al.*, 1994) seguido de microscopia de luz comum e microscopia eletrônica de varredura (MEV), para caracterização da cadeia de esporos.

O DNA bacteriano foi extraído conforme descrito por (Stirling, 2003) a partir de 5 ml de suspensão celular obtida após 72h de cultivo em meio líquido ISP2. Para a reação de amplificação foram utilizados os pares de oligonucleotídeos Eub338F/Act1159R seguindo os passos: 95°C (3'); 35 ciclos de 94°C (30''), 68°C (30''), 72°C (90''); extensão de 72°C (7'). E para o par fD1/rD1: 95°C (3'); 30 ciclos de 94°C (1'), 55°C (30''), 72°C (2'); extensão de 72°C (7'). O produto da PCR foi purificado utilizando o kit GFX (GE Healthcare 28-9034-70) e subclonado no vetor CRTM2.1-TOPO® vector utilizando o kit TOPO TA Cloning (ThermoFisherScientific 451641).

Para o sequenciamento foram utilizados os oligonucleotídeos M13F (GTAAAACGACGGCCAGT) e M13R (AACAGCTATGACCATG) para todos os fragmentos subclonados. O completo sequenciamento do gene 16S RNAr foi realizado com os oligonucleotídeos (Lane, 1991) 341-357F (CCTACGGGAGGCAGCAGCAG), 685-704f (GTAGSGGTGAAATACGTAGA) e 1099-1114f (GCAACGAGCGCAACCC), por sequenciamento Sanger, realizado no sequenciador ABI PRISM 3730 DNA ANALYZER (AppliedBiosystems/Hitashi) no Laboratório de Genômica e Elementos de Transposição (GaTE) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (<http://gate.ib.usp.br/GateWeb-new/>).

Seleção preliminar de actinobactérias produtoras de biossurfactantes

Para a triagem de bactérias produtoras de biossurfactantes, foi inicialmente realizada uma seleção observando a capacidade de produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas. As colônias bacterianas obtidas do cultivo de 196h em meio ISP2 foram inoculadas nos meios de cultura contendo os respectivos substratos para produção das enzimas lipase (Sierra, 1957), esterase (Sierra, 1957) e hemolisinas (Carrillo *et al.*, 1996). O índice enzimático foi determinado a partir da relação entre o diâmetro do halo enzimático e o diâmetro da colônia, sendo considerados com potencial enzimático valor superior a 1.5 (Hankin & Anagnostakis, 1975).

Avaliação da produção de biossurfactante

As cepas de actinobactérias selecionadas pelo maior índice enzimático foram cultivadas sob agitação contínua de 180 rpm por 120 h a 30°C em Erlenmeyer (500 mL) contendo 180 ml do meio Caldo Nutriente (CN) aditivado com (1%) de azeite de oliva.

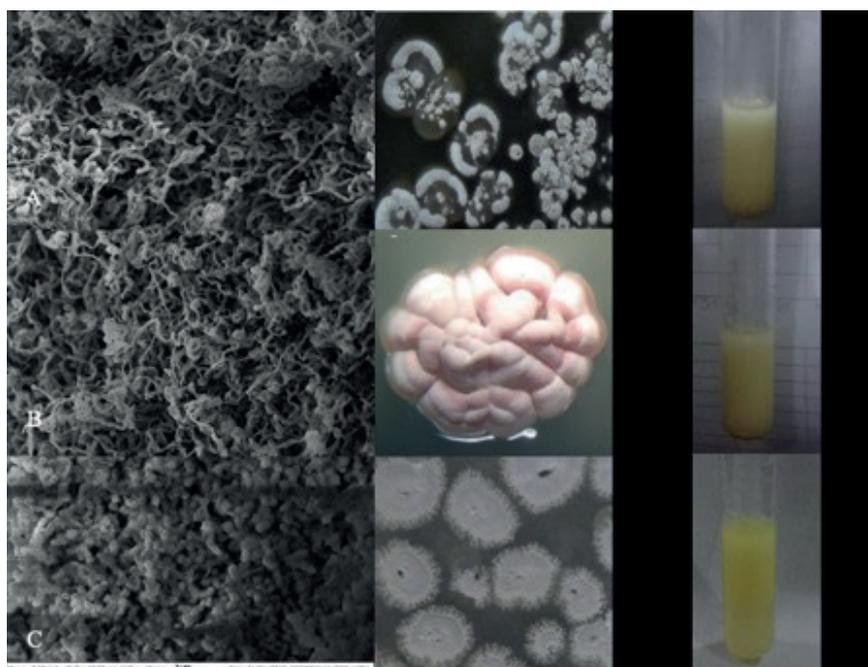
A avaliação da produção de biossurfactante foi verificada pela capacidade tanto da suspensão microbiana, quanto do líquido metabólico livre de células, em emulsionar substratos lipídicos óleo diesel (OD), óleo de motor (OM), óleo de canola (OCA), óleo de milho (OM), óleo de girassol (OG) e óleo de soja (OS). Para tanto, foi preparado uma mistura a partir de 2 mL da suspensão bacteriana e 2 mL dos substratos, por agitação mecânica em vórtex durante 2 minutos. Após 24h foi verificado o índice de emulsificação (E24), resultado da razão entre a altura da camada de emulsão e a altura total, multiplicada por 100 (Cooper & Goldenberg, 1975).

■ RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento, cultivo e manutenção

Foram isoladas 11 cepas de actinobactérias, apresentando variada coloração do micélio aéreo e micélio vegetativo, com desenvolvimento de colônias velutas e pulverulentas. As cepas isoladas são Gram-positivas e a morfologia da cadeia de esporos variou nos padrões reta, flexuosa e *Retinaculum apertum*, padrões característicos do gênero *Streptomyces*. Esses dados foram corroborados com a análise molecular do gene RNAr 16S evidenciando similaridade acima de 96% com o gênero *Streptomyces* sp. As cepas *Streptomyces* MPO6, *Streptomyces* MPO8 produzem pigmentos difusos no meio ISP2, e a *Streptomyces* MPO11 em meio ISP4.

Figura 1. Morfologia bacteriana dos isolados selecionados. I. Microscopia eletrônica de varredura (MEV). II. Colônias bacterianas cultivadas em meio ISP2. III. Registro da emulsão formada em óleo de soja. **A.** *Streptomyces* sp. MPO 2. **B.** *Streptomyces* sp. MPO6. **C.** *Streptomyces* sp. MPO11.



Fonte: Autores.

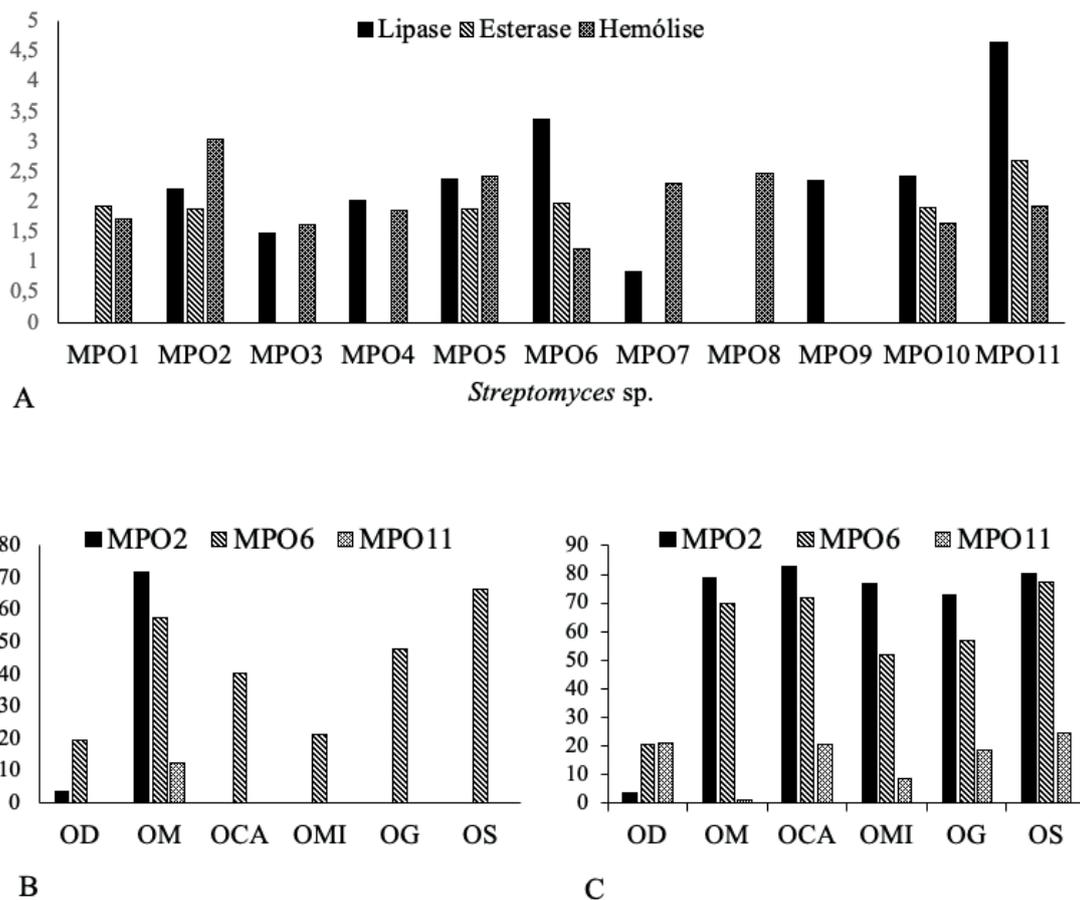
As 11 cepas de *Streptomyces* sp. produziram colônias na maior parte dos meios de cultura testados, com exceção da cepa *Streptomyces* sp. MPO6 que coloniza apenas o meio ISP2 (Tabela 1). Foi observada a tolerância dos isolados em colonizar meios contendo NaCl em concentração variando entre 5 e 9%.

Cepas produtoras de enzimas biossurfactantes

As cepas de *Streptomyces* sp. isoladas produzem pelo menos uma das enzimas relacionadas à ação surfactante, com destaque para a cepa *Streptomyces* MPO11 que apresentou maior índice enzimático para lipase e esterase (Figura 2).

As cepas *Streptomyces* sp. MPO2, *Streptomyces* sp. MPO6 e *Streptomyces* sp. MPO11 selecionadas na triagem apresentaram maior capacidade de emulsificação de em todos os substratos lipídicos de origem vegetal e somente a cepa *Streptomyces* sp. MPO11 não emulsionou Óleo Diesel. Foi também determinado que o líquido contendo a biomassa bacteriana apresentou maior capacidade de emulsão (figura 2).

Figura 2. A: Índices enzimáticos registrados na triagem em meio sólido para as cepas de *Streptomyces* sp. B: Índices de emulsificação (IE24) do líquido livre de células; C: Índices de Emulsificação (IE24) do cultivo bacteriano. (OD: óleo diesel; OM: óleo de motor; OCA: óleo de canola; OMI: óleo de milho; OG: óleo de girassol; OS: óleo de soja).



Fonte: Autores.

O solo é uma importante fonte de microrganismos, os quais participam de diversas reações metabólicas, promovendo a ciclagem de nutrientes, sendo, portanto, indispensáveis na manutenção da qualidade desse ambiente. Actinobactérias do gênero *Streptomyces* tem sido frequentemente isoladas a partir de amostras de solo, apresentando colônias bacterianas de aspecto variado quanto a coloração do micélio e produção de pigmentos nos meios International *Streptomyces* Project, principalmente ISP2 (RASHAD, 2015). OSKAY (2004) isolou 50 cepas de *Streptomyces* de uma amostra de solo de uma fazenda na Turquia, onde as cepas apresentaram diferentes colorações de micélio aéreo e vegetativo, sendo a maioria delas produtoras de moléculas com atividade antagônica frente a microrganismos patogênicos.

A produção de enzimas como esterases e lipases por *Streptomyces* sp. têm sido descritas por Karanja *et al.* (Karanja *et al.*, 2012) que isolaram de uma amostra de solo do Quênia, quatro cepas produtoras de diversas enzimas de interesse industrial, entre elas a lipase. Malviya *et al.* (Malviya *et al.*, 2013) também descrevem o potencial enzimático de actinobactérias isoladas de um ambiente extremo no nordeste do Himalaia na Índia, produtoras

das enzimas catalase, lipase, gelatinase e amilase, evidenciando a habilidade desse grupo de bactérias em produzir enzimas com propriedade surfactante.

Quando verificado a ação biossurfactante, tanto do cultivo bacteriano quanto do líquido metabólico livre de células das cepas *Streptomyces* sp. MPO2, *Streptomyces* sp. MPO6 e *Streptomyces* sp. MPO11, foi constatada sua ação emulsificante nos substratos lipídicos de origem vegetal e fóssil. Os substratos hidrofóbicos vegetais com maior emulsificação foram os óleos de canola e soja, a partir do cultivo bacteriano da cepa *Streptomyces* sp. MPO2, com IE24 de 82,7% e 80,3%, respectivamente.

O substrato óleo lubrificante de motor foi emulsificado pela mesma cepa, com IE24 de 78,8%. Estes valores são superiores quando comparados com os valores encontrados por SANTOS (2012), que ao estudar biossurfactantes produzidos por actinobactérias isoladas de líquens da Amazônia, obteve IE24 de 35% para o óleo de canola e 60% para o óleo de soja. ELKHAWAGA (2018) obteve um IE24 de aproximadamente 40% para óleos de milho, soja e girassol, resultados inferiores aos obtidos com a cepa *Streptomyces* sp. MPO2, que apresentou um IE24 acima de 70%.

Tomando como referência a ação emulsificante do gênero *Bacillus*, grupo de maior potencial na produção de biossurfactantes, a ação emulsificante de *Bacillus subtilis* observada por Rovina (2018) ainda se apresenta inferior, correspondendo a IE24 de 5,56% para óleo de soja. Ao mesmo passo, Soares (2014) ao estudar a mesma espécie, obteve um IE24 de 62,4% para o mesmo substrato.

Streptomyces sp. MPO2 apresentou o maior índice enzimático para hemolisinas, sendo também a cepa que apresentou maior capacidade de emulsificação para todos os óleos testados, corroborando com a pesquisa de Carrillo e colaboradores (1998), que sugeriram que existe uma correlação entre a produção de hemolisinas e biossurfactantes, uma vez que ao testarem 86 bactérias (hemolíticas e não hemolíticas) para a produção de biossurfactante, obtiveram resultados positivos para apenas cinco bactérias, sendo todas pertencentes ao conjunto de bactérias hemolíticas.

Segundo Youssef e colaboradores (2004), para que um microrganismo seja considerado promissor na produção de biossurfactante, resultados de IE24 acima de 40% devem ser encontrados. Desta forma, pode-se afirmar que as cepas de *Streptomyces* sp. isoladas neste estudo apresentam a promissora habilidade em formar bioemulsões.

■ CONCLUSÃO

Nesse estudo é descrito pela primeira vez a habilidade de cepas de actinobactérias isoladas da rizosfera de *Aniba parviflora* em produzir substâncias biossurfactantes. Os valores de índice de emulsificação encontrados são promissores quando comparados a estudos

com o gênero *Bacillus*, e a maior ação emulsificante foi registrada para o líquido do cultivo bacteriano das cepas *Streptomyces* sp. MPO2 e *Streptomyces* sp. MPO11. Visto que, substâncias biossurfactantes de origem microbiana podem ser extracelulares ou constituírem a membrana celular de uma variedade de leveduras, bactérias e fungos filamentosos, sugere-se que a ação biossurfactante aqui relatada seja resultante de moléculas associadas à

■ REFERÊNCIAS

ARASU, M. V. et al. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). **Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology**, v. 19, n. 1, p. 22-28, 2009. ISSN 1156-5233.

BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource technology**, v. 51, n. 1, p. 1-12, 1995. ISSN 0960-8524.

BARAKATE, M. et al. Characterization of rhizospheric soil streptomycetes from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 49-54, 2002.

BARNUM, S. R. **Biotechnology: an introduction**. Brooks/Cole Publishing Company, 2005. ISBN 0534492967.

CAFARO, M. J. et al. Specificity in the symbiotic association between fungus-growing ants and protective *Pseudonocardia* bacteria. **Proc Biol Sci**, v. 278, n. 1713, p. 1814-22, Jun 22 2011. ISSN 0962-8452.

CANHOS, V. P.; MANFIO, G. P. Recursos microbiológicos para Biotecnologia. **URL: [http://www.mct.gov.br/Temas/biotec/Tendencias% 20_Vanderlei% 20Fina_. pdf](http://www.mct.gov.br/Temas/biotec/Tendencias%20_Vanderlei%20Fina_.pdf)**, 2001.

CARRILLO, P. et al. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 82-84, 1996. ISSN 0959-3993.

CHIANI, M. et al. Optimization of culture medium to increase the production of desferrioxamine B (Desferal) in *Streptomyces pilosus*. **Pak J Biol Sci**, v. 13, n. 11, p. 546-50, Jun 1 2010. ISSN 1028-8880 (Print) 1028-8880.

COLLA, L. M.; COSTA, VIEIRA J.A.. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **VETOR-Revista de Ciências Exatas e Engenharias**, v. 13, n. 1, p. 85-104, 2007.

COOPER, David G.; GOLDENBERG, Beena G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.

COSTA, S. G. et al. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 483-488, 2006. ISSN 1359-5113.

DASTAGER, S. G. et al. Proteolytic activity from an alkali-thermotolerant *Streptomyces gulbargensis* sp. nov. **Curr Microbiol**, v. 57, n. 6, p. 638-42, Dec 2008. ISSN 0343-8651.

- DINIZ, Marcelo Bentes et al. REGIÃO AMAZÔNICA: BIODIVERSIDADE E POSSIBILIDADES DE TRANSFORMAÇÃO INDUSTRIAL. **Cadernos CEPEC**, v. 6, n. 1-6, 2019.
- ELKHAWAGA, M. A. Optimization and characterization of biosurfactant from *Streptomyces griseoplanus* NRRL-ISP 5009 (MS 1). *Journal of applied microbiology*, v. 124, n. 3, p. 691-707, 2018.
- GOODFELLOW, M.; FIEDLER, H. P. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 98, n. 2, p. 119-42, Aug 2010. ISSN 0003-6072.
- GREEK, B. F. Detergent industry ponders products for new decade. **Chemical & Engineering News**, v. 68, n. 5, p. 37-&, 1990. ISSN 0009-2347.
- HOLT, J. et al. Gram-positive cocci. **Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Ed. Williams e Wilkins, p. 544-51, 1994.
- JORGENSEN, H. et al. Insights into the evolution of macrolactam biosynthesis through cloning and comparative analysis of the biosynthetic gene cluster for a novel macrocyclic lactam, ML-449. **Appl Environ Microbiol**, v. 76, n. 1, p. 283-93, Jan 2010. ISSN 0099-2240.
- KARANJA, E. et al. Optimization of growth conditions and characterization of enzymatic activity of selected novel *Streptomyces* species from Kenyan soils. *Scientific Conference Proceedings*, 2012.
- KARUPPIAH, V. et al. Statistical optimization and anticancer activity of a red pigment isolated from *Streptomyces* sp. PM4. **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 3, n. 8, p. 650-6; discussion 655-6, Aug 2013. ISSN 2221-1691 (Print) 2221-1691.
- KIKANI, B. A.; SINGH, S. P. Single step purification and characterization of a thermostable and calcium independent alpha-amylase from *Bacillus amyloliquifaciens* TSWK1-1 isolated from Tulsi Shyam hot spring reservoir, Gujarat (India). **Int J Biol Macromol**, v. 48, n. 4, p. 676-81, May 1 2011. ISSN 0141-8130.
- KIM, B. Y. et al. *Streptomyces cocklensis* sp. nov., a dioxamycin-producing actinomycete. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 62, n. Pt 2, p. 279-83, Feb 2012. ISSN 1466-5026.
- KUESTER, E.; WILLIAMS, S. T. SELECTION OF MEDIA FOR ISOLATION OF STREPTOMYCETES. **Nature**, v. 202, p. 928-9, May 30 1964. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836.
- KUMAR, V. et al. Screening of actinomycetes from earthworm castings for their antimicrobial activity and industrial enzymes. **Braz J Microbiol**, v. 43, n. 1, p. 205-14, Jan 2012. ISSN 1517-8382 (Print) 1517-8382.
- LANE, D. 16S/23S rRNA sequencing. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**, p. 125-175, 1991.
- LUCAS, X. et al. StreptomeDB: a resource for natural compounds isolated from *Streptomyces* species. **Nucleic Acids Res**, v. 41, n. Database issue, p. D1130-6, Jan 2013. ISSN 0305-1048.
- MALVIYA, M. K. et al. Characterization and identification of actinomycetes isolated from 'fired plots' under shifting cultivation in northeast Himalaya, India. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 561-569, 2013. ISSN 1590-4261.

MANIVASAGAN, P. et al. Production of alpha-amylase for the biosynthesis of gold nanoparticles using *Streptomyces* sp. MBRC-82. **Int J Biol Macromol**, v. 72, p. 71-8, Jan 2015. ISSN 0141-8130.

MARTINS, Vilásia Guimarães; KALIL, Susana Juliano; COSTA, Jorge Alberto Vieira. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. 2008.

MIGUEL, Laís Mourão. **Uso sustentável da biodiversidade na Amazônia Brasileira: experiências atuais e perspectivas das bioindústrias de cosméticos e fitoterápicos**. 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

_____. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. **Microbiol Res**, v. 169, n. 4, p. 262-78, Apr 2014. ISSN 0944-5013.

NGUYEN, X. H. et al. Antagonism of antifungal metabolites from *Streptomyces griseus* H7602 against *Phytophthora capsici*. **J Basic Microbiol**, v. 55, n. 1, p. 45-53, Jan 2015. ISSN 0233-111x.

NITSCHKE, Marcia; PASTORE, Glaucia Maria. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource technology**, v. 97, n. 2, p. 336-341, 2006.

NONOMURA, H.; OHARA, Y. The distribution of actinomycetes in soil. VI. A selective plate culture isolation method for *Microbispora* and *Streptosporangium* strains Part I. **J. Ferm. Technol**, v. 47, p. 463-469, 1969.

OSKAY, A. Mustafa; ÜSAME, Tamer; CEM, Azeri. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African journal of Biotechnology*, v. 3, n. 9, p. 441-446, 2004.

PETROVA, D.; VLAHOV, S. Taxonomic characterization of the thermophilic actinomycete strain 21E producer of thermostable Collagenase. 2013.

PRAKASH, D. et al. Actinomycetes: a repertory of green catalysts with a potential revenue resource. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 264020, 2013.

PRIDHAM, T.; HESSELTINE, C.; BENEDICT, R. A guide for the classification of streptomycetes according to selected groups. Placement of strains in morphological sections. **Applied microbiology**, v. 6, n. 1, p. 52, 1958.

RAHMAN, K. et al. Rhamnolipid Biosurfactant Production by Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Using Low-Cost Raw Materials. **Biotechnology progress**, v. 18, n. 6, p. 1277-1281, 2002. ISSN 1520-6033.

RASHAD, F. M. et al. Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematocidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. **Microbiol Res**, v. 175, p. 34-47, Jun 2015. ISSN 0944-5013.

RIGO, E. et al. Application of different lipases as pretreatment in anaerobic treatment of wastewater. **Environmental Engineering Science**, v. 25, n. 9, p. 1243-1248, 2008. ISSN 1092-8758.

ROVINA, Fernanda; EHRHARDT, Daniela Diniz; TAMBOURGI, Elias Basile. Utilização do resíduo da casca de laranja para produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*. *Scientia Plena*, v. 14, n. 4, 2018.

RUAN, J. [Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (second edition) Volume 5 and the study of Actinomycetes systematic in China]. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, v. 53, n. 6, p. 521-30, Jun 4 2013. ISSN 0001-6209 (Print) 0001-6209.

SANTOS, E. F. *et al.* Produção, caracterização e aplicação biológica do biossurfactante por *Streptomyces* spp. isolados da Região Amazônia. 2012.

SHIRLING, E. T.; GOTTLIEB, D. Method for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst*, 1966, Citeseer.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 23, n. 1, p. 15-22, 1957. ISSN 0003-6072 (Print) 0003-6072.

SILVA, Alberto Eduardo de Oliveira. Transposição didática: a química dos óleos lubrificantes. 2011.

Soares DWF. Produção e Caracterização de Biossurfactantes Obtidos por Linhagens de *Bacillus* sp. Isolados de Estações de Tratamento de Águas Residuais e de Solo de Manguezais (Ceará- Brasil) [tese de doutorado]. Ceará (CE): Universidade Federal do Ceará; 2014. 162 p.

STIRLING, D. DNA extraction from fungi, yeast, and bacteria. *Methods Mol Biol*, v. 226, p. 53-4, 2003. ISSN 1064-3745 (Print) 1064-3745.

YOUSSEF, Noha H. *et al.* Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of microbiological methods*, v. 56, n. 3, p. 339-347, 2004.

WILLIAMS, S. *et al.* Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *Microbiology*, v. 129, n. 6, p. 1743-1813, 1983. ISSN 1465-2080.

WILLIAMS, S.; SHARPE, M.; HOLT, J. **Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 4. Williams and Wilkins, London.** ISBN 0-68309-061-5. 1989.

Prospecção de linhagens fúngicas produtoras de enzimas hidrolíticas a partir de substratos agroindustriais usados em nutrição animal

- | **Isac Gabriel Cunha dos Santos**
Universidade Federal do Norte do Tocantins - UFNT
- | **Bruna Alexandrino**
Universidade Federal do Norte do Tocantins - UFNT
- | **Eveleise Samira Martins Canto**
Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA
- | **Maurilio Antonio Varavallo**
Universidade Federal do Tocantins - UFT
- | **Taides Tavares dos Santos**
Universidade Federal do Oeste da Bahia - UFOB

RESUMO

Fungos produzem enzimas hidrolíticas, as quais contribuem para o crescimento e adaptação desses organismos a diferentes substratos e condições ambientais. Além da importância ecológica, as enzimas de origem fúngica podem apresentar potencial de emprego biotecnológico e serem aplicadas no desenvolvimento de diversos produtos e/ou processos de interesse para humanidade. **Objetivo:** prospectar fungos a partir de substratos agroindustriais usados para nutrição animal e caracterizá-los quanto ao potencial de produção de enzimas celulolíticas e proteolíticas. **Método:** amostras de grãos de milho triturados e de soja foram adquiridas em mercado local de comercialização de produtos agropecuários e utilizadas para o isolamento e purificação de fungos filamentosos e leveduriformes. Os isolados foram avaliados quanto à produção de celulasas e proteases em meio sólido. **Resultados:** Fungos filamentosos e leveduriformes foram obtidos com sucesso de ambos os substratos. Em relação às contagens populacionais, expressas em UFC/g de substrato, a abundância de fungos filamentosos ($3,6 \times 10^2$ UFC/g de soja e $4,0 \times 10^3$ UFC/g de milho) foi maior que a de leveduras ($3,3 \times 10^2$ UFC/g de soja e $1,0 \times 10^3$ UFC/g de milho). Com relação à produção celulasas, todas as leveduras testadas foram negativas, enquanto todos os fungos filamentosos foram positivos. Em relação à produção de proteases, 25% ($n = 3/12$) dos fungos filamentosos foram positivos. **Conclusão:** diversas estirpes revelaram potencial para produção de celulasas e proteases. Estudos complementares futuros, visando determinar as condições ideais de produção e atividade dessas enzimas, poderão viabilizar o emprego das mesmas no desenvolvimento de produtos e/ou processos biotecnológicos.

Palavras-chave: Biotecnologia, Celulase, Fungos Filamentosos, Leveduras, Protease.

■ INTRODUÇÃO

Uma grande variedade de organismos, tais como fungos filamentosos, bactérias, leveduras e insetos, são capazes de produzir enzimas hidrolíticas (amilases, celulasas, lipases, pectinases, proteases, entre outras) sob condições naturais, as quais são relacionadas à sobrevivência e/ou adaptação desses organismos no ambiente (CORONADO-RUIZ; AVENDAÑO; ESCUDERO-LEYVA; CONEJO-BARBOZA *et al.*, 2018; MA; LU; YAN; XIN *et al.*, 2020; POTHULA; SHIRLEY; PERERA; KLINGEMAN *et al.*, 2019; SANTOS; OLIVEIRA; VITAL; COUCEIRO *et al.*, 2018). Além da importância bioquímica e ecológica, as enzimas hidrolíticas produzidas por esses organismos, sobretudo as de origem microbiana, têm sido empregadas em uma grande variedade de processos biotecnológicos e industriais (CHAARI; CHAABOUNI, 2019; RAVEENDRAN; PARAMESWARAN; BEEVI.U; ABRAHAM *et al.*, 2018; SRIVASTAVA; SRIVASTAVA; MISHRA; GUPTA *et al.*, 2017; THAPA; LI; J; BHATTI *et al.*, 2019).

A maior parte das enzimas hidrolíticas microbianas empregadas em processos industriais é oriunda de fungos filamentosos (CHERRY; FIDANTSEF, 2003; FILIATRAULT-CHASTEL; HEISS-BLANQUET; MARGEOT; BERRIN, 2021; KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002; LI; DILOKPIMOL; KABEL; DE VRIES, 2022; WÖSTEN, 2019). Essa preferência e interesse comercial por enzimas oriundas de fungos filamentosos pode ser justificada, em parte, pelo fato de culturas fúngicas poderem ser facilmente manipuladas em ambientes laboratoriais controlados, o que possibilita a produção de enzimas de interesse industrial em larga escala, com custo relativamente baixo, alta eficiência e estabilidade (EL-GENDI; SALEH; BADIERAH; REDWAN *et al.*, 2021; JAIN; AGRAWAL, 2018; STADLER; KELLER, 2008).

Entre as enzimas hidrolíticas produzidas por fungos filamentosos, as proteases e as celulasas se destacam (SALDARRIAGA; VELASCO-AYALA; FLORES; ROSTRO-ALANIS *et al.*, 2020; THAPA; LI; OHAIR; BHATTI *et al.*, 2019). Proteases são enzimas cuja função catalítica é hidrolisar ligações peptídicas de proteínas em aminoácidos e peptídeos (RAO; TANKSALE; GHATGE; DESHPANDE, 1998). Elas representam a classe de enzimas mais importantes e abundantes produzidas pela indústria de biotecnologia, constituindo mais de 25% das biomoléculas produzidas para aplicação industrial e cerca de 60% de todo o mercado de enzimas (MARTIM; CAVALCANTI; MARIALVA, 2017; NOVELLI; BARROS; FLEURI, 2015). As proteases de origem microbiana são usadas na produção de queijos, no amaciamento de carnes, na produção de hidrolisados proteicos, em produtos de panificação, detergentes e formulações médicas, no beneficiamento do couro e da seda, no tratamento de águas residuais e na recuperação da prata (BANO; DAHOT; NAQVI, 2016; RAVEENDRAN; PARAMESWARAN; BEEVI.U; ABRAHAM *et al.*, 2018; SRILAKSHMI; MADHAVI, 2014).

Por outro lado, enzimas celulolíticas (celulases) são a terceira classe de enzimas mais usadas na indústria depois proteases e amilases (BAJAJ; MAHAJAN, 2019). Tratam-se de biocatalisadores altamente específicas que convertem a celulose em glicose e, estão envolvidos em diversos processos biotecnológicos e industriais de interesse para a humanidade, o que inclui o uso em biorrefinarias e na produção de biocombustíveis, onde as celulases atuam na promoção da hidrólise de biomassa celulósica ou lignocelulósica em açúcares simples, pentose ou hexoses, que são então fermentados para produção de etanol ou bioetanol (ANDLAR; REZIĆ; MARĐETKO; KRACHER *et al.*, 2018; EJAZ; SOHAIL; GHANEMI, 2021; ISIKGOR; BECER, 2015; JAIN; AGRAWAL, 2018). Possuem também aplicação em nutrição animal, contribuindo para o aumento da digestibilidade e, conseqüentemente, do valor nutricional de alimentos fibrosos ingeridos por ruminantes (MURAD; AZZAZ, 2010). Além disso, celulases podem ser utilizadas em indústria têxtil, em indústria de alimentos, na produção de detergentes, entre outras aplicações (AL-GHANAYEM; JOSEPH, 2020; DEVI; KUMAR, 2017; HU; DU; PENSUPA; LIN, 2018).

Fungos filamentosos são altamente versáteis do ponto de vista metabólico e, por isso, podem crescer e se desenvolver em diferentes substratos e condições ambientais (GAO; WENG; ZHU; YUAN *et al.*, 2008; SANTOS; PES; MORAIS, 2021; VIEIRA; BOMTEMPO; SANTIN; PIMENTA *et al.*, 2017). A prospecção desses organismos a partir de substratos ou ambientes ricos em uma substância de interesse particular (por exemplo, fibras celulósicas) pode aumentar a probabilidade de obtenção de novas espécies e/ou estirpes produtoras de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi prospectar fungos (filamentosos e leveduriformes) a partir de substratos agroindustriais usados para nutrição animal e caracterizá-los quanto ao potencial de produção de enzimas celulolíticas e proteolíticas.

■ MÉTODO

Isolamento, purificação e conservação de fungos

Amostras de grãos de milho (*Zea mays* L.) triturados e sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merr.] foram adquiridas em mercado local de comercialização de produtos agropecuários e encaminhadas, em suas embalagens originais, ao Laboratório de Higiene e Saúde Pública da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMVZ), da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), para processamento.

Para o isolamento fúngico, 0,5 g de cada substrato foi adicionado individualmente a placas de Petri (90 x 15 mm) contendo o meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) suplementado com antibiótico (0,1 µg/mL de cefalotina). Um total de cinco placas foram usadas

para cada substrato. Após a inoculação, as placas foram incubadas a 25 ± 3 °C e monitoradas por até sete dias para repicagem dos fungos à medida em que estes cresciam na superfície do meio de cultura. Unidades formadoras de colônias (UFC) de fungos filamentosos e leveduriformes foram caracterizadas morfolologicamente, contadas e purificadas através de repicagens sucessivas em BDA. A técnica de Castellani foi utilizada para preservação de culturas de fungos filamentosos (CASTELLANI, 1939). As leveduras obtidas foram conservadas em meio GYP (2,0 % de glicose, 1,0 % de extrato de levedura e 0,5 % de peptona) adicionado de Glicerol (15,0 %) (SPENCER; SPENCER, 1996).

Caracterização morfológica e identificação dos fungos

Os fungos filamentosos foram caracterizados morfolologicamente e agrupados em morfoespécies de acordo com os critérios propostos na literatura (IBRAHIM; SIEBER; SCHLEGEL, 2017; LACAP-BUGLER; LIEW; HYDE, 2003), que incluem taxa de crescimento, forma e coloração (reverso da placa de Petri e micélio aéreo) das colônias e efeitos dos isolados no meio de cultura. A técnica de microcultivo (KERN; BLEVINS, 1999) foi utilizada para identificar estruturas microscópicas. A produção de conídios foi observada microscopicamente com auxílio da coloração com lactofenol azul de algodão. Ao comparar as características morfológicas com a literatura micológica taxonômica disponível (BARNETT; HUNTER, 1972; CLAYTON, 1977; MENEZES; OLIVEIRA, 1993), foi realizada a identificação dos fungos filamentosos até o menor nível taxonômico possível. As leveduras foram descritas com base na forma, coloração e tamanho das colônias, entre outras características morfológicas relevantes (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT; ROBERT, 2011) e agrupadas em morfoespécies.

A ocorrência de leveduras e fungos filamentosos foi expressa pela quantidade de UFCs. As UFCs foram caracterizadas morfolologicamente, agrupadas em morfoespécies e, quando possível, identificadas em espécies. A frequência de ocorrência (F_o) de morfoespécies ou espécies foi calculada como a porcentagem de uma determinada morfoespécie ou espécie em relação ao total de morfoespécies ou espécies detectadas em cada substrato.

Avaliação de atividade celulolítica

A capacidade de fungos filamentosos degradarem polímeros de celulose foi testada de acordo com a metodologia proposta por Sunitha, Devi & Srinivas (SUNITHA; DEVI; SRINIVAS, 2013). Um representante de cada morfoespécie foi cultivado em BDA por sete dias; em seguida, cada fungo foi inoculado em meio de cultura ágar-carboximetilcelulose (CMC) (glicose: 1,0 g; extrato de levedura: 0,1 g; peptona: 0,5 g; ágar: 16,0 g; 0,5% de CMC; água destilada: 1,0 L). As placas foram incubadas a 25 ± 3 °C durante três a cinco dias. Após esse período, as placas foram lavadas com solução aquosa de vermelho congo a 0,2 %. Após 15 min, a

solução foi descartada e as placas foram lavadas com 5,0 mL de solução de NaCl 1,0 M. A produção de enzimas foi observada pela formação de halos enzimáticos, os quais foram medidos com paquímetro e os resultados expressos em milímetros. O teste foi realizado em triplicata. Para comparar a atividade enzimática entre as diferentes cepas testadas, o Índice de Razão Enzimática (IRE) foi calculado usando a equação $IRE = D/d$, onde D é igual ao diâmetro total (halo + colônia) e d é igual ao diâmetro da colônia, ambos medidos com um paquímetro. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado.

A capacidade de leveduras degradarem polímeros de celulose foi testada de acordo com a metodologia proposta por Strauss *et al.* (2001) (STRAUSS; JOLLY; LAMBRECHTS; RENSBURG, 2001) e Buzzini & Martini (2002) (BUZZINI; MARTINI, 2002), com modificação. Um representante de cada morfoespécie foi previamente reativado em placas de ágar Levedura-Malte (extrato de levedura 0,3 %; extrato de malte 0,3 %; peptona 0,5 %; glicose 1,0 %; ágar 2,0 %; pH 4) e incubadas a $25 \pm 3^\circ\text{C}$ por 48 h. Após a reativação, as estirpes foram inoculadas com placas de Petri contendo meio YP-CMC (extrato de levedura: 10 g; peptona: 20 g; CMC: 4,0 g; ágar: 20 g; água destilada: 1,0 L) e incubadas a $25 \pm 3^\circ\text{C}$ por dez dias. Os halos de hidrólise foram revelados de acordo com Maijala, Fagerstedt & Raudaskoski (1991) (MAIJALA; FAGERSTEDT; RAUDASKOSKI, 1991), onde as placas foram inundadas com 10 mL de solução aquosa de 0,3 g/L de vermelho do Congo (30 min) e descoradas com 5 mL de solução de NaCl 1,0 M (15 min). As estirpes produtoras de enzimas celulolíticas foram identificadas pela presença de um halo translúcido ao redor da colônia, em contraste com a coloração vermelha mais intensa do restante do meio.

Avaliação de atividade proteolítica

A verificação da atividade proteolítica foi realizada utilizando a metodologia proposta por Ribeiro Júnior (2015) (RIBEIRO JUNIOR, 2015). Após cultivo em BDA por sete dias, um representante de cada morfoespécie foi inoculado em placa de Petri contendo o meio de cultura BDA suplementado (9:1) com solução estéril de leite em pó desnatado constituído (10,0%). As placas foram incubadas a $25 \pm 3^\circ\text{C}$ durante cinco dias. O teste foi realizado em duplicata e, na leitura, a presença de um halo translúcido significava que o fungo era proteolítico e, na sua ausência, negativo para atividade proteolítica. A avaliação de atividade proteolítica de leveduras não foi realizada.

■ RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, dois substratos agroindustriais, milho e soja, adquiridos em mercado local e destinados à nutrição animal, foram utilizados para a prospecção de fungos filamentosos e

leveduriformes. A presença desses microrganismos foi constatada em ambos substratos, com contagens populacionais, expressas em UFC/g de substrato, variáveis, isto é, a abundância de fungos filamentosos ($3,6 \times 10^2$ UFC/g de soja e $4,0 \times 10^3$ UFC/g de milho) foi maior que a de leveduras ($3,3 \times 10^2$ UFC/g de soja e $1,0 \times 10^3$ UFC/g de milho). É importante destacar que os substratos agroindustriais utilizados neste estudo estavam expostos para comercialização a granel, isto é, não estavam embalados de forma a evitar a contaminação por microrganismos saprófitos, que poderiam ser carreados pelo ar ou incorporados aos substratos por meio do manuseio durante o período de armazenamento e comercialização. O presente estudo, portanto, não focou em avaliação de qualidade fitossanitária ou segurança alimentar tal como foi realizado previamente por Bento *et al.* (2012) (BENTO; CANEPPELE; DE FIGUEIREDO; KOBAYASTI *et al.*, 2012) e por Gurgel *et al.* (2018) (GURGEL, 2018), que avaliaram a ocorrência de fungos em grãos de milho armazenados, ou por Ferreira *et al.* (2019) (FERREIRA; CARVALHO; FERREIRA; MAVAIEIE *et al.*, 2019) e por Medeiros *et al.*, 2019 (MEDEIROS; FONTES; DA SILVA; DOS SANTOS *et al.*, 2019), que avaliaram qualidade fitossanitária de sementes de soja armazenadas.

Um total de 15 morfoespécies (12 de fungos filamentosos e três de leveduras) foi obtido. Quanto à origem, cinco morfoespécies de fungos filamentosos e dois de leveduras foram associados ao milho, enquanto sete de fungos filamentosos e um de levedura foram associados à soja. Oito morfoespécies puderam ser identificadas até gênero, conforme descrito na Tabela 1 e na Figura 1.

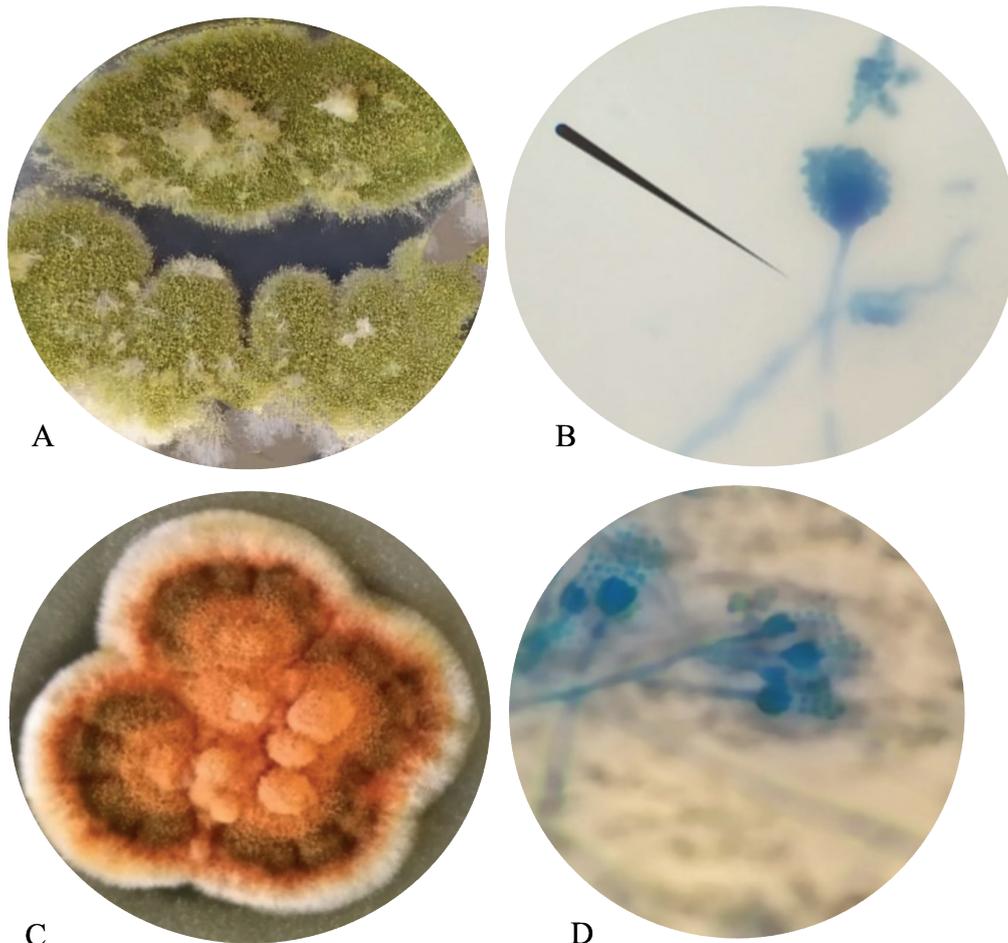
Tabela 1. Espécies ou morfoespécies de fungos filamentosos e leveduras associadas a substratos agroindustriais (milho e soja).

Substrato	Fungos filamentosos por código de coleção	Espécies ou morfoespécies de fungos filamentosos	Fo	%
Milho	M 1.4; M.2.2; M.3.1; M.3.2	<i>Aspergillus</i> spp.	0,333	33,3
	M.3.3	morfoespécie FF1	0,083	8,3
Soja	S.2.3; S.4.7	<i>Aspergillus</i> spp.	0,167	16,7
	S.2.2; S.2.5; S.3.5	<i>Penicillium</i> spp.	0,250	25,0
	S.2.1	morfoespécie FF2	0,083	8,3
	S.2.4	morfoespécie FF3	0,083	8,3
Total			0,999 = 1	99,9 = 100
Substrato	Leveduras por código de coleção	Morfoespécies de leveduas	Fo	%
Corn	M.L.1	morfoespécie Y1	0,333	33,3
	M.L.2	morfoespécie Y2	0,333	33,3
Soybean	S.L.1	morfoespécie Y3	0,333	33,3
Total			0,999 = 1	99,9 = 100

Abreviações: M = milho; S = soja; Fo = frequência de ocorrência.

Fonte: autores.

Figura 1. Detalhes macromorfológicos e fotomicrografias de fungos filamentosos isolados de substratos agroindustriais. A e B: *Aspergillus* sp.; C e D: *Penicillium* sp. Todas as fotomicrografias estão reproduzidas com escala de 20 µm.



Fonte: autores.

A maioria (66,7%) dos isolados obtidos pertence ao gênero *Aspergillus* ou *Penicillium* (Tabela 1), que são dois grupos taxonômicos altamente diversos e que podem ser encontrados nos mais variados ambientes e substratos (solo, água, alimentos, entre outros) e podem assumir os mais variados comportamentos (patogênicos, simbiotes, entre outros) (MIAO; HAN; ZHANG; WANG *et al.*, 2018; NAIK; GOYAL; TRIPATHI; KUMAR, 2021; SANTOS; PES; MORAIS, 2021; YANG; GONG; GUO; JIANG *et al.*, 2021).

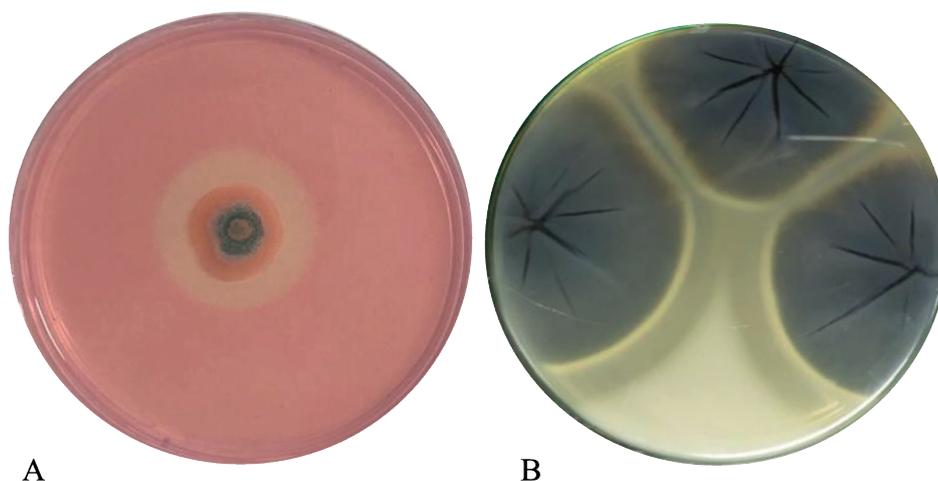
A maior porcentagem de incidência de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* neste estudo reforça a premissa de que os fungos filamentosos detectados são saprófitos, uma vez que ambos são conhecidos por produzirem grande quantidade de esporos assexuados (conídios) que podem se espalhar facilmente pelo ar e se depositar nas mais variadas superfícies. Investigações sobre a presença de fungos em objetos e superfícies ao redor do local onde esses substratos estavam disponíveis poderiam contribuir para a confirmação dessa hipótese.

Em uma avaliação de incidência de fungos filamentosos em sementes de milho em pré e pós-armazenamento, Catão *et al.* (2013) verificaram que fungos dos gêneros *Aspergillus*

e *Penicillium* tiveram a maior porcentagem de incidência, perdendo apenas para fungos do gênero *Fusarium* (CATÃO; MAGALHÃES; SALES; BRANDÃO JUNIOR *et al.*, 2013). Tais achados foram corroborados por Gurgel *et al.* (2018), que também detectaram alta incidência de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Fusarium* em sementes de milho, embora fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Trichoderma* também tenham sido detectados (GURGEL, 2018). No presente estudo, por meio dos métodos utilizados, foi possível identificar apenas fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Técnicas de elucidação taxonômica complementares às morfológicas, tais como as baseadas em biologia molecular, poderão ser empregadas em estudos futuros, visando elucidar a taxonomia dos demais isolados detectados em associação com milho e soja neste estudo.

Com relação à produção de enzimas celulolíticas, todas as leveduras testadas foram negativas, enquanto todos os fungos filamentosos foram positivos. (Fig. 2A). O IRE variou de 1,02 a 3,00 (média \pm desvio padrão = $1,47 \pm 0,14$). As linhagens fúngicas que apresentaram os maiores IRE são mostradas na Tabela 2. Em relação à atividade proteolítica, 25% (n = 3/12) foram positivos (Fig. 2B), as quais foram identificadas como *Penicillium* sp. (S2.5) e *Aspergillus* spp. (M 1.4 e M.2.2).

Figura 2. Halo (zona clara ao redor da colônia de fungos) indicativo de atividade celulolítica positiva (A) ou atividade proteolítica positiva (B).



Fonte: autores.

Tabela 2. Estirpes de fungos filamentosos com maiores IRE e potencial biotecnológico.

Código de coleção / Espécie ou morfoespécie	\varnothing_c^*	\varnothing_h^{**}	IRE	SD ^{***}
S3.5 / <i>Penicillium</i> sp.	15,0	20,2	1,3	0,00
M1.4 <i>Aspergillus</i> sp.	21,5	30,0	1,4	0,09
S2.2 / <i>Penicillium</i> sp.	13,0	20,0	1,5	0,23
S2.5 / <i>Penicillium</i> sp.	14,5	26,0	1,8	0,11
M.3.3 / morfoespécie FF1	8,0	24,0	3,0	0,36

(*) Diâmetro médio da colônia; (**) Diâmetro médio do halo; (***) Desvio padrão do IE.

Fonte: autores.

Em relação às leveduras testadas, todas foram negativas para atividade celulolítica. Entre os fungos, os espécimes filamentosos são melhores decompositores e crescem em substratos com composição quimicamente diversa mais facilmente do que os espécimes de leveduras, que são conhecidos como sapróbios copiotróficos de substratos açucarados (SANTOS; OLIVEIRA; CABETTE; MORAIS, 2019). Ao realizar uma busca na literatura por espécies de leveduras com atividade celulolítica, é de fato possível perceber quão escassos são os relatos quando comparado com fungos filamentosos (BUZZINI; MARTINI, 2002; SANTOS; OLIVEIRA; CABETTE; MORAIS, 2019; VALE; REIS; OLIVEIRA; MOREIRA *et al.*, 2021).

Por outro lado, o fato de todas as linhagens fúngicas testadas apresentarem atividade celulolítica é bastante atraente e instigante, pois pode indicar adaptação dessas linhagens ao substrato/ambiente em que estão crescendo, o que pode ser um indicativo de que a interação ecológica desses fungos com seus substratos pode ir além de uma ocorrência aleatória como microrganismos saprófitos.

É válido destacar que as estirpes fúngicas aqui relatadas como produtoras de celulasas e/ou proteases foram isoladas de substratos agroindustriais. Estudos têm apontado a promissora produção de diversas enzimas fúngicas de interesse comercial, por meio de processos fermentativos, utilizando substratos agroindustriais como farelo de arroz, de trigo, de soja, entre outros (CHUTMANOP; CHUICHULCHERM; CHISTI; SRINOPHAKUN, 2008; NOVELLI; BARROS; FLEURI, 2015; RAVINDRAN; HASSAN; WILLIAMS; JAISWAL, 2018). De maneira geral, os fungos aplicados nesses processos fermentativos de produção de enzimas a partir de substratos agroindustriais são provenientes de coleções de microrganismos, isto é, foram isolados de substratos diferentes daqueles em que serão utilizados e, por isso, precisam ser testados afim de detectar aqueles que melhor se adaptam ao novo substrato. O emprego de fungos filamentosos provenientes do substrato que se pretende utilizar pode representar uma vantagem competitiva, dado que seus repertórios enzimáticos já estarão adaptados para o substrato em questão, aumentando a probabilidade de sucesso do processo produtivo.

Há várias espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* conhecidas por serem capazes de produzir celulasas e/ou proteases, incluindo espécies de interesse industrial, tais como *Aspergillus terreus* (GAO *et al.*, 2008), *Aspergillus niger* (DEVI; KUMAR, 2017; HU; DU; PENSUPA; LIN, 2018), *Aspergillus oryzae* (CHUTMANOP; CHUICHULCHERM; CHISTI; SRINOPHAKUN, 2008), *Penicillium oxalicum* ((VIEIRA; BOMTEMPO; SANTIN; PIMENTA *et al.*, 2017), *P. citrinum*, *P. paxilli* e *P. sclerotiorum* (SANTOS; PES; MORAIS, 2021), entre outras, o que reforça o potencial de interesse biotecnológico das linhagens detectadas neste estudo.

■ CONCLUSÃO

A partir da análise aqui descrita, conclui-se que existe uma grande variedade de fungos associados a substratos agroindustriais utilizados na nutrição animal, que podem e devem ser explorados a partir de diferentes perspectivas. Diversas estirpes apresentaram potencial para produção de enzimas hidrolíticas, com destaque para a estirpe M.3.3 (morfoespécie FF1), que revelou ser uma boa produtora de celulase. Estudos complementares futuros, visando determinar as condições ideais de produção e atividade dessas enzimas, poderão viabilizar o emprego das mesmas no desenvolvimento de produtos e/ou processos biotecnológicos.

■ REFERÊNCIAS

- AL-GHANAYEM, A. A.; JOSEPH, B. Current prospective in using cold-active enzymes as eco-friendly detergent additive. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 104, n. 7, p. 2871-2882, 2020.
- ANDLAR, M.; REZIĆ, T.; MARĐETKO, N.; KRACHER, D. *et al.* Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. **Engineering in life sciences**, 18, n. 11, p. 768-778, 2018.
- BAJAJ, P.; MAHAJAN, R. Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 103, n. 21, p. 8711-8724, 2019.
- BANO, S.; DAHOT, M.; NAQVI, S. H. Optimization of culture conditions for the production of protease by pleurotus eryngii. 13, p. 193-198, 2016.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. Illustrated genera of imperfect fungi. **Illustrated genera of imperfect fungi.**, n. 3rd ed, 1972.
- BENTO, L. F.; CANEPPELE, M. A. B.; DE FIGUEIREDO, M. C.; KOBAYASTI, L. *et al.* Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 71, n. 1, p. 44-49, 2012.
- BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **J Appl Microbiol**, 93, n. 6, p. 1020-1025, 2002.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 42, p. 225-226, 1939.
- CATÃO, H. C. R. M.; MAGALHÃES, H. M.; SALES, N. D. L. P.; BRANDÃO JUNIOR, D. D. S. *et al.* Incidência e viabilidade de sementes crioulas de milho naturalmente infestadas com fungos em pré e pós-armazenamento. **Ciência Rural**, 43, p. 764-770, 2013.
- CHAARI, F.; CHAABOUNI, S. E. Fungal β -1,3-1,4-glucanases: production, properties and biotechnological applications. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 99, n. 6, p. 2657-2664, 2022/03/08 2019.
- CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current opinion in biotechnology**, 14, n. 4, p. 438-443, 2003.

CHUTMANOP, J.; CHUICHULCHERM, S.; CHISTI, Y.; SRINOPHAKUN, P. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, 83, n. 7, p. 1012-1018, 2008.

CLAYTON, Y. M. Medically Important Fungi: A Guide to Identification. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, 70, n. 5, p. 359-359, 1977.

CORONADO-RUIZ, C.; AVENDAÑO, R.; ESCUDERO-LEYVA, E.; CONEJO-BARBOZA, G. *et al.* Two new cellulolytic fungal species isolated from a 19(th)-century art collection. **Sci Rep**, 8, n. 1, p. 7492, May 10 2018.

DEVI, M. C.; KUMAR, M. S. Production, Optimization and Partial purification of Cellulase by *Aspergillus niger* fermented with paper and timber sawmill industrial wastes. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, 2, p. 120-128, 2017.

EJAZ, U.; SOHAIL, M.; GHANEMI, A. Cellulases: From Bioactivity to a Variety of Industrial Applications. **Biomimetics**, 6, p. 44, 2021.

EL-GENDI, H.; SALEH, A.; BADIERAH, R.; REDWAN, E. *et al.* A Comprehensive Insight into Fungal Enzymes: Structure, Classification, and Their Role in Mankind's Challenges. **Journal of Fungi**, 8, p. 23, 2021.

FERREIRA, T.; CARVALHO, M.; FERREIRA, V.; MAVAIEIE, D. *et al.* Sanitary quality of soybean seeds treated with fungicides and insecticides before and after storage. **Journal of Seed Science**, 41, p. 293-300, 2019.

FILIATRAULT-CHASTEL, C.; HEISS-BLANQUET, S.; MARGEOT, A.; BERRIN, J.-G. From fungal secretomes to enzymes cocktails: The path forward to bioeconomy. **Biotechnology Advances**, 52, p. 107833, 2021.

GAO, J.; WENG, H.; ZHU, D.; YUAN, M. *et al.* Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**, 99, n. 16, p. 7623-7629, 2008.

GURGEL, L. M. S. Qualidade Fisiológica e Sanitária de sementes de milho tratadas com produtos alternativos em condições de armazenamento. **Anais da Academia Pernambucana de ciência agrônômica**, 15, n. 1, p. 127-136, 2018.

HU, Y.; DU, C.; PENSUPA, N.; LIN, C. S. K. Optimisation of fungal cellulase production from textile waste using experimental design. **Process Safety and Environmental Protection**, 118, p. 133-142, 2018.

IBRAHIM, M.; SIEBER, T.; SCHLEGEL, M. Communities of fungal endophytes in leaves of *Fraxinus ornus* are highly diverse. **Fungal Ecology**, 29, p. 10-19, 2017.

ISIKGOR, F. H.; BECER, C. R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer Chemistry**, 6, p. 4497-4559, 2015.

JAIN, L.; AGRAWAL, D. Performance evaluation of fungal cellulases with dilute acid pretreated sugarcane bagasse: A robust bioprospecting strategy for biofuel enzymes. **Renewable Energy**, 115, p. 978-988, 2018.

KERN, M.; BLEVINS, K. Micologia Médica. 2 Edição. **Editores Premier, São Paulo**, 256, 1999.

- KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, 13, n. 4, p. 345-351, 2002.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. Chapter 7 - Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts. *In: The Yeasts (Fifth Edition)*. London: Elsevier, 2011. p. 87-110.
- LACAP-BUGLER, D.; LIEW, E. C. Y.; HYDE, K. An evaluation of the fungal 'morphotype' concept based on ribosomal DNA sequences. **Fungal Diversity**, 12, 2003.
- LI, X.; DILOKPIMOL, A.; KABEL, M. A.; DE VRIES, R. P. Fungal xylanolytic enzymes: Diversity and applications. **Bioresour Technol**, 344, n. Pt B, p. 126290, Jan 2022.
- MA, L.; LU, Y.; YAN, H.; XIN, W. *et al.* Screening of cellulolytic bacteria from rotten wood of Qinling (China) for biomass degradation and cloning of cellulases from *Bacillus methylo-trophicus*. **BMC Biotechnology**, 20, 2020.
- MAIJALA, P.; FAGERSTEDT, K. V.; RAUDASKOSKI, M. Detection of extracellular cellulolytic and proteolytic activity in ectomycorrhizal fungi and *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. **New Phytologist**, 117, n. 4, p. 643-648, 2022/03/08 1991.
- MARTIM, S.; CAVALCANTI, L.; MARIALVA, M. Proteases ácidas de cogumelo comestível da Amazônia para aplicabilidade industrial Acid proteases from Amazonian edible mushroom for industrial applications. p. 353-362, 2017.
- MEDEIROS, J. G. F.; FONTES, I. C. G.; DA SILVA, E. C.; DOS SANTOS, P. D. *et al.* Controle de fungos e qualidade fisiológica de sementes de soja (*Glycine max* L.) submetidas ao calor húmido. **Revista de Ciências Agrárias**, 42, n. 2, p. 464-471, 2019.
- MENEZES, M.; OLIVEIRA, S. D. **Fungos fitopatogênicos**. UFRPE, Imprensa Universitária Pernambuco, 1993.
- MIAO, G.-P.; HAN, J.; ZHANG, K.-G.; WANG, S.-C. *et al.* Protection of melon against *Fusarium wilt-root knot* nematode complex by endophytic fungi *Penicillium brefeldianum* HS-1. **Symbiosis**, 77, p. 83-89, 2018.
- MURAD, H.; AZZAZ, H. Cellulase and Dairy Animal Feeding. **Biotechnology**, 9, 2010.
- NAIK, B.; GOYAL, S. K.; TRIPATHI, A. D.; KUMAR, V. Exploring the diversity of endophytic fungi and screening for their pullulanase-producing capabilities. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 19, n. 1, p. 110, 2021.
- NOVELLI, P.; BARROS, M.; FLEURI, L. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. **Food Chemistry**, 198, 2015.
- POTHULA, R.; SHIRLEY, D.; PERERA, O. P.; KLINGEMAN, W. E. *et al.* The digestive system in *Zygentoma* as an insect model for high cellulase activity. **PLoS ONE**, 14, 2019.
- RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, 62, n. 3, p. 597-635, 1998.
- RAVEENDRAN, S.; PARAMESWARAN, B.; BEEVI.U, S.; ABRAHAM, A. *et al.* Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. **Food Technology and Biotechnology**, 56, 2018.

RAVINDRAN, R.; HASSAN, S. S.; WILLIAMS, G. A.; JAISWAL, A. K. A Review on Bio-conversion of Agro-Industrial Wastes to Industrially Important Enzymes. **Bioengineering**, 5, 2018.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C. **Isolamento e identificação da microbiota esporulada e fúngica associada à deterioração do leite**. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2015.

SALDARRIAGA, S.; VELASCO-AYALA, C.; FLORES, P.; ROSTRO-ALANIS, M. *et al.* Biotransformation of lignocellulosic biomass into industrially relevant products with the aid of fungi-derived lignocellulolytic enzymes. **International Journal of Biological Macromolecules**, 161, 2020.

SANTOS, T. T.; OLIVEIRA, D. P.; CABETTE, H. S. R.; MORAIS, P. B. The digestive tract of *Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae) harbours different yeast taxa in Cerrado streams, Brazil. **Symbiosis**, 77, p. 147-160, 2019.

SANTOS, T. T.; OLIVEIRA, K. A.; VITAL, M. S.; COUCEIRO, S. R. M. *et al.* Filamentous fungi in the digestive tract of *Phylloicus* larvae (Trichoptera: Calamoceratidae) in streams of the Brazilian Amazon. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi - Ciências Naturais**, 13, p. 317-325, 2018.

SANTOS, T. T. D.; PES, A. M. O.; MORAIS, P. B. A diverse and partially cellulolytic fungal community contributes to the diet of three species of the aquatic insect *Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae) in Amazonian streams. **An Acad Bras Cienc**, 93, n. suppl 4, p. 1-21, 2021.

SPENCER, J. F.; SPENCER, D. M. Maintenance and culture of yeasts. **Methods Mol Biol**, 53, p. 5-15, 1996.

SRILAKSHMI, J.; MADHAVI, J. Commercial potential of fungal protease: past, present and future prospects. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 2, n. 4, p. 218-234, 2014.

SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, P.; GUPTA, V. K. *et al.* Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 82, 2017.

STADLER, M.; KELLER, N. Paradigm Shifts in Fungal Secondary Metabolite Research. **Mycological research**, 112, p. 127-130, 2008.

STRAUSS, M. L. A.; JOLLY, N.; LAMBRECHTS, M.; RENSBURG, P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **Journal of applied microbiology**, 91, p. 182-190, 2001.

SUNITHA, V.; DEVI, D. N.; SRINIVAS, C. Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. **World Journal of Agricultural Sciences**, 9, n. 1, p. 01-09, 2013.

THAPA, S.; LI, H.; J, O. H.; BHATTI, S. *et al.* Biochemical Characteristics of Microbial Enzymes and Their Significance from Industrial Perspectives. **Mol Biotechnol**, 61, n. 8, p. 579-601, 2019.

VALE, H. M. M. D.; REIS, J. B. A. D.; OLIVEIRA, M. V. D.; MOREIRA, G. A. M. *et al.* Yeasts in native fruits from Brazilian neotropical savannah: occurrence, diversity and enzymatic potential. **Biota Neotropica**, 2021.

VIEIRA, F.; BOMTEMPO, S.; SANTIN, M.; PIMENTA, R. *et al.* Production of cellulases by *Penicillium oxalicum* through solid state fermentation using agroindustrial substrates. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, 39, p. 321-329, 2017.

WÖSTEN, H. A. B. Filamentous fungi for the production of enzymes, chemicals and materials. **Current Opinion in Biotechnology**, 59, p. 65-70, 2019.

YANG, J.; GONG, L.; GUO, M.; JIANG, Y. *et al.* Bioactive Indole Diketopiperazine Alkaloids from the Marine Endophytic Fungus *Aspergillus* sp. YJ191021. **Marine Drugs**, 19, n. 3, 2021.

Composição da comunidade de fungos filamentosos de ambiente aéreo urbano de Santarém, Pará

- | **Rídel Rodrigo Silva Fernandes**
Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA
- | **Ana Clara Ribeiro Moraes**
Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA
- | **Andresa Krislany Ferreira**
Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA
- | **Eveleise Samira Martins Canto**
Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA
- | **Graciene do Socorro Taveira Fernandes**
Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA

RESUMO

O ar de ambientes abertos pode dispersar microrganismos amigáveis e patogênicos para humanos, animais e plantas. Visando isso, esta pesquisa teve por objetivo identificar a comunidade fúngica do ar de áreas urbanas de Santarém-PA, e correlacionar a diversidade de microrganismos com a presença de aves e arborização. Entre agosto de 2017 a maio de 2018, pela técnica de sedimentação espontânea, placas contendo o meio de cultura BDA acrescido de cloranfenicol, foram expostas em dez pontos em área urbana de Santarém. As placas foram incubadas em temperatura ambiente por até 15 dias, nesse período foram realizados isolamento, caracterização das colônias e microcultivo. O processo de purificação se deu em meio BDA com cloranfenicol, e em seguida foram analisadas pela microscopia e microcultivo, hifas e estruturas reprodutivas para identificação ao menor nível taxonômico possível. Foram quantificadas 477 colônias, de onde foram isoladas 245 morfotipos de fungos filamentosos. Entre os gêneros isolados encontrados, os de maior destaque foram *Aspergillus* spp., e *Cladosporium* spp, sendo também encontrado o grupo de fungos *mycelia sterilia*.. Os resultados mostraram que a presença das garças não causa influência sobre a abundância e riqueza de fungos. Essa pesquisa é a única registrada em área urbana de cidade da Amazônia, sugere-se que novos estudos como este sejam realizados, com um maior número amostral, assim como, a utilização de ferramentas moleculares, para a melhor identificação e entendimento da composição da microbiota aérea urbana.

Palavras-chave: Fungos, Ar *Outdoor*, Urbano.

■ INTRODUÇÃO

O aumento na conscientização sobre as más condições de qualidade do ar em áreas urbanizadas tem estimulado a promoção de estudos com foco na composição química, distribuição de fontes e efeitos do material particulado atmosférico (PM) sobre a saúde da população (INNOCENTE *et al.*, 2017; PREUSS, 2017).

Entre as partículas de bioaerossol, podem incluir vírus, bactérias, fungos e seus esporos, pólen, fragmentos de líquen, plantas ou invertebrados (DESPRÉS *et al.*, 2012). O transporte de microrganismos na atmosfera é fundamental para a compreensão do papel que estes seres desempenham na meteorologia, química atmosférica e saúde pública (TIGNAT-PERRIER *et al.*, 2019). Pesquisas de diversidade microbiana aerotransportada na Amazônia são inexistentes, também aparentemente não é uma preocupação. Além disso, ambientes urbanos estão entre os ecossistemas de crescimento mais rápido e hospedam grandes e densas populações humanas. Estudar a distribuição de comunidades microbianas é importante, pois as populações de microrganismos tanto podem beneficiar quanto prejudicar o bem-estar humano, especialmente em ambientes urbanos, uma vez que a densidade populacional é maior e a capacidade de propagação de doenças se dá muito mais rápido.

De acordo com pesquisas nessa área, o solo, a água, as plantas, os animais e os humanos são as principais fontes de bactérias e fungos que sustentam a microbiota do ar (HOSPODSKY *et al.*, 2012; MUHSIN & ADLAN, 2012; GHOSH *et al.*, 2013; TIGNAT-PERRIER *et al.*, 2019). Fatores como a paisagem local, condições meteorológicas locais e transporte de longo alcance, são citados como responsáveis pela composição das comunidades microbianas aerotransportadas. (CÁLIZ *et al.*, 2018; YAMAMOTO *et al.* 2012).

Recentemente, estudos têm mostrado que até 106 células microbianas podem ser encontradas por metro cúbico de ar e que eles podem ser metabolicamente ativos (ŠANTL-TEMKIV *et al.*, 2018; ZHEN *et al.*, 2017; KLEIN *et al.* 2016). Entre os microrganismos que comumente compõem a comunidade aérea estão bactérias, fungos e vírus. As comunidades de fungos levados pelo ar, não apenas seus esporos, têm sido em geral esquecidos, apesar de serem um problema de saúde significativo para as populações e em especial para os alérgicos (FISHER *et al.*, 2012; BROWN & HOVMØLLER, 2002, ŻUKIEWICZ-SOBCZAK, 2013.)

O novo surto de coronavírus, causador da COVID-19, declarada pandemia pelo Mundo pela Organização de Saúde (OMS) em 11 de março de 2020, infectou mais de 4 milhões de pessoas e causou quase 300.000 mortes em 188 países. Estudos experimentais e observacionais anteriores sobre transmissão entre humanos indicaram um papel significativo dos aerossóis na transmissão de muitos vírus respiratórios, incluindo influenza vírus, SARS-CoV-1 e Síndrome Respiratória do Oriente Médio coronavírus (MERS-CoV) (PYANKOV *et al.*, 2018; RICHARD *et al.*, 2016; TELLIER *et al.*, 2009; WEBER *et al.*, 2008).

Além dos fatores tidos como responsáveis pela composição das comunidades microbianas aerotransportadas, diversas aves podem ser encontradas nos ambientes mais variados, inclusive em centros urbanos, em busca de lugares que lhes ofereçam sobrevivência, como parques, fundos de vale, entornos de lagos, entre outros (CÁLIZ *et al.*, 2018; VARÃO & GAMA, 2012; YAMAMOTO *et al.* 2012).

As aves e outros animais, especialmente os sinantrópicos, tem sido motivo de estudo para entender quais interferências estes animais, ainda que pequenas, podem afetar a qualidade do ar livre bem como na saúde humana de quem frequenta o ambiente em que eles se encontram ou até mesmo nos transeuntes (CONTIN *et al.*, 2011; REOLON *et al.*, 2004).

Visando isso, essa pesquisa teve por objetivo identificar a comunidade fúngica do ar de áreas urbanas de Santarém-PA, e correlacionar a diversidade de microrganismos com a presença de aves e a arborização

■ MÉTODO

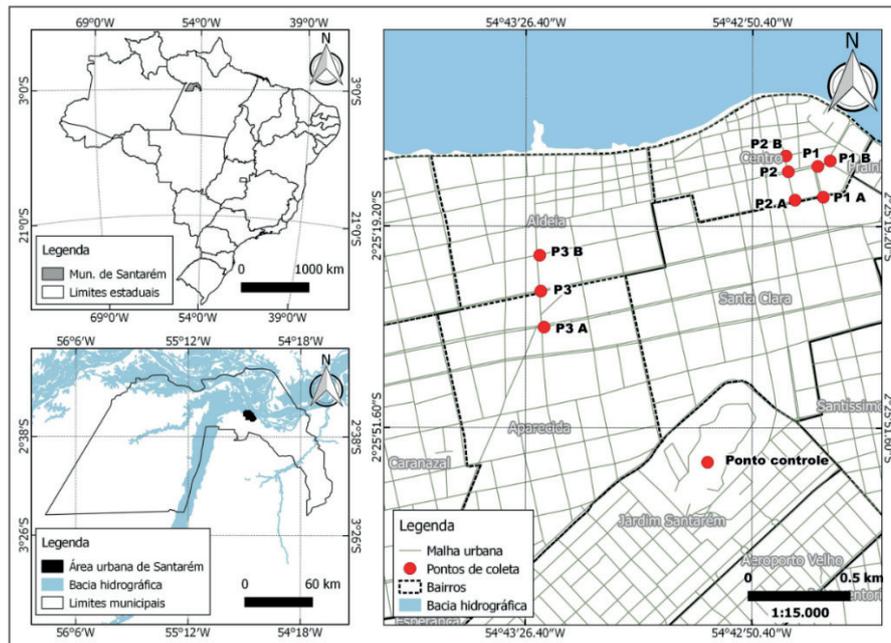
Área, período de estudo e coleta do material

A pesquisa foi realizada em Santarém, cidade localizada na região Oeste do estado do Pará. Atualmente, segundo dados do IBGE (2021), estima-se que Santarém tem 308.339 habitantes.

As coletas ocorreram entre os anos de 2017 (7 de agosto e 06 de novembro) e 2018 (5 de fevereiro e 7 de maio) obedecendo o mesmo o horário em todos os pontos de amostragem.

Foram escolhidos 3 pontos centrais, com a presença de garças, em áreas urbanas de Santarém, cada um com dois pontos adjacentes, totalizando 9 pontos que foram escolhidos em virtude da presença de aves e pela frequente circulação de pessoas, especialmente o P1, P1A e P1B. E o P4 foi utilizado como ponto controle por ser localizado em área urbana central, ser um local arborizado e utilizado para atividades de lazer e prática de atividades físicas da população (Figura 1).

Figura 1. Mapa com os pontos de coleta da microbiota aérea na área urbana de Santarém, Pará.



Fonte: autor, 2018.

Para a coleta das amostras, foi utilizada a técnica de exposição pelo método de sedimentação espontânea, por 15 minutos a uma altura de 1 metro suportadas por bandejas (ABELHO, 2013), em duplicata utilizando-se placas de Petri de 90x15mm, contendo o meio Batata Dextrose Agar (BDA - Merck®) acrescido de cloranfenicol (Figura 1).

Cultivo, isolamento e identificação dos fungos

Após a exposição, as placas foram levadas para o Laboratório Multidisciplinar de Ensino de Biologia Aplicada (LaBio) da UFOPA, onde ficaram sob incubação à temperatura ambiente ($25\text{ °C} \pm 2$) por período máximo de 10 dias, acompanhadas de observações diárias com a verificação do crescimento das colônias. Findo o período de cultivo, foram realizadas a Contagem Padrão em Placas (CPP). A purificação dos fungos ocorreu por meio de repiques sucessivos em BDA, até que estivessem devidamente isolados e em seguida foi feita a descrição das características das macrocolônias (coloração, textura, consistência, relevo, borda), e o isolamento das colônias viáveis cultiváveis para identificação ao menor nível taxonômico possível.

Para a identificação dos fungos filamentosos isolados foi realizada a técnica do microcultivo em meio BDA, e posteriormente preservados pelo método Castellani (DE CAPRILES, MATA & MIDDELVEEN, 1989).

Análise Estatística

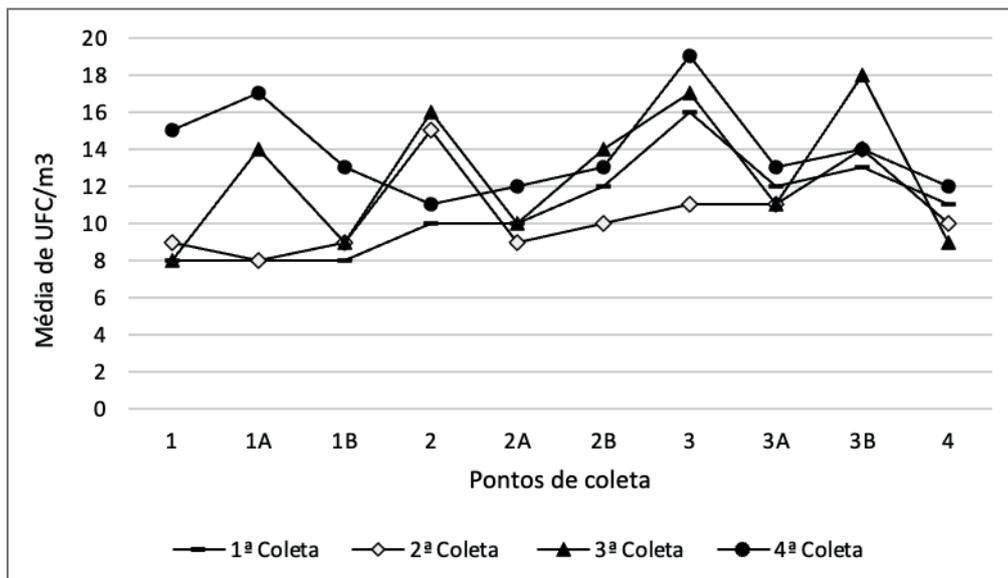
Para comparar a composição de fungos entre os pontos de coleta com presença e ausência das garças foi utilizado o teste T, e para comparar a diferença entre os gêneros de fungos foi utilizado a ANOVA, considerando um nível de significância de $\alpha = 0,05$.

■ RESULTADOS E DISCUSSÃO

Santarém tem um clima tropical úmido e sofre fortes chuvas com temperaturas médias mensais mínimas e máximas de 22,2o C e 33,9o C, respectivamente. As velocidades médias do vento mensais mínima e máxima de 7 de agosto de 2017 a 7 de maio de 2018 foram 1,1 e 2,6 ms., respectivamente. Além disso, a média mensal mínima e máxima de precipitação / precipitação de agosto de 2017 a maio de 2018 foram 74 e 494 mm, respectivamente, segundo INMET (2021).

Foram quantificados um total de 477 colônias, de onde foram isoladas 245 morfotipos de fungos filamentosos. Os pontos P3 (13,2%) e P3B (12,2%) foram os que apresentaram maior número de UFC/m3 nas coletas realizadas. Entretanto, o ponto P3 teve maior abundância de colônias na primeira, segunda e terceira coletas e o ponto P3B, na terceira, conforme mostram as figuras a seguir.

Figura 2. Média das Unidades Formadoras de Colônias de fungos (UFC/m3), por ponto de coleta de amostra do ar da coleta em área urbana de Santarém, Pará, Brasil.



De acordo com o teste T, a presença de garças nos pontos de coleta não exerceu nenhuma influência ($r=0,257$) na frequência de fungos presentes no ar na área urbana estudada para o período total amostrado.

Entre os fungos filamentosos identificados, o destaque se deu para *Aspergillus* sp., *mycelia sterilia*, *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Acremonium* sp., *Bipolaris* sp., *Paecilomyces* sp., *Botrytis* spp., *Gliocladium* spp., *Humicola* spp., *Doratomyces* spp., *Fonsecaea* sp. *Trichotecium* spp. e *Cunninghamella* spp. (Tabela 2).

Em todos os pontos de amostragem *Aspergillus* spp. (31,6%), precedido por *Mycelia sterilia* (26,5%) e *Cladosporium* spp. (12,7%) tiveram maior abundância. Os pontos P2, P2B e P4 (controle) foram os que apresentaram maior quantidade de *Aspergillus* spp., os pontos P2A e P3B apresentaram maior abundância de *Mycelia sterilia* e os pontos P2, P2B e P3A, maior frequência de *Cladosporium* spp. (Tabela 2).

Em termos de quantidade de gêneros de fungos filamentosos por ponto amostral, o ponto P2 foi o que apresentou maior número, atingindo 12,7% de todo total de gêneros fúngicos identificados, seguido do P2B (12,2%) e P3B (11,4%). Os pontos com menor número de gêneros de fungos filamentosos foram P1A (6,9%), P3 (8,6%) e, P1 e P1B, ambos com 9% (Tabela 2).

Tabela 2. Frequência dos táxons de fungos filamentosos isolados da microbiota aérea de área urbana de Santarém (Pará, Brasil) por ponto de coleta.

Táxons	Pontos amostrados										Total	
	P1	P1A	P1B	P2	P2A	P2B	P3	P3A	P3B	P4	FA	FR%
<i>Aspergillus</i> spp.	10	8	6	11	4	11	6	7	6	11	80	32,7
<i>Mycelia sterilia</i>	5	5	6	6	12	7	5	3	11	7	67	27,3
<i>Cladosporium</i> spp.	2	1	4	5	3	5	1	5	2	4	32	13,1
<i>Fusarium</i> spp.	3	0	2	2	1	1	4	2	4	0	19	7,76
<i>Penicillium</i> spp.	1	1	2	1	0	2	2	2	0	1	12	4,9
<i>Acremonium</i> spp.	0	0	0	3	1	0	2	2	2	1	11	4,49
<i>Bipolaris</i> spp.	1	0	0	2	1	1	1	1	1	0	8	3,27
<i>Paecilomyces</i> spp.	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	3	1,22
<i>Botrytis</i> spp.	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	3	1,22
<i>Gliocladium</i> spp.	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	3	1,22
<i>Humicola</i> spp.	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	3	1,22
<i>Doratomyces</i> spp.	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0,41
<i>Fonsecaea</i> spp.	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0,41
<i>Trichotecium</i> spp.	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0,41
<i>Cunninghamella</i> spp.	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0,41
Total - FA	22	17	22	31	25	30	21	23	28	26	245	
FR%	9	6,9	9	13	10	12	9	9,4	11	11	100	

FA= Frequência Absoluta; FR%= Frequência Relativa.

MENEZES *et al.* (2004) identificaram na microbiota aérea na cidade de Fortaleza (Ceará) um conjunto de gêneros de fungos e entre eles estava o *Aspergillus*, táxon que também se destacou nesta pesquisa. O *Aspergillus* foi igualmente o fungo filamentoso mais frequente na pesquisa realizada por SHAMS-GHAHFAROKHI *et al.* (2014), onde os autores

ressaltam a importância do monitoramento da qualidade do ar de forma a não oferecer danos à saúde dos transeuntes.

Em pesquisa realizada por MAKUT *et al.* (2014) os autores identificaram este gênero como o mais frequente presente na microbiota fúngica do ar, respectivamente as espécies de *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*). Várias espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* e *Fusarium* foram identificados presentes no ar no presente trabalho e segundo SHAMS-GHAHFAROKHI *et al.* (2014) estes microrganismos são tidos como os patógenos responsáveis por causarem infecções diversas em pacientes imunocomprometidos.

O grupo *Mycelia sterilia* genericamente inclui isolados fúngicos não-esporulados que são agrupados como morfoespécies, baseado em similaridades das características das colônias (LACAP, HYDE & LIEW, 2003). Os fungos do complexo *Mycelia sterilia* eram classificados como ambientais sem importância clínica, no entanto, esse cenário tem mudado nos últimos anos, pois, alguns trabalhos identificaram este grupo como agentes infecciosos em humanos (POUNDER *et al.*, 2007; SINGH *et al.*, 2014; GARCIA-HERMOSO *et al.*, 2015).

O gênero *Cladosporium* é composto principalmente por fungos dematiáceos e de distribuição global (MENEZES *et al.*, 2017). Fungos desse gênero geralmente são associados à contaminação apenas. Porém, estudos mostram que esses fungos também têm potencial patogênico (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 1986, ROCHA, 2019, YEW *et al.*, 2014).

Fusarium é um gênero de fungos saprofíticos que são facilmente encontrados no solo (LESLIE & SUMMERELL, 2008). Esses fungos são associados a diversas contaminação de plantas, inclusive em plantas com valor econômico (POLETTTO *et al.* 2012, LIMA & DUARTE. 2002; MACIEL, 2012).

A permanência da microbiota aérea em determinada área está sujeita a variações na concentração e distribuição de microrganismos causada por fatores que são muito complexos e incluem parâmetros meteorológicos, condições climáticas, força do vento e ambiente geográfico, além variar de acordo com as diferentes estações do ano (ZHONG *et al.*, 2016). Fatores mecânicos, como chuva ou vento, também afetam a manutenção do material em suspensão, favorecendo a sua sedimentação ou a sua dispersão (GRIFFIN, 2007). Quando comparado o conjunto de coletas, a terceira coleta (fevereiro de 2018) foi a que apresentou maior valor de UFC/m³. Possivelmente isto se deva às condições climáticas, já que o mês de fevereiro foi o que apresentou melhores condições de umidade e temperatura para o desenvolvimento dos fungos.

As garças estiveram presentes nos pontos centrais coleta durante todo período de amostral, quando não eram avistadas, a permanência destas foi evidenciada pela presença de fezes no chão, embaixo ou nas proximidades das árvores. Também foi constatado um

fluxo intenso de veículos e pessoas em todos os pontos durante as coletas, o que pode favorecer a dispersão desses dos microrganismos para outras áreas da cidade.

Esta pesquisa mostrou o quanto é importante monitorar a diversidade dos bioaerossóis nos ambientes urbanos, para desta formar acompanhar as variações da composição microbiana, presença de patógenos e assim garantir a manutenção da saúde da população.

■ CONCLUSÃO

Após análises, ficou constatado que entre os pontos de amostragem, o P3 foi o que apresentou maior número UFC/m³, foram identificados vários gêneros de microrganismos potencialmente patogênicos, principalmente nos pontos onde há presença das garças. Sobre o ponto controle o gênero em maior abundância foi o *Aspergillus*.

Apesar de a estatística não mostrar diferenças estatísticas significativas na composição dos táxons fúngicos entre os pontos coletados estudados, é sabido que manter áreas de arborização em faixas ou zonas na área urbana das cidades é uma alternativa que além de favorecer a paisagem ainda melhora a qualidade do ar em seu entorno.

Sugere-se que novos estudos sejam realizados em ambientes aéreos amazônicos, com uma maior abrangência e maior número amostral, assim como, a utilização de ferramentas moleculares, para a melhor identificação e entendimento da composição da microbiota aérea.

Agradecimentos

Os agradecimentos à Universidade Federal do Oeste do Pará e ao Instituto de Ciências e Tecnologia da Águas que possibilitou a concessão de bolsa Pro-TCC, que auxiliou na realização deste trabalho. À equipe técnica e de alunos do Laboratório Multidisciplinar de Ensino de Biologia Aplicada e do Laboratório de Bacteriologia da UFOPA.

■ REFERÊNCIAS

ABELHO, M. Protocolo de Microbiologia Ambiental parte 3: Microbiologia Aplicada. 2013.

BROWN, J. K. M.; HOVMØLLER, M. S. Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. **Science**, v. 297, n. 5581, p. 537-541, 2002.

CÁLIZ, J.; TRIADÓ-MARGARIT, X.; CAMARERO, L.; CASAMAYOR, E. O. A long-term survey unveils strong seasonal patterns in the airborne microbiome coupled to general and regional atmospheric circulations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 48, p. 12229-12234, 2018.

CONTIN, J.T.; QUARESMA, G.S.; SILVA, E.F.; LINARDI, V.R Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em fezes de pombos na cidade de Caratinga, MG–Brasil. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 21, n. 1, p. 19-24, 2011.

DE CAPRILES, C. H.; MATA, S.; MIDDELVEEN, M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. **Mycopathologia**, v. 106, n. 2, p. 73-79, 1989.

DESPRÉS, V. R.; HUFFMAN, J. A.; BURROWS, S. M.; HOOSE, C.; SAFATOV, A. S.; BURYAK, G.; FRÖHLICH-NOWOISKY, J.; ELBERT, W.; ANDREAE, M.O.; PÖSCHL, U.; JAENICKE, R. Primary biological aerosol particles in the atmosphere: a review. **Tellus B: Chemical and Physical Meteorology**, v. 64, n. 1, p. 15598, 2012.

ESPINEL-INGROFF, A.; SHADOMY, S.; DIXON, D.; GOLDSON, P. Exoantigen test for *Cladosporium bantianum*, *Fonsecaea pedrosoi*, and *Phialophora verrucosa*. **Journal of clinical microbiology**, v. 23, n. 2, p. 305-310, 1986.

FISHER, M. C.; HENK, D. A.; BRIGGS, C. J.; BROWNSTEIN, J. S.; MADOFF, L. C.; MCCRAW S. L.; GURR, S J. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, v. 484, n. 7393, p. 186-194, 2012.

GARCIA-HERMOSO, D.; ALANIO, A.; LORTHOLARY, O.; DROMER, F. Agents of systemic and subcutaneous mucormycosis and entomophthoromycosis. **Manual of clinical microbiology**, p. 2087-2108, 2015.

GHOSH, B.; LAL, H.; KUSHWAHA, R.; HAZARIKA, N.; SRIVASTAVA, A.; JAIN, V. K. Estimation of bioaerosol in indoor environment in the university library of Delhi. **Sustain Environ Res**, v. 23, n. 3, p. 199-207, 2013.

GRIFFIN, D. W. Atmospheric movement of microorganisms in clouds of desert dust and implications for human health. **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 3, p. 459-477, 2007.

HOSPODSKY, D.; QIAN, J.; NAZAROFF. W.; YAMAMOTO, N.; BIBBY, K.; RISMANI-YAZDI, H.; PECCIA, J. Human occupancy as a source of indoor airborne bacteria. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e34867, 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pa/santarem/panorama>. (Acessado: 03 de janeiro de 2022).

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em: http://www.inmet.gov.br/sonabra/pg_dspDadosCodigo_sim.php?QT11MA== (Acessado: 15 de julho de 2018).

INNOCENTE, E.; SQUIZZATO, S.; VISIN, F.; FACCA, C.; RAMPAZZO, G.; BERTOLINI, V.; GANDOLFI, I.; FRANZETTI, A.; AMBROSINI, R.; BESTETTI, G. Influence of seasonality, air mass origin and particulate matter chemical composition on airborne bacterial community structure in the Po Valley, Italy. **Science of the Total Environment**, v. 593, p. 677-687, 2017.

KLEIN, A. M.; BOHANNAN, B. J. M.; JAFFE, D. A.; LEVIN, D. A.; GREEN, J. L. Molecular evidence for metabolically active bacteria in the atmosphere. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 772, 2016.

LACAP, D. C.; HYDE, K. D.; LIEW, E. C. Y. An evaluation of the fungal ‘morphotype’ concept based on ribosomal DNA sequences. **Fungal Diversity**, 2003.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium laboratory manual**. John Wiley & Sons. 2008.

LIMA, A. O.; DUARTE, M. Estudo das características morfológicas e fisiológicas de *Fusarium oxysporum* agente causal da murcha amarela da pimenta-do-reino. In: **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA FCAP, 12.; SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, 6., 2002, Belém, PA. A contribuição do profissional de Ciências Agrárias no uso e conservação da biodiversidade: anais. Belém, PA: FCAP: Embrapa Amazônia Oriental, 2002., 2002.

MACIEL, C. G. *Fusarium sambucinum* associado a sementes de *Pinus elliottii*: patogenicidade, morfologia, filogenia molecular e controle. 2012.

MAKUT, M.D.; NYAM, M.A.; SHEHU, D.; ANZAKU, S.J. A survey of the microflora of the outdoor air environment of Keffi Metropolis, Nasarawa State, Nigeria. **African Journal of Microbiology Research**. v. 8, n. 27, p. 2650-2655. 2014.

MENEZES, C. P.; PEREZ, A.; OLIVEIRA, E. *Cladosporium* spp: Morphology, infections and pathogenic species. **Acta Brasiliensis**, v. 1, p. 23-27, 2017.

MENEZES, E.A.; TRINDADE, E.C.P.; COSTA, M.M.; FREIRE, C.C.F.; CAVALCANTE, M.S.; CUNHA, F.A Airborne fungi isolated from Fortaleza city, State of Ceara, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 3, p. 133-137, 2004.

MUHSIN, T.; ADLAN, M. Seasonal distribution pattern of outdoor airborne fungi in Basrah city, southern Iraq. **J Basrah Res (Sciences)**, v. 38, p. 90-98, 2012.

ORGANIZATION WH. Coronavirus disease (COVID-2019) situation reports. **Geneva: WHO**, 2020.

POLETTO, I.; LUPATINI M.; MUNIZ, M. F. B.; ANTONIOLLI, Z. I. Caracterização e patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. causadores de podridão-de-raízes da erva-mate. **Floresta**, v. 42, n. 1, p. 95-104, 2012.

POUNDER, J. I.; SIMMON, K. E.; BARTON, C. A.; HOHMANN, S. H.; BRANDT, M. E.; PETTI, C. A. Discovering potential pathogens among fungi identified as nonsporulating molds. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 568-571, 2007.

PREUSS, M. J. Inventário de gases de efeito estufa e emissões evitadas com o gerenciamento de resíduos e cobertura vegetal na Universidade do Vale do Rio dos Sinos. 2017.

PYANKOV, O.V.; BODNEV, S. A.; PYANKOVA, O.G.; AGRANOVSKI, I, E. Survival of aerosolized coronavirus in the ambient air. **Journal of aerosol science**, v. 115, p. 158-163, 2018.

Avaliação da produção de atividade enzimática por fungos filamentosos coletados de solo amazônico

- | **Eveleise Samira Martins Canto**
Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA
- | **Darlene Vitória Silva da Costa**
Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA
- | **Ludyanne da Silva Sousa**
Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA
- | **Patrícia Guimaraes Antunes**
Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA
- | **Vanessa dos Santos Bentes**
Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA
- | **Yanka Silva de Sousa**
Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA
- | **Taides Tavares dos Santos**
Universidade Federal do Oeste da Bahia - UFOB

RESUMO

A biodiversidade de ambientes amazônicos, ainda é pouco conhecida, sobretudo quando se refere aos fungos. Esses organismos são considerados potenciais produtores de diversas substâncias de interesse biotecnológico, destacando-se as enzimas. **Objetivo:** isolar e identificar fungos filamentosos presentes em solos amazônicos, com potencial de produção de enzimas celulolíticas, proteolíticas e amilolíticas. **Metodologia:** foram selecionados três pontos para a coleta de amostras de solo localizados na Universidade Federal do Oeste do Pará, UFOPA. As amostras foram processadas no Laboratório Multidisciplinar de Biologia Aplicada – Labio. **Resultados:** isolou-se 20 colônias de fungos filamentosos, sendo identificadas morfológicamente e avaliadas qualitativamente quanto a atividade enzimática, amilolítica, proteolítica e celulolítica. A frequência de ocorrências dos isolados identificados foi: *Paecilomyces* (25%, n=5), *Penicillium* (10%, n=2), *Aspergillus* (10%, n=2) e *Curvularia* (10%, n=2), *Fusarium* (5%, n=1) e 40% dos isolados não foram identificados. A positividade para cada uma das enzimas isoladamente foi de 28,5% (n=4) para amilase, 64,3% (n=9) para protease e 78,6% (n=11) para celulase. **Conclusões:** destacou-se a espécie *A. niger* por apresentar positividade para as três enzimas de interesse. Portanto, enfatiza-se que a prospecção biotecnológica envolvendo fungos filamentosos presentes em solos amazônicos, viabiliza a preservação da biodiversidade além de revelar fontes alternativas de bioprodutos. Os resultados revelam que ainda são necessários estudos mais aprofundados para otimizar a indução e produção destas enzimas pelos isolados identificados nesta pesquisa.

Palavras-chave: Amazônia, Biodiversidade, Atividade Enzimática.

■ INTRODUÇÃO

O solo é um ecossistema complexo que além de ser considerado uma rica fonte de nutrientes, abriga uma infinidade de vida microscópica, dentre estas, estão os microrganismos (SEENA *et al.*, 2019a) os quais mantêm relações ecológicas entre si. A composição química e física destes ecossistemas associados a processos biológicos, podem interferir na formação e composição de micro-habitat e conseqüentemente na composição microbiana (SEENA *et al.*, 2019b; STARKE *et al.*, 2021).

O bioma Amazônico está entre os biomas tropicais com a maior biodiversidade do planeta, sendo considerados ainda pouco explorados. Pesquisas afirmam que ações antrópicas, como o desmatamento, acarretam perdas imensuráveis desta biodiversidade, principalmente na diminuição da microbiota do solo (FRANCO *et al.*, 2019; LLOPART *et al.*, 2018). Com isso, estudos descrevendo a diversidade e ecologia de fungos na região amazônica são urgentemente necessários, principalmente voltados a desvendar novos microrganismos e seus potenciais biotecnológicos (CELESTINO *et al.*, 2014; DOS SANTOS *et al.*, 2018).

Os fungos constituem uma importante parte da biomassa no solo, sendo essenciais na decomposição da matéria orgânica fazendo parte na ciclagem de nutrientes e interações bióticas através de suas redes miceliais (FRAC *et al.*, 2018). Esses organismos eucariotos e heterotróficos, são produtores de diversas substâncias, como os metabólitos primários e secundários que podem estar inseridos em diferentes setores industriais devido suas importantes atividades biológicas (MUDDASSIR *et al.*, 2020). Na indústria de alimentos, os fungos estão presentes na fabricação de bebidas como cerveja e vinhos e na produção de pães e queijos. Na área da saúde, os fungos estão envolvidos na produção de novos fármacos (penicilinas), imunossupressores (ciclosporinas) e como anticancerígenos (paclitaxel) (SUBRAMANIAM; SUBBAN; CHELLIAH, 2021). A biomassa fúngica é muito importante na natureza, diante disso, destacam-se os fungos filamentosos, pois suas propriedades de colonização de substratos proporcionam uma maior degradação e facilitação de absorção de nutrientes, além da capacidade de degradar biomassas complexas e mineralizar vários xenobióticos (BHANDARI *et al.*, 2021; CANTO *et al.*, 2020).

A produção de enzimas de origem fúngica é outro exemplo de substância que, devido sua ampla variedade de atividade e conseqüentemente importância industrial, também contribuem para a preservação ambiental e o desenvolvimento sustentável que valoriza diferentes tipos de biorecursos (BHANDARI *et al.*, 2021). Os fungos filamentosos podem diversificar seu amplo conjunto de enzimas ativas em carboidratos, e com isso, tornam-se importantes degradadores de polissacarídeos na natureza, para sobreviverem em habitats ecológicos variados (SEENA *et al.*, 2019b).

Amilases, proteases e celulasas são exemplos de enzimas produzidas por diversos microrganismos, sendo que os fungos filamentosos são destaques neste contexto (RAJAGOPAL *et al.*, 2018; LANGE; BARRETT; MEYER, 2021). As amilases são aplicadas nas indústrias de panificação, têxtil, farmacêutica, laticínios etc. (RAVINDRAN *et al.*, 2018). A importante produção desta enzima por microrganismos, evidencia a necessidade de exploração de novas fontes sustentáveis (BEHAILU; ABEBE, 2018). Há vários tipos de amilases como α , β e glucoamilase (KUMAR *et al.*, 2021), e em destaque as amilases fúngicas, são consideradas fontes sustentáveis além da característica de crescimento de biomassa e tolerância a condições de alta pressão osmótica, tornam os mais eficientes para a bioconversão de substratos sólidos (RAVINDRAN *et al.*, 2018). As proteases, apresentam larga aplicação em produtos industriais e domésticos como o uso de detergentes, além de possuírem grande aplicação farmacêutica devido ao potencial fibrinolítico destas enzimas, sendo usadas no tratamento da trombose por exemplo. Essas enzimas, realizam a proteólise hidrolisando as ligações peptídicas que unem os aminoácidos nas cadeias polipeptídicas (RAVINDRAN *et al.*, 2018). Fungos e bactérias, são importantes produtores de enzimas que degradam celulose as quais estão amplamente distribuídas na natureza. A hidrólise enzimática da celulose requer um conjunto de enzimas, incluindo endo- β -1,4-glucanase, exo- β -1,4-glucanase e β -glucosidase que participam da bioconversão de biomassa celulósica em biocombustíveis (SRIVASTAVA *et al.*, 2018). Esse grupo enzimático, está envolvido no processo de desconstrução da lignocelulose, uma vez que a celulose corresponde até 60% de sua massa (OLGUIN-MACIEL *et al.*, 2020).

A diversidade de fungos filamentosos presente no solo, denota que há uma relação importante com outros componentes deste ecossistema e evidencia sua capacidade de adotar várias formas em respostas a condições adversas ou desfavoráveis, assim como, a produção de substâncias de interesse biotecnológico como as enzimas (ZEILINGER *et al.*, 2016; STARKE *et al.*, 2021). A prospecção biotecnológica envolvendo fungos presentes em solos amazônicos, ainda é incipiente e necessita ser mais explorada, tendo em vista a rica biodiversidade existente. Portanto, objetivou-se com a presente pesquisa, identificar fungos filamentosos presentes em solos amazônicos com potencial produção de atividade enzimática celulolítica, proteolítica e amilolítica.

■ MÉTODO

Local de coleta

As coletas foram realizadas em três pontos escolhidos aleatoriamente na Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), unidade Tapajós localizado na cidade de Santarém

estado do Pará (latitude $-2,416821^{\circ}$, longitude $-54,740973^{\circ}$). As amostras de solo foram coletadas nos seguintes ambientes: Viveiro (P1), Deck (P2) e Praia (P3) como apresentado na Figura 1.

Figura 1. Locais de amostragem e etapas de coleta. A - P1 (Viveiro); B - P2 (Deck); C - P3 (Praia); D - Medição da profundidade do buraco escavado; E - Coleta da amostra em tubos Falcon; F - Amostras de solo coletadas.



Fonte: autores.

Coleta de solo e isolamento e manutenção dos fungos filamentosos

As amostras de solo, foram coletadas com 20 cm de profundidade e inseridos em tubo de centrífuga estéril, posteriormente acondicionados em caixas térmicas e conduzidas ao Laboratório Multidisciplinar de Biologia Aplicada – Labio, Ufopa para a realização dos procedimentos laboratoriais.

O isolamento dos fungos foi realizado através da técnica de diluições seriadas, onde 25 g de amostra de solo foram homogeneizadas em 225 mL de água peptonada 0,1% (diluição 10⁻¹) e consecutivamente foram diluídas em tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1% até a diluição 10⁻³. As amostras foram semeadas em placas de Petri contendo Ágar batata dextrose (BDA, Himedia), acrescido com cloranfenicol (0,1 µg / mL). De cada diluição, foi retirada uma alíquota de 0,1 mL e inoculada na superfície do meio solidificado, realizando-se o espalhamento com uma alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 28 °C, durante 5 dias em estufa BOD.

Purificação e conservação dos isolados obtidos

A sequência do isolamento, foi realizada através da técnica de esgotamento por estrias para purificação das colônias fúngicas. Os microrganismos isolados, foram mantidos em refrigerador a 4 °C, em tubos de ensaio com ágar inclinado contendo o meio BDA. Para melhor preservação das culturas, realizou-se o método de Castellani (DE CAPRILES; MATA; MIDDELVEEN, 1989).

Caracterização morfológica e identificação dos isolados

As culturas puras foram caracterizadas fenotipicamente por meio da verificação de caracteres morfológicos, tanto macroscópicos (coloração do micélio no verso e reverso do meio, a forma da borda da colônia, a presença de esporos e topografia da colônia no meio de cultura) como microscópicos visualizados pela técnica de microcultivo (RIDELL, 1950), que se fundamenta no cultivo do fungo em blocos de meio de cultura, entre lâmina e lamínula, onde o crescimento do fungo se expande e fixa na porção inferior da lamínula. Isso possibilita analisar estruturas importantes como hifas e ornamentação de conídios. Posteriormente, realizou-se a identificação dos fungos ao menor nível taxonômico possível, por meio da comparação entre as características morfológicas com a literatura micológica taxonômica disponível (BARNETT & HUNTER 1972; WATANABE, 2010).

Avaliação da atividade enzimática

Preparação do inóculo

Para a realização de *screening*, os fungos selecionados foram cultivados em BDA, por cinco dias de incubação a 28 °C e posteriormente foi retirado um disco de micélio de 5 mm de diâmetro, o qual foi inserido centralmente na superfície do meio com substratos enzimáticos específicos. Cada amostra, foi inoculada em triplicata para avaliar a produção de enzimas extracelulares: amilases, celulasas e proteases. As observações e leituras foram feitas a cada 24 horas de incubação, onde observou-se a formação de halos de hidrólise ao redor do fragmento de micélio inoculado. Os fungos com hidrólises positivas, foram selecionados para a realização de bioprocessos por fermentação submersa.

Bioprocesso por fermentação submersa para determinar atividade enzimática por *cup-plate*.

Foram inoculados discos de micélio de 5 mm de diâmetro em frascos do tipo Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL da solução Manachini (Composição: fosfato de potássio 2,0 g;

sulfato de amônia 1,0 g; sulfato de magnésio heptahidratado 0,1 g; fosfato de sódio 0,9 g; extrato de levedura 1,0 g e água destilada 1 L) (MANACHINI; FORTINA; PARINI, 1987) suplementada com o substrato indutor (0,5% p/v): celulase-carboximetilcelulase (pH 5,0) e protease – gelatina (pH 6,9).

Os cultivos foram incubados em agitador orbital durante 72 horas, à 28 °C em 180 rpm. Ao término da fermentação separou-se a biomassa do extrato bruto por filtração (Millipore, 0,45 µm). Os extratos brutos foram conservados sob refrigeração até a inoculação em meio sólido para a determinação da atividade enzimática qualitativa (LIMA, 2006).

Inoculação para avaliação da atividade enzimática em meio sólido por *cup-plate*

Os meios de cultivos específicos, foram preparados e distribuídos em placas de Petri com aproximadamente 4 mm de espessura o qual após sua solidificação foram mantidos sob refrigeração. Posteriormente, foi realizada a técnica de *cup-plate*, que se baseia em perfurar a superfície do meio de cultivo ($\varnothing=8$ mm de diâmetro) para a inoculação de 100 µL do extrato enzimático. As placas inoculadas, foram mantidas em temperatura ambiente para a absorção do extrato enzimático no meio de cultivo. Após esse período, as placas foram incubadas em BOD a 37 °C por 18 horas.

Meios de cultivos sólidos específicos para produção de enzimas amilases, celulases e proteases

O ágar celulose foi preparado com 18 g de ágar, 10 g de carboximetilcelulose (CMC) e 1000 mL de tampão acetato de sódio (pH 5,0). A revelação da atividade enzimática foi realizada através de solução aquosa de vermelho do Congo a 0,1% e cloreto de sódio 1M. A solução de vermelho do Congo foi adicionada na superfície do meio de cultura e permaneceu cerca de 20 minutos até seu descarte. Posteriormente adicionou-se a solução de cloreto de sódio a 1M nas placas e aguardou-se 20 minutos e posteriormente desprezou-se a referida solução. A presença da enzima celulolítica, foi avaliada pela coloração vermelha no meio sólido e a ação enzimática foi observada pela formação de um halo translúcido ao redor de cada *cup-plate*. (TEIXEIRA *et al.*, 2011).

O ágar gelatina leite, foi preparado como descrito por Texeira *et al.*, (1994) com 18 g de ágar; 1 L de tampão citrato fosfato; 10 g de gelatina e 10 g de leite desnatado. Para a avaliação da atividade enzimática não houve a necessidade da utilização de reveladores, pois os halos translúcidos são visíveis.

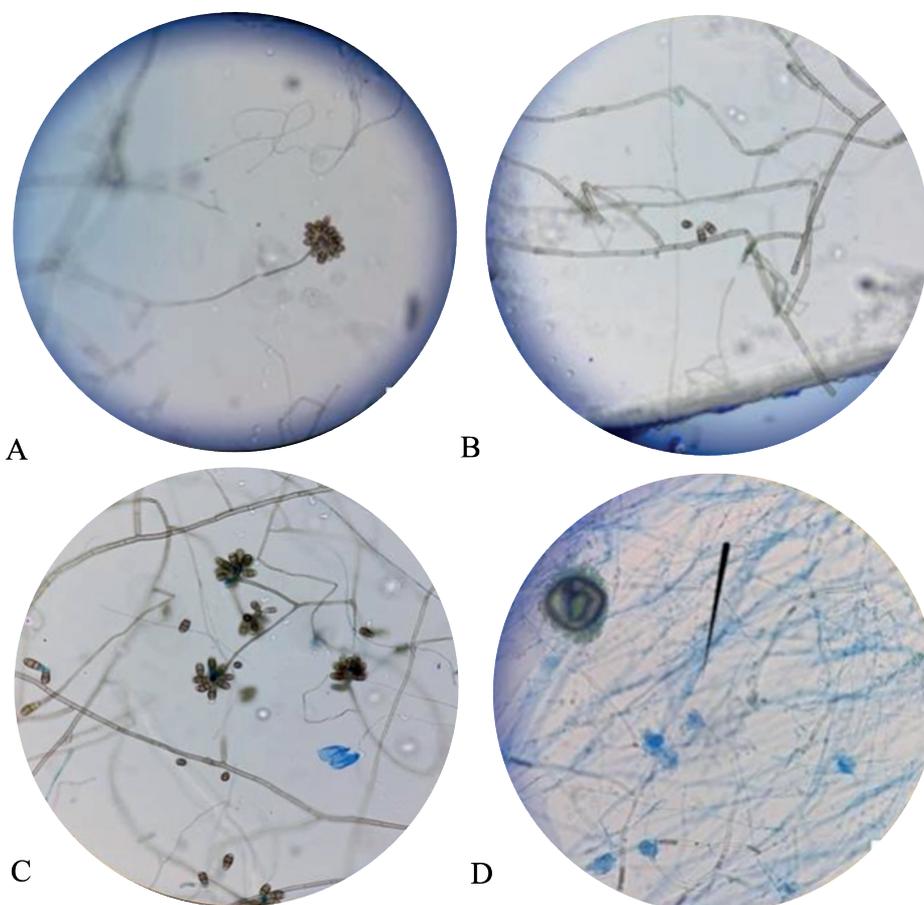
O Ágar Amilase, foi preparado com 10,0 g de amido solúvel, 18 g de ágar nutriente e 1000 ml de tampão acetato de sódio (pH 5,0). A revelação da atividade de enzimas amilolíticas foi realizada através de vapor de iodo. O iodo ressublimado, foi adicionado nas tampas

das placas de Petri sendo vertida a placa com extrato teste sobre a mesma, em seguida, realizou-se movimentos circulares para a liberação do vapor de iodo. O meio resultou em uma coloração lilás, devido à presença das enzimas amilolíticas e a atividade enzimática foi avaliada através da presença de halo translúcido ao redor do *cup-plate*. A atividade enzimática foi verificada através da fórmula Atividade enzimática (I) é igual ao diâmetro do halo (mm) dividido pelo diâmetro do poço (mm). Considerou-se o isolado bom produtor de enzimas extracelulares em meio sólido com valores de I, maior ou igual a 2,0 (LIMA, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2011).

■ RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isolados 20 fungos filamentosos e destes, 60% (n=12) morfotipos foram identificados através de análise morfológica por microcultivo. A frequência de ocorrências dos isolados foram: *Paecilomyces* 25% (n=5), *Penicillium* 10% (n=2), *Aspergillus* e *Curvularia* 10% (n=2) cada, *Fusarium* 5% (n=1) e 40% de fungos não foram identificados. Na Figura 2 são apresentados alguns fungos identificados.

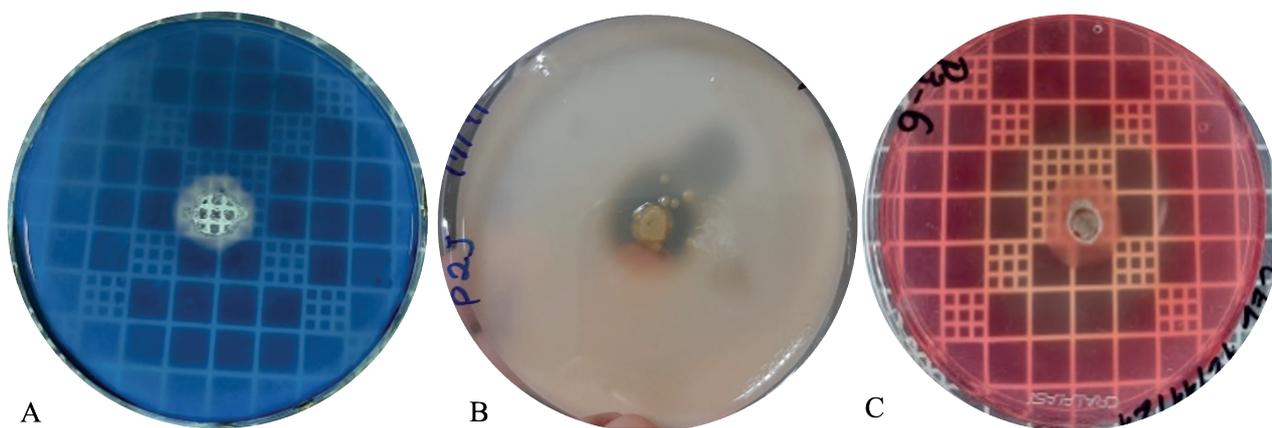
Figura 2. Fungos filamentosos identificados nas amostras de solo da Universidade Federal do Oeste do Pará. A e B - *Curvularia* sp. 1, C - *Curvularia* sp. 2 e D - *Aspergillus flavus*.



Fonte: autores.

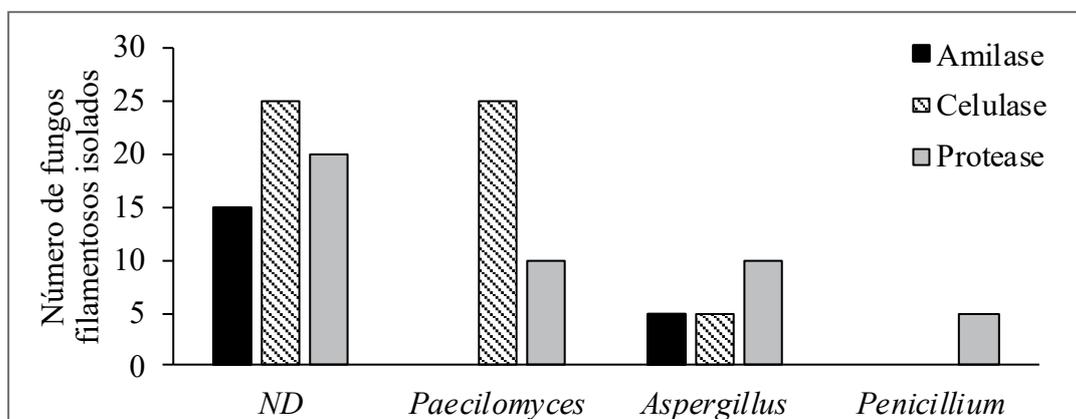
Todos os 20 isolados foram submetidos ao *screening* pelo método de fragmento de micélio. Destes, 70% (n=14) apresentarem halo de hidrólise para pelo menos uma enzima, 42,8 % (n=6) apresentaram halo de hidrólise para três enzimas amilase, celulase e proteases (Figura 3). A positividade para cada uma das enzimas isoladamente foi de 28,5% (n=4) para amilase, 64,3% (n=9) para protease e 78,6% (n=11) para celulase. Na Figura 4 é demonstrada a frequência de ocorrências das atividades enzimáticas.

Figura 3. Halo de atividade enzimática A-amilase; B- protease; C- celulase.



Fonte: autores.

Figura 4. Frequência de ocorrência das atividades enzimáticas dos fungos filamentosos estudados. Abreviatura: ND: não identificado.



Fonte: autores.

Destes positivos, *Aspergillus niger* foi selecionado por apresentar melhor halo de hidrólise e positividade para as três enzimas testadas. Assim sendo, realizou-se a fermentação submersa em solução Manachini acrescido com o substrato indutor específico para a enzima de interesse. Os resultados dos testes realizados com os isolados em bloco de micélio para as duas enzimas, podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Análise qualitativa realizada com o fragmento de micélio para avaliação de halos de hidrólise referentes às enzimas de interesse: amilases, celulases e proteases.

Fungo isolado	Identificação	Enzimas de interesse		
	Morfológica	Amilase	Celulase	Protease
P2-J	<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	+
P2-D*	<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+
P3-12	<i>Curvularia</i> sp. 1	-	-	-
PF-13	<i>Curvularia</i> sp.2	-	-	-
P3-8	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
P1-A	Não identificado	+	+	+
P1-C	Não identificado	+	+	+
P1-D	Não identificado	+	+	+
P2-A	Não identificado	-	+	-
P3-1	Não identificado	-	+	-
P3-10	Não identificado	-	-	-
P3-17	Não identificado	-	-	-
P3-7	Não identificado	-	-	+
P2-C	<i>Paecilomyces</i> sp. 1	-	+	-
P2-F	<i>Paecilomyces</i> sp. 2	-	+	+
P3-2	<i>Paecilomyces</i> sp. 3	-	+	+
P3-6	<i>Paecilomyces</i> sp. 4	-	+	-
P3-15	<i>Paecilomyces</i> sp. 5	-	+	-
P3-5	<i>Penicillium</i> sp. 2	-	-	-
P2-M	<i>Penicillium</i> sp. 1	-	-	+

*Fungo selecionado para a fermentação submersa para análise de atividade enzimática.

Fonte: autores.

Os 70% dos gêneros de fungos encontrados no presente trabalho, foram relatados em diversas pesquisas como produtores de importantes metabólitos secundários e principalmente com atividades enzimáticas (PRADO *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2020). Os gêneros que apresentaram positividade para uma ou mais enzimas como *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Aspergillus*, são importantes indicadores que esses microrganismos necessitam ser submetidos a ensaios laboratoriais mais específicos, pois são promissores para a produção de enzimas extracelulares de interesse industrial (PASSOS; PEREIRA; CASTRO, 2018; SRIVASTAVA *et al.*, 2018).

O gênero *Aspergillus* se destacou por apresentar maiores halos de hidrólises para amilases, proteases e celulases. Este gênero, se destaca como um dos mais importantes para a produção comercial de enzimas extracelulares e outras substâncias (PRADO *et al.*, 2017; RAVINDRAN *et al.*, 2018).

Em um estudo feito por Singh *et al.*, (SINGH *et al.*, 2014), o gênero *Aspergillus*, pode ser uma fonte importante de amilases, as quais tem recebido atualmente maior atenção, pois trazem muitos benefícios econômicos. No trabalho relatado por Behailu *et al.* (2018), a espécie *A. niger* mostra-se promissor neste contexto pois, pode facilmente degradar o amido através da potencialização da sua produção enzimática tendo como base a otimização

dos bioprocessos controlando pH, temperatura, tamanho do inóculo, período de incubação, fontes de carbono e nitrogênio (BEHAILU; ABEBE, 2018). As proteases microbianas, também estão entre as enzimas hidrolíticas mais importantes, e têm sido extensivamente estudadas. As enzimas proteolíticas, são subdivididas em dois grandes grupos, exopeptidases e endopeptidases, dependendo do seu local de ação (MAITIG; ALHOOT; TIWARI, 2018). No presente trabalho, o gênero *Aspergillus* apresentou atividade enzimática proteolítica o que corrobora com estudos anteriores que descrevem este gênero, com a capacidade de secretar altos níveis de enzimas em seus ambiente de crescimento (DE SOUZA *et al.*, 2015; MAITIG; ALHOOT; TIWARI, 2018) como exemplo destacam-se as espécies *A. flavus* e *A. niger* (AHMED, 2018; KUMAR *et al.*, 2021) identificadas no presente trabalho. As enzimas celulolíticas são importantes para vários setores industriais tais como têxtil, papel, alimentos, biocombustíveis etc. Esta enzima, é formada por um consórcio de três enzimas: exo-glucanases, endo-glucanases and β -glucosidases (SINGH *et al.*, 2021). Tanto bactérias quanto fungos, são importantes produtores de celulasas, porém os fungos se destacam devido à sua capacidade de penetração e versatilidade em utilizar seus substratos (SRIVASTAVA *et al.*, 2018).

Entre todos os fungos filamentosos, três gêneros *Penicillium*, *Trichoderma* e *Aspergillus* são considerados como modelo para produção de celulasas em escala industrial (PASSOS; PEREIRA; CASTRO, 2018). Os resultados expostos do presente trabalho se assemelham a estes relatos pois, *Penicillium* e *Aspergillus* também foram identificados como produtores de celulasas.

Portanto, o fungo *Aspergillus niger* P2-D foi selecionado para o bioprocessamento fermentativo submerso, por apresentar halo de hidrólise para as três enzimas estudadas como descrito anteriormente. Os extratos brutos, apresentaram os seguintes resultados para atividade enzimática em ágar carboximetilcelulase (CMC) pelo método de *cup-plate*: 2,8 U/mL tanto para celulase quanto para protease e para a amilase a atividade enzimática foi 2,5 U/mL considerando-se bom produtor de atividade enzimática (SOARES *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2018). Na literatura, observou-se resultados de atividade enzimática utilizando ágar CMC de 3,0 U/mL para *A. nidulans* ATCC62041 e para *A. terreus* 0,9 U/mL em um trabalho de revisão descrito por Singh *et al.*, (SINGH *et al.*, 2021). Quanto ao *A. niger* o qual foi objeto de estudo no presente trabalho, uma pesquisa anterior apresentou 0,18 U/mL (SPERANDIO, 2018). Estes resultados mostram que o extrato bruto de *A. niger* descrito na presente pesquisa possui potencial para servir de base para estudos mais aprimorado pois gênero *Aspergillus*, é empregado em diversos processos industriais como a produção de ácido cítrico e enzimas ativas em lignocelulose (CAIRNS; BARTHEL; MEYER, 2021).

■ CONCLUSÃO

Identificou-se os gêneros *Aspergillus*, *Paecilomyces* e *Penicillium* os quais apresentaram atividade enzimática para pelo menos uma das enzimas de interesse. Destacou-se a espécie *A. niger* como bom produtor de atividade enzimática para amilase, protease e celulase. Portanto, enfatiza-se que a prospecção biotecnológica envolvendo fungos presentes em solos amazônicos, viabiliza a preservação da biodiversidade além de revelar fontes alternativas de bioprodutos. Os resultados revelam que ainda são necessários estudos mais aprofundados para otimizar a indução e produção destas enzimas pelos isolados identificados nesta pesquisa.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos servidores técnicos Cleberson Eduardo Oliveira e Gilmara Oliveira, lotados no Laboratório de Ensino Multidisciplinar de Biologia Aplicada – LABIO da Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA.

■ REFERÊNCIAS

- AHMED, M. E. Extraction and purification of protease from *Aspergillus niger* isolation. **Pharmacy & Pharmacology International Journal**, v. 6, n. 2, 2018.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. New York: Mac-Millan, v. 3, p. 241, 1972
- BEHAILU, A.; ABEBE, G. Isolation, production and characterization of amylase enzyme using the isolate *Aspergillus niger* FAB-211. **International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research**, v. 9, n. 2, p. 7–14, 2018.
- BHANDARI, S. et al. Microbial Enzymes Used in Bioremediation. **Journal of Chemistry**, v. 2021, 2021.
- CAIRNS, T. C.; BARTHEL, L.; MEYER, V. Something old, something new: Challenges and developments in *Aspergillus Niger* biotechnology. **Essays in Biochemistry**, v. 65, n. 2, p. 213–224, 2021.
- CANTO, E. S. M. et al. Composition and Diversity of Fungal Decomposers of Submerged Wood in Two Lakes in the Brazilian Amazon State of Par a. **International Journal of Microbiology**, v. 2020, p. 1–9, 2020.
- CELESTINO, J. D. R. et al. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 569–575, 2014.
- DE CAPRILES, C. H.; MATA, S.; MIDDELVEEN, M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. **Mycopathologia**, v. 106, n. 2, p. 73–79, 1989.

- DE SOUZA, P. M. et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 337–346, 2015.
- DOS SANTOS, R. F. et al. Conidial fungi associated with leaf litter of red cedar (*Cedrela odorata*) in Belém, Pará (eastern Brazilian Amazon). **Acta Amazonica**, v. 48, n. 3, p. 230–238, 2018.
- FERREIRA, Flaviane Lopes et al. Bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono para produção de enzimas por fungos filamentosos. **Hoehnea**, v. 45, p. 134-142, 2018.
- FRAC, M. et al. Fungal biodiversity and their role in soil health. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. APR, p. 1–9, 2018.
- FRANCO, A. L. C. et al. Amazonian deforestation and soil biodiversity. **Conservation Biology**, v. 33, n. 3, p. 590–600, 2019.
- KUMAR, Y. S. et al. Optimization Studies on Alkaline Protease of *Aspergillus Niger* Isolated From Seashore Soil of Bay of Bengal. v. 10, n. 3, p. 238–246, 2021.
- LANGE, L.; BARRETT, K.; MEYER, A. S. New method for identifying fungal kingdom enzyme hotspots from genome sequences. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 3, 2021.
- LLOPART, M. et al. Land Use Change over the Amazon Forest and Its Impact on the Local Climate. **Water**, v. 10, n. 149, p. 1–12, 2018.
- LIMA, A. R. S. Produção de pectinases por *Aspergillus* e classificação de suco de camu-camu com poligalacturonases e pectinestrases. Araluce Regina de Sousa Lima: UFAM, 85p.il.2006. Manaus.
- MAITIG, A. M. A.; ALHOOT, M. A. M.; TIWARI, K. Isolation and screening of extracellular protease enzyme from fungal isolates of soil. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 2059–2067, 2018.
- MANACHINI, P. L.; FORTINA, M. G.; PARINI, C. Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopusstolonifer*. **Biotechnology Letters**, v. 9, n. 3, p. 219–224, 1987.
- MUDDASSIR, M. et al. Fungi - An amalgam of Toxins and Antibiotics: A Mini-Review. **Pakistan Journal of Surgery and Medicine**, v. 1, n. 1, p. 52–55, 2020.
- OLGUIN-MACIEL, E. et al. Consolidated bioprocessing, an innovative strategy towards sustainability for biofuels production from crop residues: An overview. **Agronomy**, v. 10, n. 11, 2020.
- PASSOS, D. DE F.; PEREIRA, N.; CASTRO, A. M. DE. A comparative review of recent advances in cellulases production by *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* strains and their use for lignocellulose deconstruction. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 14, p. 60–66, 2018.
- PRADO, F. B. et al. Produção de compostos bioativos por *Aspergillus* mantidos sob duas condições de preservação. **Boletim do Museo Paraense Emílio Goeldi**, v. 12, n. 1, p. 37–47, 2017.

RAJAGOPAL, K. et al. Mycodiversity and biotechnological potential of endophytic fungi isolated from hydrophytes. **Current Research in Environmental and Applied Mycology**, v. 8, n. 2, p. 172–182, 2018.

RAVINDRAN, R. et al. A review on bioconversion of agro-industrial wastes to industrially important enzymes. **Bioengineering**, v. 5, n. 4, p. 1–20, 2018.

RIDDELL, R.W. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. **Mycologia**, v. 42, p. 265–270, 1950.

SANCHES, M. et al. Biosurfactant Production by *Fusarium oxysporum* LM 5634 Using Peels from the fruit of *Bactris gasipaes* (Kunth) as Substrate. **Biotechnology Journal International**, v. 21, n. 1, p. 1–9, 2018.

SEENA, S. et al. Biodiversity of leaf litter fungi in streams along a latitudinal gradient. **Science of the Total Environment**, v. 661, n. January, p. 306–315, 2019a.

SEENA, S. et al. Does nanosized plastic affect aquatic fungal litter decomposition? **Fungal Ecology**, v. 39, p. 388–392, 2019b.

SINGH, A. et al. An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. **Bioresource Technology Reports**, v. 14, n. October 2020, p. 100652, 2021.

SINGH, R. et al. Assessment of Enzymatic Potential of Soil Fungi to Improve Soil Quality and Fertility. **Asian Journal of Biological and Life Sciences**, v. 9, n. 2, p. 163–168, 2020.

SINGH, S. et al. Production of fungal amylases using cheap, readily available agriresidues, for potential application in textile industry. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

SOARES, Izabel Aparecida et al. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. **Food Science and Technology**, v. 30, n. 3, p. 700-705, 2010.

SPERANDIO, G. B. **Estudos dos perfis enzimáticos de *Trichoderma reesei* RUT-C30 e 9414 em co-culturas com fungos do gênero *Aspergillus* e *Phanerochaete***. [s.l.: s.n.].

SRIVASTAVA, N. et al. Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, n. June 2016, p. 2379–2386, 2018.

STARKE, R. et al. Niche differentiation of bacteria and fungi in carbon and nitrogen cycling of different habitats in a temperate coniferous forest: A metaproteomic approach. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 155, n. May 2020, 2021.

SUBRAMANIAM, Y.; SUBBAN, K.; CHELLIAH, J. A novel synergistic anticancer effect of fungal cholestanol glucoside and paclitaxel: Apoptosis induced by an intrinsic pathway through ROS generation in cervical cancer cell line (HeLa). **Toxicology in Vitro**, v. 72, n. January, p. 105079, 2021.

TEIXEIRA, M. F. S. Obtenção de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* termofílicas e termotolerantes na Amazônia e caracterização de suas enzimas de interesse na indústria de alimentos. **Master of Science Thesis, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brazil**, 1994.

TEXEIRA, M. F. S.; SILVA, T. A.; PALHETA, R. A.; CARNEIRO, A. L. B.; ATAYDE, H. M. **Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada:(aplicações biotecnológicas)**. EDUA, Editora da Universidade Federal do Amazonas, 2011.

WATANABE, T. **Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species**. CRC Press, Taylor & Francis Group. Third ed. Boca Raton: 2010.

ZEILINGER, S. et al. Secondary metabolism in Trichoderma - Chemistry meets genomics. **Fungal Biology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 74–90, 2016.

SOBRE OS ORGANIZADORES

Silvia Katrine Rabelo da Silva

Professora do Instituto de Saúde Coletiva da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA). Possui Licenciatura Plena em Ciências Biológicas pelas Faculdades Integradas do Tapajós (2003), mestrado em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Pará (2008) e Doutorado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Pernambuco (2016). É professora no Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da UFOPA. Coordenadora do Laboratório de Microbiologia (UFOPA) onde desenvolve pesquisa na área de Microbiologia Farmacêutica, com ênfase no acesso à biodiversidade microbiana e do seu potencial biotecnológico, com foco na investigação de substâncias bioativas produzidas por Actinobactérias isoladas do bioma Amazônico. Possui colaboração com grupos internacionais da Universidade do Arizona (EUA).

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6999618172919722>

Sara Freitas de Sousa

Doutora em Ciências ambientais pelo Programa de Pós-graduação Interdisciplinar em Sociedade, Natureza e Desenvolvimento (PPGSND/ UFOPA. Mestra em Ciências Florestais pela Universidade Federal do Espírito Santo (PPGCFL/UFES). Especializando em Engenharia de Segurança do Trabalho pelo Centro Universitário da Amazônia (UNAMA). Graduação em Engenharia Florestal pela Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA). Atualmente é professora substituta na Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), ministra as disciplinas de avaliação de impactos ambientais, mensuração florestal, manejo de florestas nativas, estrutura e valoração florestal. Possui experiência nas áreas relacionadas a recursos naturais, ciências agrárias, fitopatologia, Microbiologia e química de produtos naturais. Participou do Intercâmbio internacional (Bolsista Santander) na Universidad de Salamanca (USAL) para realização do Curso de Lengua y Cultura Española (Lengua española y ampliación de léxico) e do intercâmbio nacional no Instituto de química da Universidade Estadual Paulista (UNESP) pelo Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD).

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0444579834038751>

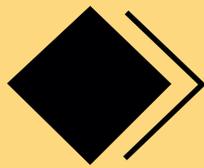
Raphael Carlos Ferrer de Santana

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco (2012), mestrado em BIOTECNOLOGIA pela Universidade Federal de Pernambuco (2015) e doutorado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco (2019). Atualmente é professor dos Cursos de saúde do Centro universitário Maurício de Nassau - Recife e Professor de Biologia - Secretaria de Educação de Pernambuco. Tem experiência na área de Microbiologia, com ênfase em Microbiologia Industrial, atuando principalmente nos seguintes temas: antimicrobial activity, caatinga biome, bioactive metabolites, streptomyces sp. e streptomyces gougerotti, caatinga, antimicrobial.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9540223006814303>

ÍNDICE REMISSIVO

- A**
- Ácido Indolacético:** 92
- Amazônia:** 92, 94, 96, 99, 105, 111, 114, 115, 128, 132, 133, 141, 143, 155, 156
- Anfíbios:** 63, 68
- Ar Outdoor:** 132
- Atividade Enzimática:** 143, 149
- B**
- Biodiversidade:** 143
- Biofármacos:** 12
- Biologia Sintética:** 25, 26
- Bioprospeção:** 44
- Biotecnologia:** 45, 46, 47, 50, 52, 53, 55, 56, 57, 112
- C**
- Celulase:** 151
- Circuitos Genéticos:** 26
- D**
- Deterioração Aeróbica:** 79
- F**
- Fosfatase:** 54, 99
- Fungos:** 50, 57, 58, 117, 119, 122, 128, 138, 145, 149, 156
- Fungos Filamentosos:** 117, 119, 122, 149
- L**
- Leveduras:** 122
- Luz:** 26
- M**
- Metabólito Secundário:** 44
- O**
- Optogenética:** 26
- P**
- Plataformas Microbianas:** 11, 12, 20
- Protease:** 127, 151, 154
- Proteína:** 79
- Proteínas Recombinantes:** 12
- R**
- Reino Fungi:** 44
- S**
- Sideróforos:** 99, 100
- Streptomyces sp:** 79, 92, 96, 98, 100, 103, 104, 106, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114



científica digital



VENDA PROIBIDA - ACESSO LIVRE - OPEN ACCESS

