

# Tópicos em microbiologia agrícola

Ana Cristina Fermino Soares  
Norma Suely Evangelista-Barreto  
Phellippe Arthur Santos Marbach  
(Orgs.)





# Tópicos em microbiologia agrícola

**REITOR**

Fábio Josué Souza dos Santos

**VICE-REITOR**

José Pereira Mascarenhas Bisneto

**SUPERINTENDENTE**

Rosineide Pereira Mubarak Garcia

**CONSELHO EDITORIAL**

Ana Lúcia Moreno Amor

Josival Santos Souza

Luiz Carlos Soares de Carvalho Júnior

Maurício Ferreira da Silva

Paulo Romero Guimarães Serrano de Andrade

Robério Marcelo Rodrigues Ribeiro

Rosineide Pereira Mubarak Garcia (presidente)

Sirlara Donato Assunção Wandenkolk Alves

Walter Emanuel de Carvalho Mariano

**SUPLENTE**

Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

Marcílio Delan Baliza Fernandes

Wilson Rogério Penteado Júnior

**COMITÊ CIENTÍFICO**

(Referente ao Edital nº. 002/2020 EDUFRB – Edital de  
apoio à publicação de livros eletrônicos)

Ana Cristina Fermino Soares

Norma Suely Evangelista-Barreto

Phellippe Arthur Santos Marbach

**EDITORA FILIADA À**

Ana Cristina Fermino Soares  
Norma Suely Evangelista-Barreto  
Phellippe Arthur Santos Marbach  
(Orgs.)

# Tópicos em microbiologia agrícola



Editora UFRB  
Cruz das Almas - BA /Brasil -2020

Copyright©2020 Ana Cristina Fermino Soares, Norma Suely  
Evangelista-Barreto e Phellippe Arthur Santos Marbach  
Direitos para esta edição cedidos à EDUFRB.

Projeto gráfico, capa e editoração eletrônica:  
*Antonio Vagno Santana Cardoso*

A reprodução não-autorizada desta publicação, por qualquer meio,  
seja total ou parcial, constitui violação da Lei nº 9.610/98.

T674t Tópicos em microbiologia agrícola / Organizadores:  
Ana Cristina Fermino Soares, Norma Suely  
Evangelista-Barreto e Phellippe Arthur Santos  
Marbach. \_ Cruz das Almas, BA: EDUFRB, 2020.  
276p.; il. . – (Coleção Pesquisas e Inovações  
Tecnológicas na Pós-Graduação da UFRB; volume 8).

ISBN: 978-65-87743-35-6.

1.Microbiologia – Agricultura e Pesca. 2.Microbiologia  
Pesquisa e desenvolvimento. I.Universidade Federal  
do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias,  
Ambientais e Biológicas. II.Soaes, Ana Cristina  
Fermino. III.Evangelista-Barreto, Norma Suely.  
IV.Marbach, Phellippe Arthur Santos. V.Título.

CDD: 576.8

Ficha elaborada pela Biblioteca Central de Cruz das Almas - UFRB.  
Responsável pela Elaboração - Antonio Marcos Sarmento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 /  
1615) & Neubler Nilo Ribeiro da Cunha (*Bibliotecário - CRB5/1578*)  
(os dados para catalogação foram enviados pelo usuário via formulário eletrônico)



Editora UFRB

Rua Rui Barbosa, 710 – Centro  
44380-000 Cruz das Almas – BA /Brasil  
Tel.: (75) 3621-7672  
editora@reitoria.ufrb.edu.br  
www.ufrb.edu.br/editora  
www.facebook.com/editoraufrb

## **Agradecimentos**

À Editora da UFRB pelo lançamento do edital, a editoração e publicação deste e-book. À CAPES pelas bolsas de mestrado, doutorado e pós-doutorado e o apoio financeiro à pesquisa na pós-graduação (editais pró-equipamentos, PNPd e recurso PROAP). Ao CNPq pelo financiamento de projetos de pesquisa e desenvolvimento e de bolsas de produtividade em pesquisa. À FAPESB pelas bolsas de mestrado e o apoio à pesquisa na pós-graduação (editais de infraestrutura, de apoio à pesquisa e de bolsas de pós-doutorado). À FINEP pelo financiamento de projetos de infraestrutura para a consolidação da pós-graduação na UFRB. À Secretaria de Ciência, Tecnologia e Inovação da Bahia pelo apoio ao projeto Sisal de Base Tecnológica: tecnologia e inovação para a cadeia produtiva do sisal (Convênio SECTI-UFRB n. 001/2013). A todos os produtores rurais, marisqueiras e empresas públicas e privadas que deram apoio às ações de pesquisa na pós-graduação.





# Sumário

## **Apresentação**

*Ana Cristina Fermino Soares, Norma Suely Evangelista-Barreto,  
Phellippe Arthur Santos Marbach* ..... 11

## **Aplicação de compostos bioativos em alimentos**

*Norma Suely Evangelista-Barreto, Milena da Cruz Costa,  
Jessica Ferreira Mafra, Aline Simões da Rocha Bispo* ..... 13

## **Aspectos microbiológicos e químicos de sururu**

*Allana de Oliveira Santos, Fernanda Freitas, Valéria Macedo Almeida  
Camilo, Edileide Santana da Cruz, Fábio Santos de Oliveira,  
Isabella de Matos Mendes da Silva* ..... 37

## **Infecções por *Vibrio* associado a ostras**

*Norma Suely Evangelista-Barreto, Elaine Araújo de Carvalho,  
Aline Simões da Rocha Bispo, Mariza Alves Ferreira* ..... 63

## **Contaminação de peixes em pesque e pague**

*Adriana dos Santos Silva, Ludmilla Santana Soares e Barros,  
Danuza das Virgens Lima, Daniela Simões Velame* ..... 89

## **Degradação de azo corantes por leveduras**

*Tiago Araújo Pinho Alcântara, Elina Isaque Delane,  
Liliane Andrade Sande da Silva, Márcia Luciana Cazetta* ..... 113

## **RNA interferente no controle de pragas**

*Jonatha dos Santos Silva, Layanna Rebouças  
de Santana Cerqueira, Eduardo Chumbinho de Andrade* ..... 135

## **Sisal: podridão vermelha e o biocontrole**

*Ana Cristina Fermino Soares, Jéssica Silva Santos,  
Renata Alves de Sousa, Leonardo de Oliveira Barbosa,  
Elizabeth Amélia Alves Duarte, Aristóteles Góes Neto* ..... 157

**Diversidade Taxonômica e Identificação de *Trichoderma***

*Lucas Souza Sales, Valter Cruz-Magalhães, Djalma Santana Neto, Jackeline Pereira Andrade, Cristiane Nascimento Figueiredo, Harisson Guimarães de Souza, Jorge Teodoro de Souza, Phellippe Arthur Santos Marbach*..... 187

**Diversidade taxonômica e identificação de *Aspergillus***

*Harisson Guimarães de Souza, Lucas Souza Sales, Cristiane Nascimento Figueiredo, Djalma Santana Neto, Valter Cruz-Magalhães, Jorge Teodoro de Souza, Phellippe Arthur Santos Marbach, Jackeline Pereira Andrade* ..... 219

**Diversidade taxonômica e identificação de *Penicillium***

*Cristiane Nascimento Figueiredo, Harisson Guimarães de Souza, Valter Cruz-Magalhães, Lucas Souza Sales, Djalma Santana Neto, Jorge Teodoro de Souza, Jackeline Pereira Andrade, Phellippe Arthur Santos Marbach*..... 247

**Sobre os autores**.....267

# Apresentação

*Ana Cristina Fermino Soares  
Norma Suely Evangelista-Barreto  
Phellippe Arthur Santos Marbach*

Este livro foi elaborado por docentes e discentes do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola (PPGMA) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB/Embrapa. O PPGMA foi criado em 2008 pela UFRB em ampla associação com a Embrapa Mandioca e Fruticultura, ampliando a colaboração técnico-científica entre ambas as instituições, com a formação de recursos humanos altamente qualificados na área de Microbiologia Agrícola. Desde então, já formou mais de 100 Mestres em Microbiologia, cuja atuação abrange os setores público e privado, com ensino, pesquisa e extensão em todo o território brasileiro.

As pesquisas realizadas pelos docentes e discentes do PPGMA estão relacionadas com diferentes aspectos da microbiologia e a agricultura, abordando problemas e temas de interesse da região do Recôncavo e de todo o estado da Bahia, do país e também de abrangência internacional. Em linhas gerais, nossas pesquisas envolvem o acesso à biodiversidade de grupos microbianos de interesse na agricultura e pesca, com o objetivo de explorar seu potencial biotecnológico e o uso de microrganismos, ou de processos microbianos no desenvolvimento de soluções para problemas relacionados à essas áreas.

Os capítulos que compõem essa obra apresentam conteúdo científico atualizado, na área de atuação dos docentes e discentes do PPGMA, dando aos leitores a oportunidade de aprofundar seus conhecimentos científicos. Além do objetivo central de divulgar o conhecimento científico, esperamos que a leitura desse livro inspire jovens futuros cientistas a ingressarem na microbiologia, uma das

áreas mais sedutoras e pulsantes das ciências biológicas, afinal vivemos em um mundo microbiano!

Boa leitura!

# Aplicação de compostos bioativos em alimentos

*Norma Suely Evangelista-Barreto*

*Milena da Cruz Costa*

*Jessica Ferreira Mafra*

*Aline Simões da Rocha Bispo*

Os compostos bioativos são constituintes extranutricionais, presentes em pequenas quantidades nos alimentos, que proporcionam benefícios à saúde, além do valor nutricional básico do produto (KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002). São conhecidos por serem essenciais e não essenciais, como as vitaminas e polifenóis, que são partes constituintes da cadeia alimentar, podendo apresentar efeitos benéficos à saúde humana (BIESALSKI *et al.*, 2009). As substâncias bioativas exibem como efeitos benéficos, a redução do risco de doenças, como câncer, diabetes e doenças cardiovasculares (OH, 2016). Além disso, funcionam como antioxidantes, anti-mutagênicos, antialérgicos, anti-inflamatórios e antimicrobianos, com grande potencial na preservação de alimentos (GIACONIA *et al.*, 2020; BANOŽIĆ, BABIĆ; JOKIĆ, 2020).

As substâncias bioativas são divididas em metabólitos primários, que são as substâncias químicas destinadas ao crescimento e desenvolvimento, como carboidratos, aminoácidos, proteínas e lipídios (BANOŽIĆ; BABIĆ; JOKIĆ, 2020) e metabólitos secundários, que são produzidos por meio de vários processos fisiológicos e bioquímicos e, desempenham papel vital na tolerância a diferentes tipos de estresses (MAHAJAN; KUIRY; PAL, 2020). Nas plantas, os metabólitos secundários desempenham um papel protetor dos estresses bióticos e abióticos (BANOŽIĆ; BABIĆ; JOKIĆ, 2020), além de funções importantes como atividades antifúngicas, antivirais, herbicidas e inseticidas (MIGUEL, 2010).

Todos os organismos vivos produzem compostos bioativos, incluindo os microrganismos, plantas e animais, como parte de seu

mecanismo de defesa (CHANDRA; SHARMA; ARORA, 2020). As plantas, a exemplo de frutas, vegetais e resíduos agroindustriais, animais e microrganismos de ambientes terrestres e marinhos são as principais fontes desses compostos.

## As plantas

Os compostos bioativos das plantas são divididos em quatro categorias de acordo com a *British Nutrition Foundation*. Essas categorias incluem compostos fenólicos (como ligninas, ácido fenólico, taninos, cumarinas, ligninas, estilbenos e flavonoides), terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos e politerpenos), alcaloides (alcaloides verdadeiros, protoalcaloides e pseudoalcaloides) e compostos contendo enxofre (fitoalexinas, tioninas, defensinas e lectinas) (MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2011).

Os compostos fenólicos, incluindo a subcategoria dos flavonoides, estão presentes em todas as plantas e têm sido estudados em cereais, legumes, nozes, azeites, frutas, chás e vinhos tintos (KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002). Estes compostos apresentam excelentes funções na prevenção de várias doenças associadas ao estresse oxidativo (WEN *et al.*, 2019), além de propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, e um grande potencial para a promoção da saúde em muitas áreas (FAKHRI *et al.*, 2020).

Andrade *et al.* (2017) estudando diferentes tipos de própolis brasileiras (marrom, verde e vermelha) relataram altos teores de compostos fenólicos com alta atividade antioxidante, indicando que a própolis é uma fonte promissora de polifenóis biologicamente ativos.

A categoria dos terpenos ou terpenóides compõem outra classe de metabólitos biologicamente ativos, de grande interesse para os seres humanos, devido ao seu uso extensivo nas indústrias alimentícias, farmacêutica, cosmética e agrícola (PICHERSKY; RAGUSO, 2018). Esses compostos são responsáveis por apresentar efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, neuroprotetores, anticancerígenos (FAKHRI *et al.*,

2020) e pela atividade letal ou citotóxica contra microrganismos, fungos e vírus (REDDY *et al.*, 2020). Os terpenos, juntamente com os compostos aromáticos, constituem os óleos essenciais das plantas, geralmente usados como aditivos alimentares, antimicrobianos e aceites globalmente (WINK, 2015). Como exemplo, Bourgou *et al.* (2010) descreveram a atividade biológica do óleo essencial das sementes de *Nigella sativa* (cominho preto), demonstrando a sua aplicação no tratamento de patologias inflamatórias crônicas associadas à superprodução de óxido nítrico, bem como seu uso como agente antibacteriano.

Quimicamente, os alcaloides são um grupo de compostos contendo um ou mais átomos de nitrogênio (dentro do anel heterocíclico), com vários efeitos farmacológicos e biológicos (HAMDI *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2018). Como exemplo, temos a ricinina, um alcaloide tóxico e um dos principais compostos presentes em sementes de *Ricinus communis* (mamona) com atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Salmonella Newport*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus progens*, *Shigella flexneri*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus vulgaris* e *Pseudomonas aeruginosa* (NATH *et al.*, 2011). Em humanos, doses excessivas desse composto causam efeitos como náuseas, vômitos e diarreia (ELIZABETH, 2012).

Os compostos bioativos contendo enxofre são encontrados em muitas espécies de plantas que geralmente têm propriedades defensivas. São derivados de aminoácidos que contêm enxofre (principalmente cisteína), um grupo sulfonato ou uma estrutura contendo um anel tiol (RAAB; FELDMANN, 2019). Os glucosinolatos e as alininas são as principais classes de compostos secundários contendo enxofre, encontrados em níveis elevados nas plantas. Os glucosinolatos são produtos naturais aniônicos observados em mostardas, couves e repolhos, que desempenham papel defensivo nas plantas contra pragas e patógenos (WITTSTOCK; BUROW, 2010).

Os compostos bioativos das plantas possuem diversos mecanismos de ação como efeitos antimicrobianos e antioxidantes.

A ação antimicrobiana de compostos fenólicos pode ser atribuída à capacidade de quelar o ferro, vital para a sobrevivência de quase todas as bactérias, além de desintegrar a membrana externa presente em algumas bactérias, liberando lipopolissacarídeos e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática (PAPUC *et al.*, 2017).

A ação antioxidante dos compostos fenólicos ocorre principalmente pelo mecanismo redox e também, pelos compostos atuarem como agentes redutores, doadores de hidrogênio e inibidores do oxigênio (BORRELLI; TRONO, 2016). Assim, os compostos fenólicos podem impedir a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio reativo, que inclui radicais livres como ânion superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxil (OH) e óxido nítrico (NO), bem como espécies de radicais não livres, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o ácido nitroso ( $HNO_2$ ) (ZHU *et al.*, 2002).

O mecanismo de ação antimicrobiano dos terpenos está relacionado à capacidade de inibir dois processos essenciais à sobrevivência microbiana, a captação de oxigênio e a fosforilação oxidativa (MAHIZAN *et al.*, 2019). Os terpenos também podem aumentar a permeabilidade e a fluidez das membranas, causando um vazamento extensivo de metabólitos e íons essenciais às células bacterianas levando-as a morte (OUSSALAH *et al.*, 2006; SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012).

Os alcaloides apresentam atividade antibacteriana por meio da inibição da respiração e da síntese de DNA e proteínas, assim como inibindo a motilidade bacteriana (SHANG *et al.*, 2017). A sua atividade antioxidante está associada à inibição de espécies ao oxigênio, radical superóxido ( $O_2^-$ ), além de inibir e eliminar a enzima lipogenase (AL-JABER; AWAAD; MOSES, 2011). Enquanto os compostos contendo enxofre são responsáveis pela atividade antioxidante de *Allium* spp. (POOJARY *et al.*, 2017), sendo esta relacionada com o aumento da atividade de algumas enzimas, como a catalase (enzimas antioxidantes), superóxido dismutase e glutathione peroxidase (ROSE *et al.*, 2005).



## Os microrganismos

As bactérias são microrganismos produtores de compostos bioativos com amplas aplicações práticas. Nesse sentido, se destacam as bactérias do ácido lático que apresentam atividade antimicrobiana, devido aos produtos gerados a partir do seu metabolismo, como o ácido lático, ácido acético, peróxido de hidrogênio, diacetaldeído, reuterina e bacteriocinas (HUGAS, 1998; ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2013). Dentre as bacteriocinas, a nisina é uma proteína ou peptídeo biologicamente utilizada como conservante em alimentos em muitos países (DELVES BROUGHTON *et al.*, 1996).

Outras bactérias produtoras de compostos bioativos pertencem aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* (BERDY, 2005). As espécies de *Bacillus* têm sido utilizadas como agentes de biocontrole para proteger espécies vegetais, como tomate, milho, girassol e morango (ZOUARI *et al.*, 2016). O extrato de *Bacillus* sp. MERNA97 isolado de ambiente marinho do mar vermelho contendo metabólitos secundários apresentou potencial efeito protetor contra a toxicidade induzida por aflatoxina B<sub>1</sub>. Esse efeito se deve principalmente ao sinergismo dos compostos bioativos do extrato, uma vez que foram identificados 44 compostos que possuem principalmente atividade antioxidante, anticâncer e antitumoral. Para os autores, essa cepa deve ser considerada uma nova fonte de produção de diferentes produtos farmacêuticos ou aditivos alimentares (ABDEL-WAHHAB *et al.*, 2020).

Uzair *et al.* (2008) isolaram o composto zafrin[4β-metil-5, 6, 7, 8 tetra-hidro-1(4β-H)-fenantrona] de um extrato bruto da bactéria marinha *Pseudomonas stutzeri*. Este composto inibiu o crescimento de vários patógenos humanos, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhi*, *Proteus mirabilis* e *Escherichia coli*. Mukherjee *et al.* (2014) em seu estudo também relataram um composto bioativo produzido por *P. synxantha* com atividade biossurfactante, além de propriedades anti-micobacterianas.

Outro grupo de microrganismos promissor para a produção de compostos ativos é das actinobactérias, que são bactérias Gram-positivas, aeróbias ou anaeróbias, filamentosas e formadoras de esporos (BHATTI; HAQ; BHAT, 2017). O gênero *Streptomyces* contribui com cerca de 7600 compostos com capacidade de eliminar patógenos multirresistentes a antimicrometabólitos bioativos (BERDY, 2012). Sabe-se que este gênero produz diversos metabólitos bioativos, como antibióticos, compostos voláteis e sideróforos (GOLINSKA *et al.*, 2015). Compostos bioativos de actinobactérias foram relatados como responsáveis por eliminar o crescimento de patógenos vegetais em culturas de milho, tomate e bananeira, (CAO *et al.*, 2005; GOUDJAL *et al.*, 2014; TRUJILLO *et al.*, 2015).

Em relação aos mecanismos de ação dos compostos bioativos das bactérias, existem diferentes modelos que explicam o modo de ação das bacteriocinas e, apesar de apresentarem algumas diferenças estruturais, o modo de ação mais reconhecido é a formação de poros e canais de íons na membrana citoplasmática das células-alvo, que modificam a permeabilidade da membrana, resultando no vazamento do material celular (MOLL; KONINGS; DRIESSEN, 1999). Calo-Mata *et al.* (2008) relataram que as bacteriocinas também afetam as membranas, a síntese de DNA e a síntese de proteínas. Estudos relacionados ao mecanismo de ação da nisina apontaram a membrana citoplasmática como o alvo primário. Os efeitos da nisina em células suscetíveis a sua ação, incluem a inibição da biossíntese de RNA, DNA, proteínas, enzimas e polissacarídeos, levando a morte da célula (DE MELO; SOARES; GONÇALVES, 2005).

Dentre os fungos, diversos grupos produzem metabólitos primários e secundários responsáveis por propriedades antioxidantes e antibacterianas. As espécies produtoras de cogumelos se destacam devido à capacidade de produzirem substâncias biologicamente e fisiologicamente ativas, como os compostos fenólicos, policetídeos, terpenos e esteroides. Além disso, diferentes espécies de cogumelos

são as principais fontes de ergotioneína (ERG), um aminoácido que contém tiol de ocorrência natural, conhecido por suas propriedades antioxidantes (WOLDEGIORGIS *et al.*, 2014). Os cogumelos da espécie *Agaricus brasiliensis* apresentaram teores fenólicos, com atividade antioxidante e antimicrobiana contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas. O alto teor de antioxidantes foi extraído com um solvente não tóxico, sugerindo sua aplicação na indústria de alimentos (BACH *et al.*, 2019).

Segundo Hameed *et al.* (2020), os extratos microbianos ricos em compostos antioxidantes produzidos pelo fungo filamentoso *Mucor circinelloides* MCWJ11 foram utilizados em vários sistemas alimentares demonstrando excelente capacidade de eliminação de radicais e quelantes de metais, além da diminuição da degradação de ácidos graxos polinsaturados (PUFAs), com a diminuição da oxidação lipídica em sistemas de emulsão em modelos alimentares.

Os metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos podem ter diversos mecanismo de ação. De acordo com George *et al.* (2019) a ação antibacteriana dos metabólitos secundários de *P. setosum* causou alterações morfológicas e intracelulares em *S. aureus* e *E. coli*. Além disso, segundo os autores as funções biológicas essenciais, como os processos de transporte, osmorregulação e respiração, biossíntese e reticulação do peptidoglicano são sustentadas pela membrana intracelular da bactéria, e qualquer alteração em uma dessas funções biológicas pode interferir na integridade da membrana celular interna das bactérias, causando sua morte celular.

Os compostos isolados de fungos endofíticos também podem se ligar à proteína FtsZ e atuarem como inibidores potentes de infecções bacterianas. FtsZ é a primeira proteína a se mover para o local da divisão e recrutar outras proteínas que produzem uma nova parede celular entre as células em divisão (BALLU *et al.*, 2018). Segundo Wu *et al.* (2018) os metabólitos bioativos produzidos pelo fungo endofítico de *Ginkgo biloba* L. é um potencial inibidor da proteína FtsZ em *S. aureus*.

## As algas

As algas contêm diversos compostos biologicamente ativos como os polissacarídeos, vitaminas B, carotenoides, polifenóis, fibras alimentares, proteínas, e compostos naturais de crescimento de plantas (ex. auxinas, giberelinas e citocininas) com potencial aplicação industrial. Elas são descritas como potenciais produtoras de compostos com atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral (MICHALAK; CHOJNACKA, 2015).

As algas marinhas são divididas em três classes, as algas marrons (*Phaeophyta*), vermelhas (*Rhodophyta*) e verdes (*Chlorophyta*) dependendo de sua estrutura química e distribuição de pigmentos (CIKOS *et al.*, 2018). Das três classes, as algas vermelhas são as maiores produtoras de compostos bioativos (ABDEL-RAOUF *et al.*, 2015), com grande aplicação na indústria cosmética, farmacêutica e de alimentos. As algas vermelhas do gênero *Laurencia* coletadas em várias partes do mundo produzem uma diversidade de metabólitos secundários, como os sesquiterpenos e alguns di- e triterpenos (SUN *et al.*, 2005).

Os compostos fenólicos presentes em extratos das algas marrons, *Ascophyllum nodosum* (ANE), *Bifurcaria bifurcata* (BBE) e *Fucus vesiculosus* (FVE), da Galiza na Espanha, podem ser explorados como fontes de compostos fenólicos antioxidantes, com potenciais aplicações nos setores de alimentos e saúde (AGREGÁN *et al.*, 2017). Além disso, as algas vermelhas unicelulares *Porphyridium* spp. podem acumular naturalmente grande quantidade de polissacarídeos extracelulares e fitoeritrina, com grande potencial de uso em alimentos, medicamentos e nutrição (LI *et al.*, 2019).

Anjali *et al.* (2019) comparando a atividade antioxidante e antibacteriana de dois tipos de algas, *Ulva lactuca* (verde) e *Stoechospermum marginatum* (marrom), relataram que as algas verdes apresentaram maior atividade na eliminação de radicais e maior atividade antioxidante em relação às algas marrons. O mesmo foi

observado para a eficácia antibacteriana das algas verdes, com os compostos alcaloides e flavonoides, os principais responsáveis pela atividade biológica.

Durante os últimos anos, muitos estudos foram realizados sobre a atividade biológica das algas marinhas (ASLAN *et al.*, 2019) e um dos mecanismos pelos quais os antioxidantes inibem a oxidação é a eliminação ou inibição de radicais livres, como cátion de radical ABTS<sup>+</sup>, radical DPPH e espécies reativas, como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais peroxila e hidroxila, oxigênio singlete e peroxinitrito, responsáveis por danos oxidativos no corpo humano e em alimentos (BALBOA *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2017).

Os compostos antimicrobianos provenientes de algas podem inibir a síntese da formação da parede celular e bloquear a síntese de peptidoglicano bacteriano, que é um recurso obrigatório para as células sobreviverem. Essas moléculas antimicrobianas podem ainda impedir o processo de transpeptidação, danificar a membrana plasmática e inibir a função da membrana bacteriana. Além disso, o agente antimicrobiano também pode interferir na síntese de DNA ou RNA, impedindo a transmissão de informação genética nos microrganismos. Em alguns casos, os agentes também inibem a síntese de DNA girase, uma enzima que desempenha um papel importante para replicação no desenrolamento de cadeias de DNA (BAJPAI, 2016).

## **Resíduos agroindustriais**

Os resíduos agroindustriais compreendem todo resíduo gerado pela atividade das indústrias agrícola, pecuária ou aquícola. A maioria desses resíduos são sólidos, mas também podem ser encontrados na forma líquida ou gasosa. Todos os anos, as indústrias que processam matéria-prima agroindustrial no Brasil produzem grande quantidade de resíduos sólidos, especialmente durante o beneficiamento de alimentos (SARAIVA *et al.*, 2018). Estimativas da *Food and Agriculture Organization* (FAO) sugerem que um terço dos alimentos produzidos

no mundo para consumo humano (1,3 bilhões de toneladas) acabe no lixo anualmente e 40% da perda de alimentos em países em desenvolvimento como o Brasil, ocorre após a colheita ou durante o processamento, devido às condições inadequadas de armazenamento e transporte (FAO, 2011).

Nas últimas décadas, a aquicultura como também a produção e processamento de frutas e vegetais tem aumentado continuamente, impulsionada pelo aumento da população e mudanças de hábitos alimentares. Este crescimento segue a preferência de uma parcela significativa de consumidores por alimentos naturais e de qualidade, para um estilo de vida mais saudável, uma vez que proporciona uma quantidade substancial de nutrientes (FAO, 2018; COMAN *et al.*, 2020).

Na indústria aquícola, um dos segmentos que mais cresce é o processamento de crustáceos, gerando, conseqüentemente, grande quantidade de resíduos que muitas vezes são descartados indevidamente. Estima-se que no mundo, somente o processamento de crustáceos resulte todos os anos na produção de 6 a 8 milhões de toneladas de resíduos (MAO *et al.*, 2017). Já a indústria de processamento de frutas contribui anualmente com mais de 0,5 bilhões de toneladas de resíduos em todo o mundo (BANERJEE *et al.*, 2017). Ao contrário dos produtos processados, as frutas frescas e os vegetais apresentam componentes não comestíveis como camadas externas e sementes, que por não existir um mercado definido para sua comercialização, normalmente são descartados sem tratamento, causando impacto ambiental, social e econômico (LAURENTIIS; CORRADO; SALA, 2018). A parte não comestível constitui, por exemplo, na banana 35%, no abacaxi 46%, na toranja 30%, em frutas cítricas 25-35%, na maçã 12%, na melancia 48%, na couve-flor e brócolis 43%, na cenoura e nabo 20% e no alho 22% (LAURENTIIS; CORRADO; SALA, 2018). Esses subprodutos industriais, formados principalmente por cascas, bagaços e sementes, apresentam elevado valor nutritivo, e, portanto, poderiam ser reaproveitados pela indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia,

como fonte de compostos bioativos como proteínas, fitoquímicos, óleos essenciais, polissacarídeos, fibras alimentares, sais minerais e vitaminas (BANERJEE *et al.*, 2017).

Neste cenário, muitas alternativas para o destino de resíduos de alimentos têm surgido e têm sido alvo constante de pesquisas, como, por exemplo, a utilização de farinhas, óleos essenciais, extratos ou compostos isolados de subprodutos como bioingredientes em alimentos funcionais voltados para o consumo humano. Destacamos aqui três subprodutos atualmente sendo investigados como bioingredientes que poderiam contribuir com a redução dos resíduos agroindustriais.

O primeiro é o reaproveitamento de resíduos de frutas e vegetais por meio da extração de óleos essenciais. Os óleos são líquidos aromáticos e voláteis obtidos de materiais vegetais, incluindo flores, raízes, cascas, folhas, sementes, frutas, madeira e plantas inteiras (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012). Os óleos essenciais apresentam muitos compostos bioativos, principalmente derivados de terpenos (mono e sesquiterpeno), que podem ser hidrocarbonetos como  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno, presentes em aguarrás ou oxigenados como o eugenol encontrados no cravo-da-índia (RÍOS, 2016).

Na indústria alimentícia, os óleos essenciais podem ser usados em uma variedade de segmentos como na produção de bebidas, aromatizantes ou como conservantes de alimentos, devido as suas propriedades biológicas, como atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante, entre outras (RÍOS, 2016; VIEIRA *et al.*, 2019).

A segunda alternativa seria a produção de extratos como fontes naturais de substâncias bioativas ou como substituto de conservantes químicos para aplicação na indústria de alimentos. Na produção de suco, o processamento de frutas cítricas gera milhares de toneladas de cascas como resíduos. A casca de frutas cítricas é um subproduto rico em compostos fenólicos como ácidos fenólicos (principalmente ácido cafeico, p-cumarico, ferúlico e sinápico), flavanonas (geralmente

naringina e hesperidina) e flavonas polimetoxiladas (principalmente nobiletina e tangeretina) que apresentam potencial antioxidante e benefícios à saúde (SINGH *et al.*, 2020).

Outro extrato que vem chamando a atenção como ingrediente funcional em alimentos, devido a sua composição química e propriedades biológicas é o extrato de própolis, subproduto das abelhas. O Brasil apresenta potencial na produção de própolis devido à grande biodiversidade, com 13 tipos de própolis. A composição química da própolis depende da vegetação, e, varia de acordo com a região geográfica, clima, meio ambiente condições e época de colheita. Normalmente são encontrados nos diferentes tipos de própolis ácidos fenólicos, flavonoides, incluindo flavonas, flavanonas, flavonóis e chalconas, terpenos, aldeídos aromáticos, álcoois, ácidos graxos, estilbenos, esteroide, aminoácidos, lignanas e açúcares (ANDRADE *et al.*, 2017).

Como terceira alternativa se tem a extração de quitosana a partir das cascas de crustáceos, que compõem grande parte dos resíduos da carcinicultura. A quitosana é um biopolímero linear comumente usado como revestimento em alimentos, devido à sua natureza não tóxica, biocompatibilidade, biodegradabilidade, ação antimicrobiana, antioxidante e capacidade de formação de filme (VIEIRA *et al.*, 2019). Nos últimos anos, a quitosana tem despertado interesse considerável por seus efeitos bioativos que são atribuídos principalmente à sua natureza policatiônica (LIZARDI-MENDOZA; MONAL; VALENCIA, 2016).

### **Aplicação em alimentos**

A busca da indústria de alimentos por ingredientes funcionais obtidos a partir de fontes naturais tem crescido nos últimos anos, e esse aumento está aliado ao interesse do consumidor por alimentos mais saudáveis, bem como o interesse da indústria em evitar a deterioração, contaminação microbiana e a oxidação lipídica. O fato comprovado de que substâncias naturais diminuem ou eliminam os prejuízos



gerados pelas indústrias que utilizaram conservantes sintéticos, como, por exemplo, o 2,3-terc-butilhidroxianisol (BHA) e 2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno (BHT), tem levado à busca por fontes alternativas que sejam viáveis e capazes de substituírem e/ou se associar aos antioxidantes sintéticos e antimicrobianos convencionais. Desta forma, o uso de extratos vegetais, óleos essenciais e biopolímeros como a quitosana, são considerados fontes promissoras para serem inseridas em alimentos, com a finalidade de atuarem como saudáveis, funcionais e ainda, como conservantes naturais.

Qualquer substância com capacidade de retardar ou impedir o processo de oxidação (rancificação ou *off-flavors*) em alimentos é chamado de antioxidante. Além disso, os antioxidantes atuam na diminuição da formação de produtos tóxicos, mantêm a qualidade nutricional e sensorial do produto e, podem aumentar a vida de prateleira (DEHGHANI; HOSSEINI; REGENSTEIN, 2018). Por outro lado, agentes antimicrobianos são aqueles que interferem na reprodução e crescimento de microrganismos em geral. A segurança alimentar e o prazo de validade dos alimentos estão relacionados à presença da deterioração dos alimentos e à presença de microrganismos patogênicos e, devido a esses fatores, durante o armazenamento, muitas reações químicas e enzimáticas endógenas ocorrem alterando a sua qualidade (PISOSCHI *et al.*, 2018).

Diante do exposto, há um grande interesse pelo estudo da oxidação lipídica, em virtude da deterioração que este tipo de dano oxidativo pode causar e sua atividade antimicrobiana. A formação de filmes e de revestimentos comestíveis são consideradas técnicas eficientes para prolongar a validade dos alimentos, e alguns dos polímeros que podem ser utilizados são as proteínas ou polissacarídeos, como a quitosana e o alginato de sódio (SÁNCHEZ-ORTEGA *et al.*, 2014).

No Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental (LABMAA) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), a extensão da vida útil do pescado tem sido obtida com diversos

compostos bioativos. Rodrigues *et al.* (2020) estudaram filés de robalo (*Centropomus undecimalis*) congelados, com revestimento comestível de alginato de sódio incorporado com extrato etanólico de *Padina gymnospora*. Vieira *et al.* (2019), avaliaram o efeito sinérgico do revestimento de quitosana adicionado de óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) na preservação de filés de tambaqui (*Colossoma macropomum*) obtiveram redução da oxidação lipídica e atividade antimicrobiana. Santana *et al.* (2019) ao testarem o óleo essencial de cravo com extrato de própolis verde, observaram o aumento da vida útil do sururu (*Mytella guyanensis*) refrigerado, em mais de 10 dias, com redução da carga microbiana de coliformes. Ribeiro (2018) ao estudar o revestimento de alginato de sódio com óleo essencial de tomilho branco em filés de tilápia verificou que o revestimento apresentou potencial antioxidante em filés de peixe, podendo ser utilizado em substituição ao conservante sintético BHT.

Ainda com o grupo de pesquisas do LABMAA, Evangelista-Barreto *et al.* (2018) demonstraram que o óleo essencial de orégano atuou como barreira no desenvolvimento de bactérias deteriorantes e *E. coli*, em linguça de peixe frescal, devido sua forte atividade antibacteriana. Silva *et al.* (2019) promoveram diminuição significativa da carga microbiana patogênica de *S. enteriditis* e *S. aureus*, ao revestirem carne bovina com 2% de quitosana. Falcão (2019) avaliando o revestimento comestível de quitosana e própolis verde em diferentes concentrações em cortes de bife suína, relatou a extensão da vida útil das bistecas em 12 dias, quando armazenadas sob refrigeração.

Vale ressaltar, que todas essas aplicações e resultados são dependentes de diferentes variáveis, como, por exemplo, a fonte alimentar, o polímero utilizado para formação do revestimento, os microrganismos estudados, as substâncias antimicrobianas testadas e também as condições de armazenamento. Assim, a aplicação de compostos bioativos poderá agregar valor sensorial ao produto, estender a vida útil, garantir a segurança alimentar, e ainda, reduzir os custos de produção.

## Referências

ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes.

**Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, nov., p.877-902, 2013. doi: org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.002

ABDEL-RAOUF, N. *et al.* Antibacterial  $\beta$ -amyryn isolated from *Laurencia microcladia*. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 32-37, jan., 2015. doi: org/10.1016/j.arabjc.2013.09.033

ABDEL-WAHAB, M. A. *et al.* Secondary metabolites from *Bacillus* sp. MERNA97 extract attenuates the oxidative stress, genotoxicity and cytotoxicity of aflatoxin B1 in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 141, p. 111399, jul., 2020. doi: org/10.1016/j.fct.2020.111399

AGREGÁN, R. *et al.* Phenolic compounds from three brown seaweed species using LC-DAD—ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 99, p. 979-985, sept., 2017. doi: org/10.1016/j.foodres.2017.03.043

AL-JABER, N. A.; AWAAD, A. S.; MOSES, J. E. Review on some antioxidant plants growing in Arab world. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, n. 4, p. 293-307, oct., 2011. doi: org/10.1016/j.jscs.2011.07.004

ANDRADE, J. K. S. *et al.* Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, p. 129-138, nov., 2017. doi: org/10.1016/j.foodres.2017.08.066

ANJALI, K. P. *et al.* Bioprospecting of seaweeds (*Ulva lactuca* and *Stoechospermum marginatum*): the compound characterization and functional applications in medicine - A comparative study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 200, p. 111622, nov., 2019. doi: org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111622

ASLAN, E. *et al.* Monitoring the antioxidant activities by extracting the polyphenolic contents of algae collected from the Bosphorus. **Marine Pollution Bulletin**, v. 141, p. 313-317, apr., 2019. doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.02.059

BACH, F. *et al.* Bio compounds of edible mushrooms: *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities. **LWT – Food Science and Technology**, v. 107, p. 214-220, jun., 2019. doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.017

BAJPAI, V. K. Antimicrobial bioactive compounds from marine algae: A mini review. **Indian Journal of Geo - Marine Sciences**, v. 45, n. 9, p. 1076-1085, sept., 2016.

BALBOA, E. M. *et al.* *In vitro* antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2-3, p. 1764-1785, jun., 2013. doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.026

BALLU, S. *et al.* Structural insights of *Staphylococcus aureus* FtsZ inhibitors through molecular docking, 3D-QSAR and molecular dynamics simulations. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 38, n. 1, p. 61-70, feb., 2018. doi: 10.1080/10799893.2018.1426607.

BANERJEE, J. *et al.* Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. **Food Chemistry**, v. 225, p. 10-22, jun., 2017. doi: org/10.1016/j.foodchem.2016.12.093

BANOZIC, M.; BABIC, J.; JOKIC, S. Recent advances in extraction of bioactive compounds from tobacco industrial waste-a review. **Industrial Crops and Products**, v. 144, p. 112009, feb., 2020. doi: org/10.1016/j.indcrop.2019.112009

BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of Antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1-26, jan., 2005. doi: 10.1038/ja.2005.1.

BERDY, J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. **The Journal of Antibiotics**, v. 65, n. 8, p. 385-395, aug., 2012. doi: 10.1038/ja.2012.27.

BHATTI, A. A.; HAQ, S.; BHAT, R. A. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, p. 458-467, sep., 2017. doi: 10.1016/j.micpath.2017.09.036

BIESALSKI, H.-K. *et al.* Bioactive compounds: definition and assessment of activity. **Nutrition**, v. 25, n. 11-12, p. 1202-1205, nov./dec., 2009. doi: 10.1016/j.nut.2009.04.023

BORRELLI, G.; TRONO, D. Molecular approaches to genetically improve the accumulation of health-promoting secondary metabolites in Staple Crops - A case study: the lipoxygenase-b1 genes and regulation of the carotenoid content in pasta products. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, p. 1177, jul., 2016. doi: 10.3390/ijms17071177

BOURGOU, S. *et al.* Bioactivities of black cumin essential oil and its main terpenes from Tunisia. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 2, p. 210-216, apr., 2010. doi: org/10.1016/j.sajb.2009.10.009

CALO-MATA, P. *et al.* Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, n. 1, p. 43-63, mar., 2008. doi: 10.1007/s11947-007-0021-2

CAO, L. *et al.* Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. **FEMS Microbiology Letters**, v. 247, n. 2, p. 147-152, jun., 2005. doi: 10.1016/j.femsle.2005.05.006

CHANDRA, P.; SHARMA, R. K.; ARORA, D. S. Antioxidant compounds from microbial sources: a review. **Food Research International**, v. 129, p. 108849, mar., 2020. doi: org/10.1016/j.foodres.2019.108849

CIKOS, A.-M. *et al.* Overview on the application of modern methods for the extraction of bioactive compounds from marine macroalgae. **Marine Drugs**, v. 16, n. 10, p. 348, sep., 2018. doi: 10.3390/md16100348

COMAN, V. *et al.* Bioactive potential of fruit and vegetable wastes. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 91, p. 157-225, 2020. doi: org/10.1016/bs.afnr.2019.07.001

DE MELO, N. R.; SOARES, N. F. F.; GONÇALVES, M. P. J. C. Nisina: um conservante natural para alimentos. **Revista Ceres**, v. 52, n. 303, p. 921-938, 2005.

DEGHANI S.; HOSSEINI, S. V.; REGENSTEIN, J. M. Edible films and coatings in seafood preservation: A review. **Food Chemistry**, v. 240, p. 505-513, feb., 2018. doi: org/10.1016/j.foodchem.2017.07.034

DELVES-BROUGHTON, J. *et al.* Applications of the bacteriocin, nisin. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 69, n. 2, p. 193-202, feb., 1996. doi: 10.1007/BF00399424

ELIZABETH, H. I. *et al.* Evaluation of ricinine, a ricin biomarker, from a non-lethal castor bean ingestion. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 36, n. 9, p. 660-662, nov./dec., 2012. doi: 10.1093/jat/bks077

EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; COSTA JUNIOR, P. S. P.; VIEIRA, B. B. Control of psychrotrophic bacteria and *Escherichia coli* in frescal type fish sausage using oregano essential oil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 44, p. 68-73, mar., 2018. doi: 10.20950/1678-2305.2018.235

FAKHRI, S. *et al.* Modulation of dysregulated cancer metabolism by plant secondary metabolites: A mechanistic review. **Seminars in Cancer Biology**, v. 7, p. 1-30, feb., 2020. doi: org/10.1016/j.semcancer.2020.02.007

FALCÃO, R. S. J. **Conservação de corte suíno utilizando revestimento de quitosana adicionado ao extrato de própolis verde**. 2019. 38f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Zootecnia) — Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2019.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Global food losses and food waste** - Extent, causes and prevention. Roma. 2011.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The state of world fisheries and aquaculture 2018** - Meeting the sustainable development goals. Roma, 2018, p. 227. Disponível em: <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>. Acesso em: 30 mai. 2020.

GEORGE, T. K. *et al.* *In vitro* and *in silico* docking studies of antibacterial compounds derived from endophytic *Penicillium setosum*. **Microbial Pathogenesis**, v. 131, p. 87-97, jun., 2019.

GIACONIA, M. A. *et al.* Overcoming restrictions of bioactive compounds biological effects in food using nanometer-sized structures.

**Food Hydrocolloids**, v. 107, p. 105939, oct., 2020. doi: org/10.1016/j.foodhyd.2020.105939

GOLINSKA, P. *et al.* Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 108, n. 2, p. 267-289, jun., 2015. doi: 10.1007/s10482-015-0502-7

GOUDJAL, Y. *et al.* Biocontrol of rhizoctonia solani damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 59-65, jan., 2014. doi: org/10.1016/j.micres.2013.06.014

HAMDI, A. M. *et al.* Biochemical and computational evaluation of triptolide-induced cytotoxicity against NSCLC. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 1557-1566, jul., 2018. doi: 10.1016/j.biopha.2018.04.198

HAMEED, A. *et al.* Antioxidant activity of polyphenolic extracts of filamentous fungus *Mucor circinelloides* (WJ11): extraction, characterization and storage stability of food emulsions. **Food Bioscience**, v. 34, p. 100525, apr., 2020. doi: org/10.1016/j.fbio.2019.100525

HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, v. 49, n. 1, p. S139-S150, 1998. doi: org/10.1016/S0309-1740(98)90044-4

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 1-24, jan., 2012. doi: 10.3389/fmicb.2012.00012

KRIS-ETHERTON, P. M. *et al.* Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American Journal of Medicine**, v. 113, n. 9, p. 71-88, dec., 2002. doi: 10.1016/s0002-9343(01)00995-0

KUSHWAHA, P. P. *et al.* **Prenylated flavonoids as a promising drug discovery candidate:** a pharmacological update. *Phytochemicals as Lead Compounds for New Drug Discovery*. Chapter 23, p.347-355, 2020.

LAURENTIIS, V.; CORRADO, S.; SALA, S. Quantifying household waste of fresh fruit and vegetables in the EU. **Waste Management**, v. 77, p. 238-251, jul., 2018. doi: org/10.1016/j.wasman.2018.04.001

LI, S. *et al.* Advances in the production of bioactive substances from marine unicellular microalgae *Porphyridium* spp. **Bioresource Technology**, v. 292, p. 122048, nov., 2019. doi: org/10.1016/j.biortech.2019.122048

LIU, X. *et al.* Antioxidant activity of brown algae chlorotannins. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 10, n. 6, p. 184-191, 2017.

LIZARDI-MENDOZA, J.; MONAL, W. M. A; VALENCIA, F. M. G. Chemical characteristics and functional properties of chitosan. **Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities**, p. 3-31, 2016.

MAHAJAN, M.; KUIRY, R.; PAL, P. K. Understanding the consequence of environmental stress for accumulation of secondary metabolites in medicinal and aromatic plants. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 28, p. 100255, sep., 2020. doi: org/10.1016/j.jarmap.2020.100255

MAHIZAN, N. A. *et al.* Terpene derivatives as a potential agent against antimicrobial resistance (AMR) pathogens. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 2631, jul., 2019. doi: 10.3390/molecules24142631

MAO, X. *et al.* Comprehensive utilization of shrimp waste based on biotechnological methods: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 143, p. 814-823, feb., 2017. doi: org/10.1016/j.jclepro.2016.12.042

MAZID, M.; KHAN, T. A.; MOHAMMAD, F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. **Biology and Medicine**, v. 3, n. 2, p. 232-249, oct., 2011.



MICHALAK, I.; CHOJNACKA, K. Algae as production systems of bioactive compounds. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, n. 2, p. 160-176, 2015. doi: 10.1002/elsc.201400191

MIGUEL, M. G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 9252-9287, dec., 2010. doi: 10.3390/molecules15129252

MOLL, G. N.; KONINGS, W. N.; DRIESSEN, A. J. M. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 76, n. 1-4, p. 185-198, 1999.

MUKHERJEE, K. *et al.* Bioactive compound from *Pseudomonas synxantha* inhibits the growth of Mycobacteria. **Microbiological Research**, v. 169, n. 9-10, p. 794-802, sep./oct., 2014. doi: org/10.1016/j.micres.2013.12.005

NATH, S. *et al.* Restorative aspect of castor bean in the physiology of mammals: a review. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 1, n. 2, p. 236-246, 2011.

OH, Y. S. Bioactive compounds and their neuroprotective effects in diabetic complications. **Nutrients**, v. 8, n. 8, p. 472, jul., 2016. doi: 10.3390/nu8080472

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; LACROIX, M. Mechanism of action of spanish oregano, chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 5, p. 1046-1055, may., 2006. doi: 10.4315/0362-028x-69.5.1046

PAPUC, C. *et al.* Plant polyphenols as antioxidant and antibacterial agents for shelf-life extension of meat and meat products: classification, structures, sources, and action mechanisms: **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 6, p. 1243-1268, sept., 2017. doi: org/10.1111/1541-4337.12298

PICHERSKY, E.; RAGUSO, R. A. Why do plants produce so many terpenoid compounds? **New Phytologist**, v. 220, n. 3, p. 692-702, nov., 2018. doi: 10.1111/nph.14178

PISOSCHI, A. M. *et al.* An overview of natural antimicrobials role in food. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 922-935, jan., 2018. doi: org/10.1016/j.ejmech.2017.11.095

POOJARY, M. M. *et al.* Stability and extraction of bioactive sulfur compounds from *Allium* genus processed by traditional and innovative technologies. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 61, p. 28-39, aug., 2017. doi: org/10.1016/j.jfca.2017.04.007

RAAB, A.; FELDMANN, J. Biological sulphur-containing compounds-analytical challenges. **Analytica Chimica Acta**, v. 1079, n. 4, p. 20-294, 2019.

REDDY, P. R. K. *et al.* Plant secondary metabolites as feed additives in calves for antimicrobial stewardship. **Animal Feed Science and Technology**, v. 264, p. 114469, nov., 2020. doi: org/10.1016/j.aca.2019.05.064

RIBIERO, A. S. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e sua aplicação em revestimento edível em filés de tilápia**. 2018. 39f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Biologia) — Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2018.

RÍOS, J.-L. Essential oils: What they are and how the terms are used and defined. *In*: Preedy, V. R. (Coord.). **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**, Academic Press, Cap. 1. p.3-10, 2016.

RODRIGUES, A. V. N. *et al.* Oxidative and microbial stability of sea bass fillets containing *Padina gymnospora* extract stored under frozen conditions. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 3, p. 11487-11509, jan., 2020. doi: 10.34117/bjdv6n3-132

ROSE, P. *et al.* Bioactive S-alk (en) yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents. **Natural Product Reports**, v. 22, n. 3, p. 351-368, jun., 2005. doi: 10.1039/b417639c

SÁNCHEZ-ORTEGA, I. *et al.* Antimicrobial edible films and coatings for meat and meat products preservation. **Scientific World Journal**, p. 2014, p. 248935, 2014. doi.org/10.1155/2014/248935

SANTANA, T. S. *et al.* Efeito do revestimento edível usando própolis verde e óleo de cravo na conservação de sururu refrigerado. *In*: Flávio Ferreira Silva. (Org.). **Qualidade de Produtos de Origem Animal** 2. 1 ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019, v. 2, p. 30-37.

SARAIVA, B. R. *et al.* Valorização de resíduos agroindustriais: fontes de nutrientes e compostos bioativos para a alimentação humana. **PubSaúde**, v. 1, p. a009, 2018. doi.org/10.31533/pubsaude1.a 007

SHANG, X. *et al.* Biologically active quinoline and quinazoline alkaloids part I. **Medicinal Research Reviews**, v. 38, n. 3, p. 775-828, sep., 2017. doi: 10.1002/med.21466

SILVA, A. S. *et al.* Effect of chitosan coating on contamination of fresh bovine meat sold in the open market. **Revista Ciência Agronômica**, v. 50, p. 38-43, jan./mar., 2019. doi.org/10.5935/1806-6690.20190005

SINGH, B. *et al.* Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of citrus peel. **Food Research International**, v. 132, p. 109114, jun., 2020. doi: org/10.1016/j.foodres.2020.109114

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136-141, apr., 2012. doi: 10.1016/j.copbio.2011.08.005

SUN, J. *et al.* Sesquiterpenes from the red alga *Laurencia tristicha*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 6, p. 915-919, jun., 2005. doi. org/10.1021/np050096g

TRUJILLO, M. E. *et al.* Endophytic actinobacteria and interaction of micromonospora and nitrogen fixing plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1341, dec., 2015. doi: 10.3389/fmicb.2015.01341

UZAIR, B. *et al.* The isolation, purification and biological activity of a novel antibacterial compound produced by *Pseudomonas stutzeri*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 279, n. 2, p. 243-250, feb., 2008. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.01036.x

VIEIRA, B. B. *et al.* Combination of chitosan coating and clove essential oil reduces lipid oxidation and microbial growth in frozen stored tambaqui (*Colossoma macropomum*) fillets. **LWT-Food Science and Technology**, v. 116, p. 108546, dec., 2019. doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108546

WEN, P. *et al.* Mulberry: A review of bioactive compounds and advanced processing technology. **Trends in Food Science and Technology**, v. 83, p. 138-158, jan., 2019. doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.017

WINK, M. Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. **Medicines**, v. 2, n. 3, p. 251-286, sep., 2015. doi: 10.3390/medicines2030251

WITTSTOCK, U.; BUROW, M. Glucosinolate breakdown in Arabidopsis: mechanism, regulation and biological significance. **The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists**, v. 8, p. 0134, jul., 2010. doi: 10.1199/tab.0134

WOLDEGIORGIS, A. Z. *et al.* Antioxidant property of edible mushrooms collected from Ethiopia. **Food Chemistry**, v. 157, p. 30-36, aug., 2014. doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.014

WU, Y. *et al.* An endophytic fungi of ginkgo biloba L. produces antimicrobial metabolites as potential inhibitors of FtsZ of *Staphylococcus aureus*. **Fitoterapia**, v. 128, p. 265-271, jul., 2018. doi: 10.1016/j.fitote.2018.05.033

ZHU, J. *et al.* Triptolide enhances chemotherapeutic efficacy of antitumor drugs in non-small-cell lung cancer cells by inhibiting Nrf2-ARE activity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 358, p. 1-9, nov., 2018. doi: 10.1016/j.taap.2018.09.004

ZHU, Q. Y. *et al.* Antioxidative activities of oolong tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 23, p. 6929-6934, nov., 2002. doi: 10.1021/jf0206163

ZOUARI, I. *et al.* Biocontrol activity of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain CEIZ-11 against *Pythium aphanidermatum* and purification of its bioactive compounds. **Biological Control**, v. 100, p. 54-62, sep., 2016. doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.05.012

# Aspectos microbiológicos e químicos de sururu

*Allana de Oliveira Santos*

*Fernanda Freitas*

*Valéria Macedo Almeida Camilo*

*Edileide Santana da Cruz*

*Fábio Santos de Oliveira*

*Isabella de Matos Mendes da Silva*

Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são uma grande preocupação de saúde pública global. Trata-se de uma síndrome geralmente constituída de anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia, acompanhada ou não de febre, relacionada à ingestão de alimentos ou água contaminados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Dentre os alimentos envolvidos em surtos de DTA está o pescado que inclui peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, répteis, equinodermos e outros animais aquáticos usados na alimentação humana (BRASIL, 2017). Assim, o consumo de pescado contaminado é visto como uma prática que oferece risco à Segurança Alimentar e Nutricional (SAN).

A SAN é definida como:

[...] a realização do direito de todos ao acesso regular e permanente a alimentos de qualidade, em quantidade suficiente, sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais, tendo como base práticas alimentares promotoras da saúde, que respeitem a diversidade cultural e que sejam social, econômica e ambientalmente sustentáveis (BRASIL, 2006, p.1).

Para o alcance da SAN, Bhutta *et al.* (2013) e Pinstrup-Andersen (2009) afirmam que, ao nível individual ou familiar, deve haver segurança microbiológica e a ausência de contaminantes físicos e químicos nos alimentos, pois condições sanitárias desfavoráveis, assim como contaminações químicas repercutem na segurança dos alimentos, constituindo-se um risco à saúde pública e à saúde ambiental.

Na costa brasileira, os bivalves são relevantes na economia de subsistência de comunidades tradicionais, algumas das quais residem no entorno de áreas de proteção marinha, que localmente são denominadas de Reservas Extrativistas (RESEX) Marinhas, Unidades de Conservação cujo objetivo é o uso sustentável dos recursos naturais e a proteção dos meios de subsistência e da cultura de populações litorâneas (BRASIL, 2000).

O molusco bivalve *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819), conhecido popularmente como “sururu” ou “marisco-do-mangue”, é um desses bivalves que se constitui em um importante recurso pesqueiro para as populações litorâneas brasileiras, sendo considerado fonte de subsistência e renda (NISHIDA; NORDI; ALVES, 2008). Além disso, é considerado fonte protéica para a alimentação, e também um indicador ambiental, visto que apresenta morfologia de animal filtrador, possuindo a capacidade de absorver substâncias químicas e micro-organismos presentes no ambiente, os quais podem ser prejudiciais à saúde humana (NASCIMENTO *et al.*, 2011).

Alguns micro-organismos associados aos moluscos bivalves podem causar surtos de toxinfecções alimentares em humanos, por meio da ingestão desses moluscos contaminados. Sua microbiota envolve *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Vibrio* spp. (SANDE *et al.*, 2010). A contaminação microbiana pode ser resultante do ambiente, ou pode ser adquirido por meio da manipulação inadequada, no armazenamento e durante o processo de comercialização (SILVA JUNIOR, 2014).

Além dos perigos biológicos, águas contaminadas por poluentes químicos representam riscos à saúde ambiental e pública, uma vez que podem ter efeitos tóxicos para todo o ecossistema (SANTOS, 2009). O contato com esses tipos de poluentes causa alterações nos animais que se iniciam no nível celular/molecular e se estendem para

tecidos e órgãos, desencadeando efeitos secundários, os quais levam a anomalias ou à mortalidade (SANDERS, 1990). Já para humanos, estudos demonstram que esses poluentes podem ocasionar distúrbios no sistema nervoso central e até o óbito (FERREIRA *et al.*, 2007).

Desta forma, o Grupo de Pesquisa Saúde Alimentos, Nutrição e Ambiente (SANA), cadastrado no CNPq, desenvolveu ações de pesquisa sobre a qualidade do sururu *M. guyanensis* produzido e comercializado na Baía do Iguape (Bahia, Brasil), vinculadas ao projeto de pesquisa *Mulheres Mariscando e Pescando Sonhos: Inclusão Sócio-produtiva de Famílias Quilombolas*.

### **Moluscos bivalves**

São denominados moluscos bivalves, os animais que possuem um corpo mole, protegido por uma concha de duas valvas, as quais, por sua vez, mantêm-se unidas devido à presença dos músculos adutores em cada uma das suas extremidades e sua retracção faz com que as válvulas se fechem (SILVA; BATISTA, 2008).

Dentre os moluscos bivalves comestíveis comercializados no Brasil, destacam-se, *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819), *Mytella falcata* (Orbigny, 1842), *Iphigenia brasiliensis* (Lamarck, 1818), *Tagelus plebeius* (Lighffort, 1786), *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828), *Perna perna* (Linnaeus, 1758) e *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (MONTELES *et al.*, 2009).

Devido ao seu alto valor nutricional, os mesmos desempenham elevada importância na dieta humana por serem fonte de nutrientes essenciais (FAO, 2012), como proteínas, vitaminas (A e D), minerais, como zinco, ferro e cobre, ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (PUFA) da série ômega três ( $\omega$ -3) e ômega seis ( $\omega$ -6) e carboidratos, e por apresentarem baixo valor calórico (SANTOS *et al.*, 2014).

A composição e qualidade dos moluscos bivalves comestíveis podem ser influenciadas por diversos fatores, dependendo da espécie. Entre

indivíduos da mesma espécie, a composição depende de fatores genéticos, fisiológicos, grau de maturação sexual, idade, sexo, zona geográfica, época do ano, dieta e disponibilidade alimentar, fatores ambientais (temperatura da água, salinidade, oxigênio dissolvido), sistema de cultivo, manuseio e condições de conservação (NUNES *et al.*, 2008).

Apesar dos benefícios, existem riscos associados ao consumo de moluscos bivalves, pois os mesmos possuem a fisiologia de animais filtradores, podendo incorporar e bioacumular em seus tecidos, diversos patógenos humanos, eventualmente presentes nas águas estuarinas, tais como bactérias e protozoários, assim como contaminantes químicos (NASCIMENTO *et al.*, 2011). Os estuários são ambientes aquáticos de transição, onde os rios deságuam no mar, havendo interação de águas marinhas e continentais (LEAL; FRANCO, 2008). Esse ambiente é favorável a diferentes tipos de contaminação resultantes de ações antrópicas, por meio de lançamento de efluentes domésticos e industriais não tratados, que afetam diretamente a qualidade da água, podendo causar riscos à saúde humana e às espécies presentes no habitat (BARROS; BARBIERI, 2012). A condição do ambiente estuarino não é o único fator determinante para a qualidade higiênico-sanitária do molusco, pois existem outros fatores relacionados com as etapas posteriores à captura, como é o caso da manipulação, transporte e armazenamento (VIEIRA *et al.*, 2006).

### **Sururu (*Mytella guyanensis*)**

A espécie *M. guyanensis* (Figura 1), é um molusco comestível que pertence ao Filo Mollusca, Classe Bivalvia, Ordem Mytiloidea, Família Mytilidae, Gênero *Mytella* (RIOS, 1994), conhecida popularmente como sururu ou marisco-do-mangue, sendo encontrada do México ao Peru, no oceano Pacífico, e da Venezuela ao Brasil, no oceano Atlântico (RIOS, 2009).



**Figura 1.** Espécie em estudo: *Mytella guyanensis*



Fonte: Acervo do projeto de pesquisa: *Mulheres Mariscando e Pescando Sonhos: Inclusão Sócio-produtiva de Famílias Quilombolas*.

Esta espécie é encontrada em bosques de mangue, situados na zona entremarés de ambientes estuarinos, enterrada no substrato lodoso, numa profundidade máxima de 1,0 cm, onde utiliza o bisso para se fixar nas raízes subterrâneas (NISHIDA; LEONEL, 1995; MARQUES, 1998). A sua visualização e captura é facilitada graças à posição perpendicular, que forma uma pequena marca retilínea deixada pela borda das valvas na superfície do substrato (ADORNO, 2003). Apresenta uma concha grande e pode apresentar comprimento máximo de 80 mm. É um molusco dioico, com proporção sexual de 1:1. Em fêmeas, o tecido gonádico apresenta uma coloração que varia de alaranjado a vermelho-pardo e nos machos de branco-leitoso a marrom-claro (BOFFI, 1979).

### **Extratativismo e comercialização**

A RESEX Marinha Baía do Iguape foi criada em 11 de agosto de 2000, abrangendo uma área de 10.082,45 hectares. É uma Unidade de Conservação de uso sustentável, que consubstancia uma territorialidade, dada pelo uso e manejo dos recursos naturais pelas populações tradicionais (BRASIL, 2009). Nela existem 1150 pessoas (UCB, 2020), remanescentes de quilombos que tem têm sua subsistência

e renda baseada na exploração de *M. guyanensis*, proveniente do manguezal (PROST, 2010).

A Baía de Iguape é composta pelos setores Norte, Central e Sul. Os setores Norte e Sul têm canais de maré com largura média de 200 m e profundidades entre 5 e 10 m, estendendo-se por cerca de 11 km e 7 km, respectivamente. O setor Central é raso, com grandes bancos de areia alongados e paralelos a corrente de maré, em exposição na maré baixa de sizígia, correspondendo ao delta fluvial do Rio Paraguaçu. Apresenta extensa área entremarés vegetada (28,1 km<sup>2</sup>) e não vegetada (~16 km<sup>2</sup>). A área vegetada é composta por mangues, com predomínio de bosques de mangue branco *Laguncularia racemosa* (L.) (GENZ, 2006).

Nesta região a mariscagem, atividade praticada nos mangues, é desenvolvida manualmente, com o intuito de capturar moluscos bivalves durante os períodos de marés baixas (FADIGAS; GARCIA; HERNANDÉZ, 2008) e tem sido considerada uma atividade econômica, juntamente com a agricultura familiar e atividades de turismo. Os bivalves beneficiados nessa região atendem a subsistência das famílias das comunidades do entorno da Baía do Iguape e abastecem o mercado de cidades circunvizinhas, como Cachoeira, São Félix, Maragogipe e Santo Amaro (FREITAS *et al.*, 2015).

### **Contaminação microbiana**

Dados epidemiológicos do Ministério da Saúde apontam que ocorreram 6903 surtos de DTA no período de 2009 a 2018 e 2,1% dos surtos estavam relacionados ao consumo de pescado in natura ou processado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Toxinas, bactérias, metais tóxicos e produtos químicos são os principais causadores das DTA (FRANCO; LANGRAF, 2008), sendo que os micro-organismos são os mais importantes agentes etiológicos, tendo a ingestão de água e alimentos contaminados como veículo destes para o organismo humano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Surtos de doenças relacionadas ao consumo de moluscos bivalves foram relatados no mundo, especialmente na América do Norte, Ásia e Europa. De todos os casos de DTA ocorridas nos Estados Unidos da América, o consumo de moluscos foi responsável por 10-19% dos casos, sendo que 9% ocasionaram óbito. Em Nova Iorque, os moluscos bivalves responderam por 64% das DTA. Este fato pode estar associado às condições ambientais e a capacidade de bioacumulação dos moluscos, assim como as condições de processamento (BUTT; ALDRIDGE; SANDERS, 2004).

Na presente pesquisa observou-se que, para as amostras in natura de sururu, a quantificação dos micro-organismos estava no limite permitido pela legislação e que as amostras processadas apresentaram alto índice de contaminação por coliformes totais, *E. coli* e *S. aureus*. Além disso, os pontos de venda do molusco apresentaram inadequações com relação à conduta do manipulador, higienização do ambiente e condições de comercialização, destacando-se que a totalidade das amostras da feira livre estava imprópria para o consumo humano, e que estas amostras apresentaram maior população bacteriana comparada às dos mercados, fato atribuído à temperatura inadequada de comercialização (26 a 37°C), que favoreceu o crescimento dos micro-organismos.

Estudos como o de Freitas et al. (2015) ratificam essas afirmações, ao avaliarem as condições higiênico-sanitárias do processamento de sururu em quatro comunidades da Baía do Iguape (Bahia, Brasil). Os autores concluíram que a maior fonte de contaminação do molusco era proveniente das mãos das marisqueiras, as quais apresentaram elevada população de *S. aureus* que pode indicar falha higiênico-sanitária no processo de desconchamento do molusco.

## **Coliformes**

As bactérias do grupo coliformes totais pertencem à família Enterobacteriaceae, compreendendo bacilos Gram-negativos, e não

formadores de esporos, anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubados à temperatura de 35-37°C, por 48 horas. Este grupo inclui cerca de 20 espécies, incluindo bactérias de origem gastrointestinal de humanos e outros animais de sangue quente. Além de presentes nas fezes, os coliformes encontram-se presentes também em vegetais e no solo. Assim, a presença de coliformes totais nos alimentos pode não indicar contaminação fecal (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Coliformes termotolerantes possuem definições semelhantes aos coliformes totais, porém este grupo corresponde às bactérias que apresentam a capacidade de continuar fermentando a lactose com produção de gás a 44-45,5°C por 24 horas. Existem quatro gêneros, *E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter* que são coliformes oriundos do trato gastrointestinal. *E. coli* representa cerca de 90% deste grupo (SILVA *et al.*, 2017).

*E. coli* é um patógeno de origem alimentar relacionado à contaminação fecal. Esse micro-organismo pode reduzir nitrato a nitrito, de fermentar a glicose com produção de ácido e gás, é oxidase negativa e catalase positiva. Geralmente móvel com flagelos peritríquios, metaboliza uma ampla variedade de substâncias, como carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídeos e ácidos orgânicos (FRANCO; LANDGRAF, 2008). A colonização do trato gastrointestinal humano por *E. coli* ocorre logo após o nascimento e, após a colonização, esta persiste como integrante da microbiota normal do intestino por toda a vida. A detecção de *E. coli* pode indicar possível ocorrência de outros micro-organismos com patogenicidade ainda maior para o ser humano e animais (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). Entretanto, apesar de fazer parte da microbiota fecal humana e/ou animal, algumas cepas de *E. coli* podem causar doenças, devido à obtenção de fatores de virulência por transferência horizontal de material genético (GOMES *et al.*, 2016).

De maneira geral, cepas de *E. coli* patogênicas são classificadas em dois grupos: *E. coli* diarreio gênicas, sendo o intestino o seu sítio de infecção, e *E. coli* patogênicas extraintestinais, que apresentam capacidade de colonização em outros sítios orgânicos, como sangue, sistema nervoso central e trato urinário (JOHNSON; RUSSO, 2005). Trata-se de um micro-organismo que pode provocar grande variedade de doenças devido a diversos fatores de virulência que apresenta. Sua caracterização antigênica baseia-se de acordo com a presença dos antígenos O (somático), encontrado na parede celular, H (flagelares) e K (capsulares) (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). De acordo com as características de virulência, a bactéria *E. coli* é classificada em patotipos, como EPEC (*E. coli* enteropatogênica), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EIEC (*E. coli* enteroinvasora), EHEC (*E. coli* enterohemorrágica), EAEC (*E. coli* enteroagregativa) e UPEC (*E. coli* uropatogênica) (CROXEN; FINLAY, 2010).

### ***Staphylococcus aureus***

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, pertencentes à família Micrococcaceae, sendo pequenas, imóveis e com formato esférico (cocos). São anaeróbicas facultativas, com maior crescimento sob condições aeróbicas, quando então, produzem catalase. São micro-organismos mesófilos que se desenvolvem entre 7 e 47,8°C, idealmente entre 30 e 37° C, enquanto suas enterotoxinas são produzidas entre 10 e 46° C (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Atualmente 32 espécies são incluídas neste gênero de bactéria, sendo que cinco destas são capazes de produzir uma enzima extracelular, a coagulase, e três espécies produzem enterotoxinas. Em surtos de intoxicação estafilocócica, *S. aureus* é a espécie mais prevalente, entretanto *S. intermedius* e *S. hyicus* também podem produzir enterotoxinas (SILVA; GANDRA, 2004).

A intoxicação alimentar estafilocócica é atribuída a ingestão de toxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação

nos alimentos, representando um risco para a saúde pública. Essa toxina, é termoestável, podendo permanecer nos alimentos mesmo após a cocção, favorecendo a ocorrência da intoxicação. Em média, de quatro horas após a ingestão do alimento contaminado, os sintomas da intoxicação estafilocócica começam a aparecer, como vômito, cólica abdominal, diarreia, sudorese e cefaleia. A presença desse micro-organismo em alimentos indica falhas no processamento e condições inadequadas de manipulação (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

### **Padrões microbiológicos**

Segundo o Ministério da Saúde do Brasil a intervenção e a indicação de medidas sanitárias para a prevenção e o controle de surtos de DTA devem se apoiar em legislação específica do Ministério da Saúde, da Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

A ANVISA é o órgão responsável por atuar na fiscalização das condições higiênico-sanitárias, especificando os padrões microbiológicos dos moluscos bivalves para o consumo humano, por meio da Resolução RDC n° 12/2001. Esta resolução estabelece os padrões microbiológicos sanitários para alimentos. O limite máximo permitido para coliformes termotolerantes é de  $5 \times 10$  UFC/g, estafilococos coagulase positiva  $10^3$  UFC/g e ausência de *Salmonella* por grama de moluscos bivalves cozidos, temperados ou não, industrializados resfriados ou congelados. Essa Resolução não determina limite máximo permitido para moluscos bivalves consumidos crus (BRASIL, 2001).

Em 2012 foi criado o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB), o qual atua no Brasil semelhantemente à legislação europeia *The European Union Shellfish Quality Assurance Programme* (EUSQAP), monitorando os micro-organismos contaminantes e estabelecendo critérios para retirada de moluscos destinados ao consumo humano em três níveis: I - liberada

(*E. coli* < 230 NMP/100g), II - liberada sob condição (*E. coli* 230 a 46.000 NMP/100g) e III - suspensa (> 46.000 NMP/100g) (BRASIL, 2012).

Em 2019 foi publicada a Resolução (RDC) 331/2019 (BRASIL, 2019a), que trata dos padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação, a qual entrará em vigor, em 12 meses a partir da data de sua publicação (26/12/2019). Para complementar o disposto na Resolução, também foi publicada a Instrução Normativa (IN) 60/2019 (BRASIL, 2019b), que define as listas de padrões microbiológicos para alimentos prontos para oferta ao consumidor. O limite máximo permitido para *E. coli* (principal membro dos coliformes termotolerantes) é de  $5 \times 10^2$  UFC/g, Estafilococos coagulase positiva  $10^3$  UFC/g e ausência de *Salmonella* por grama de moluscos bivalves crus, cozidos, temperados ou não, industrializados resfriados ou congelados. A novidade é a determinação do limite máximo permitido, no caso de consumo de moluscos bivalves crus resfriados ou congelados (*E. coli* até  $10^2$  UFC/g, estafilococos coagulase positiva  $10^3$  UFC/g e ausência de *Salmonella* por grama de amostra) ou vivos (*E. coli* até 7 e ausência de *Salmonella* por grama de amostra) para consumo (BRASIL, 20019b).

## Poluentes químicos

Além dos micro-organismos patogênicos, o sururu pode apresentar outras fontes de contaminação, como as substâncias inorgânicas. Dentre as substâncias inorgânicas destacam-se os metais tóxicos que são considerados perigosos, devido à sua toxicidade, bioacumulação e persistência no ambiente (BAIRD; CANN, 2011). Por meio do processo de filtração, estes contaminantes podem ser acumulados nos animais aquáticos, sendo transferidos para a cadeia heterotrófica até o ser humano, processo denominado de biomagnificação (PAN; WANG, 2011). Desta forma os bivalves encontram-se mais suscetíveis à contaminação por metais tóxicos do que os peixes, visto que são organismos filtradores (SILVA; BATISTA, 2008; SANTOS *et al.*, 2013).

Dentre os contaminantes inorgânicos, destacam-se o chumbo e o cádmio por apresentarem efeito acumulativo e causarem efeitos deletérios ao ser humano, sendo capazes de interferir em reações enzimáticas, bloquear os grupos funcionais de biomolécula, substituir íons metálicos essenciais e modificar a conformação ativa da biomolécula (JOIRIS; HOLSBECK; OTCHERE, 2000). Por não serem sintetizados e destruídos pelo organismo humano, os metais chumbo e cádmio diferem de outros compostos tóxicos, sendo considerados não essenciais devido à sua alta toxicidade (SILVA; BATISTA, 2008).

Considerando a capacidade dos bivalves de bioacumulação, estes são largamente utilizados em ambientes aquáticos como bioindicadores para o monitoramento da poluição por metais tóxicos em águas costeiras, haja vista que a qualidade dos bivalves está intimamente ligada à qualidade do ambiente onde estes habitam (PAN; WANG, 2011).

Santos *et al.* (2013), quantificando os metais chumbo e cádmio em amostras de peixes (*Centropomus undecimalis* e *Mugil brasiliensis*), molusco bivalve (*M. guyanensis*) e camarão (*Penaeus brasiliensis*) no município de São Francisco do Conde, Bahia, observaram que os níveis de cádmio estavam no limite estabelecido pela legislação na maioria das amostras, entretanto os níveis de chumbo estavam acima do permitido nas amostras de molusco e camarão.

O chumbo, considerado um dos contaminantes mais comuns no ambiente, é encontrado com relativa abundância na crosta terrestre, quase sempre como sulfato de chumbo ( $PbSO_4$ ), porém pode também ser encontrado na forma de carbonato de chumbo ( $PbCO_3$ ) e clorofosfato de chumbo ( $Pb_5Cl(PO_4)_3$ ) (AZEVEDO; CHASIN, 2003). O tempo de meia vida biológico do chumbo no osso humano varia entre 10 a 20 anos, em condições normais, sendo a urina considerada a principal via de excreção do chumbo pelo organismo (76%), seguida das fezes (16%) e, em menor proporção, pelo suor, cabelos e unhas (TSALEV, 1995).



São várias as manifestações causadas pela ingestão de cádmio, como toxicidade crônica, doenças de obstrução pulmonar e enfisema, doenças crônicas do sistema renal, além dos efeitos nefrotóxicos. Verificam-se ainda ocorrência de osteoporose e dor óssea, formação de cálculos no sistema ósseo, dor abdominal, vômitos e diarreia (KLEIN, 2005). Tanto no ambiente quanto nos alimentos, o cádmio encontra-se em níveis baixos e geralmente a alimentação é a principal fonte de contaminação. Os moluscos bivalves são a maior fonte alimentar de cádmio, uma vez que esse metal se liga a uma proteína (metalotionina) e, portanto, acumula-se nestes organismos (SILVA; BATISTA, 2008).

Destaca-se que a concentração desses elementos tóxicos depende de vários fatores ambientais, como salinidade e temperatura da água, conteúdo de matéria orgânica, níveis de oxigênio dissolvido, fluxo da água e o estágio de desenvolvimento do organismo. Além disso, o impacto antropogênico e a forma química do contaminante são fatores de grande relevância (FRANCHI *et al.*, 2011). A ANVISA publicou a resolução n<sup>o</sup> 42/2013 que dispõe sobre limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos, a qual estabelece o limite máximo para o chumbo e cádmio de 1,50 mg/kg e 2,00 mg/kg, respectivamente, em amostras de moluscos bivalves (BRASIL, 2013).

Os dados da nossa pesquisa quanto à análise química demonstraram que todas as amostras de sururu in natura analisadas apresentaram concentrações fora de conformidade, atingindo níveis de até duas vezes para chumbo e de até quatro vezes para cádmio acima do permitido pela legislação, podendo causar efeitos tóxicos para o ser humano. Por conseguinte, as amostras encontravam-se impróprias ao consumo sob o ponto de vista sanitário. Os resultados indicaram mostram a necessidade de implementação de um programa de monitoramento das concentrações de metais tóxicos em organismos dos ecossistemas marinhos da região, para controlar a poluição e evitar risco para a saúde dos consumidores.

## Boas práticas

Apesar dos avanços tecnológicos nas áreas de produção alimentícia, a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos tem sido bastante discutida em virtude da elevada incidência de DTA. A produção de alimentos com qualidade assegurada representa um importante desafio para o setor de serviços de alimentação e esta realidade tem como fator principal os manipuladores de alimentos que, às vezes, desconhecem os hábitos higiênicos adequados (SILVA, 2010; FERREIRA, 2011). Desta forma, as DTA normalmente estão diretamente relacionadas com a carência de controle higiênico-sanitário e pela falta de conhecimento sobre a manipulação segura dos alimentos (BEZERRA; MANCUSO; HEITZ, 2014).

Para a obtenção de um alimento inócuo, que não ofereça risco a saúde do consumidor, é imprescindível que o seu processamento obedeça às Boas Práticas de Manipulação (BPM) (EBONE; CAVALLI; LOPES, 2011). Com isso, fica evidente, que a ações educativas realizadas com os manipuladores são essenciais para assegurar a qualidade da alimentação oferecida (SOUSA *et al.*, 2009). Com o intuito de melhorar as condições higiênico-sanitárias na produção dos alimentos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em 15 de setembro de 2004, publicou a RDC n° 216, que dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação, tendo como objetivo primordial o constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, e a proteção à saúde da população (BRASIL, 2004).

As BPM constituem-se em um conjunto de normas e procedimentos corretos para o manuseio dos alimentos, de modo à assegurar a qualidade sanitária, de forma a garantir a segurança e integridade do consumidor. As normas estabelecidas pelas BPM têm uma abordagem ampla e incluem aspectos referentes às instalações, higiene pessoal e ambiental, além dos procedimentos envolvidos no processamento dos alimentos (NASCIMENTO; BARBOSA, 2007).

Em 2015, o extinto Ministério da Pesca e Aquicultura criou o Programa Nacional de Sanidade de Animais Aquáticos de Cultivo - "Aquicultura com Sanidade", com a finalidade de promover a sustentabilidade dos sistemas de produção de animais aquáticos e a sanidade da matéria-prima obtida a partir dos cultivos nacionais. Dentre as determinações do programa, destaca-se que "o gelo utilizado na refrigeração do pescado deverá ser obtido a partir de água potável ou limpa e estar em quantidade e disposição adequada para manter a temperatura do pescado até sua recepção no local de processamento" e que "após a despesca, é proibida a realização de depuração em moluscos bivalves em local não relacionado ao órgão oficial de inspeção" (BRASIL, 2015).

Diante disso, é necessário realizar inspeções nos estabelecimentos comerciais para verificar as condições higiênico-sanitárias e a aplicação de uma lista de verificação (*check list*), que é uma ferramenta muito utilizada (GUEDES *et al.*, 2012).

O manipulador é considerado um importante veículo de contaminação dos alimentos por micro-organismos (SANTOS; SOUZA, 2013). Várias atitudes favorecem a veiculação, como tossir, espirrar, higienizar as mãos incorretamente, usar adornos e não usar toucas (SILVA JÚNIOR, 2014). As DTA normalmente estão diretamente relacionadas com a carência de controle higiênico-sanitário e pela falta de conhecimento sobre a manipulação segura dos alimentos (BEZERRA; MANCUSO; HEITZ, 2014). Desta forma, ao analisar as amostras de *M. guyanensis* in natura e processadas, os dados da pesquisa apontaram que houve falhas no processamento do molusco e inadequações na comercialização, sendo necessário o monitoramento para o controle da poluição e realização de atividades educativas com os manipuladores para minimizar e combater os riscos de contaminação do molusco, para a promoção da SAN na RESEX estudada.

## Referências

- ADORNO, E. V. **Estudo populacional de *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819) (Bivalvia – Mytilidae) em manguezais do Recôncavo Baiano – Uma análise comparativa**. 2003. 127f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Biomonitoramento) – Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2003.
- AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **Metais: gerenciamento da toxicidade**. São Paulo: Atheneu, 2003. 554p.
- BAIRD, C.; CANN, M. **Química Ambiental**. 4 ed. Porto Alegre: Bookman, 2011. 844p.
- BARROS, D.; BARBIERI, E. Análise da ocorrência de metais: Ni, Zn, Cu, Pb e Cd em ostras (*Crassostrea brasiliana*) e sedimentos coletados no Estuário de Cananéia, SP (Brasil). **O Mundo da Saúde**, v. 36, n. 4, p. 635-642, 2012.
- BEZERRA, A. C. D.; MANCUSO, A. M. C.; HEITZ, S. J. J. Alimento de rua na agenda nacional de segurança alimentar e nutricional: um ensaio para a qualificação sanitária no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 5, p. 1489-1494, 2014. doi.org/10.1590/1413-81232014195.18762013.
- BHUTTA, Z. A. *et al.* Evidence-based interventions for improvement of maternal and child nutrition: what can be done and at what cost? **The Lancet**, v. 382, n. 9890, p. 452-477, aug., 2013. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60996-4
- BOFFI, A. V. **Moluscos brasileiros de interesse médico e econômico**. São Paulo: Fapesp-Hucitec, 1979. 182p.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Instrução Normativa nº 4, de 4 de fevereiro de 2015. Institui o Programa Nacional de Sanidade de Animais Aquáticos de Cultivo - "Aquicultura com Sanidade". **Diário Oficial da União**. Brasília, 4 fev. 2015. Disponível em: [http://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/KujrwOTZC2Mb/content/id/32382246/do1-2015-02-09-instrucao-normativa-n-4-de-4-de-fevereiro-de-2015-32382233](http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/KujrwOTZC2Mb/content/id/32382246/do1-2015-02-09-instrucao-normativa-n-4-de-4-de-fevereiro-de-2015-32382233). Acesso em: 04 jul. 2020.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Interministerial nº 7, de 8 de maio de 2012. Institui o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB), estabelece os procedimentos para a sua execução e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, 8 mai. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 10 jan. 2001. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_12\\_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b). Acesso em: 04 jul. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 216 de 15 de setembro de 2004. Aprova o Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. **Diário Oficial da União**. Brasília, 16 set. 2004. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388704/resolu%25c3%2587%25c3%2583o-dc%2bn%2b216%2bde%2b15%2bde%2bsetembro%2bde%2b2004.pdf/23701496-925d-4d4d-99aa-9d479b316c4b>. Acesso em: 04 jul. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 331, de 23 de dezembro de 2019. Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. **Diário Oficial da União**. Brasília, 23 dez. 2019a. Disponível em: <http://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-331-de-23-de-dezembro-de-2019-235332272>. Acesso em: 04 jul. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019b. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 23 dez. 2019. Disponível em: <http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356>. Acesso em: 04 jul. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 42 de 29 de agosto de 2013. Dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes

Inorgânicos em Alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 30 ago. 2013.

BRASIL. Presidência da República. Secretaria Geral. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. 2017. **Diário Oficial da União**. Brasília, 29 mar. 2017. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2015-2018/2017/decreto/d9013.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/decreto/d9013.htm). Acesso em: 04 jul. 2020.

BRASIL. Presidência da República. Lei nº. 9.985, de 18 de julho de 2000. Institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza e dá outras providências. Regulamenta o art. 225, §1. Incisos I, II, III e VII da Constituição Federal. **Diário Oficial da União**. Brasília, 18 jul. 2000. Disponível em: [https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/prop\\_mostrarintegra;jsessionid=D402CCCC39D2A620FFA0F02D1DBFC0F0.proposicoesWeb1?codteor=558200&filename=LegislacaoCitada+-PL+3324/2008](https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/prop_mostrarintegra;jsessionid=D402CCCC39D2A620FFA0F02D1DBFC0F0.proposicoesWeb1?codteor=558200&filename=LegislacaoCitada+-PL+3324/2008). Acesso em: 14 jul. 2020.

BRASIL. Presidência da República. Lei nº. 11. 346 de 15 de setembro de 2006. Cria o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional — SISAN com vistas em assegurar o direito humano à alimentação adequada e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, 16 set. 2006. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2006/lei/l11346.htm#:~:text=lei%20n%20ba%2011.346&text=lei%20n%20ba%2011.346%2c%20de%2015%20de%20setembro%20de%202006.&text=cria%20o%20sistema%20nacional%20de,adequada%20e%20d%20c%3%a1%20outras%20provid%20aancias](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2006/lei/l11346.htm#:~:text=lei%20n%20ba%2011.346&text=lei%20n%20ba%2011.346%2c%20de%2015%20de%20setembro%20de%202006.&text=cria%20o%20sistema%20nacional%20de,adequada%20e%20d%20c%3%a1%20outras%20provid%20aancias). Acesso em: 14 jul. 2020.

BRASIL. Presidência da República. Lei nº 12.058 de 13 de outubro de 2009. Dispõem sobre as alterações da reserva extrativista marinha Baía do Iguape. **Diário Oficial da União**. Brasília, 13 out. 2009.

BUTT, A. A.; ALDRIDGE, K. E.; SANDERS, C. V. Infections related to the ingestion of seafood Part I: viral and bacterial infections. **Lancet Infectious Diseases**, v. 4, p. 201-212, apr., 2004. doi: 10.1016/S1473-3099(04)00969-7

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature**, v. 8, p. 20-38, dec., 2010.

EBONE, M. V.; CAVALLI, S. B.; LOPES, S. J. Segurança e qualidade higiênico-sanitária em unidades produtoras de refeições comerciais. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 5, p. 725-734, set./out., 2011.

FADIGAS, A. B. M.; GARCIA, L. G.; HERNÁNDEZ, M. I. M. As contribuições das marisqueiras para uma gestão sócio-ambiental em reservas extrativistas. **Revista de Estudos Feministas (UFSC)**, v. 8, p. 1-7, 2008.

FERREIRA, J. M. *et al.* Estudo do equilíbrio e cinética da bioissorção do  $Pb^{2+}$  por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1188-1193, sept./oct., 2007. doi.org/10.1590/S0100-40422007000500026

FERREIRA, M. A. *et al.* Avaliação da adequação às boas práticas em unidades de alimentação e nutrição. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 2, p. 230-235, 2011.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations.. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Roma, FAO, 2012. 209 p.

FRANCHI, M. *et al.* Bioconcentration of Cd and Pb by the River Crab *Trichodactylus fluviatilis* (Crustacea: Decapoda). **Journal of**

**the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 2, p. 230-238, 2011. doi.org/10.1590/S0103-50532011000200007

FRANCO, D. D. G. M.; LANDGRAF. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

FREITAS, F. *et al.* Qualidade sanitária de sururu (*Mytella guyanensis*) beneficiado por comunidade quilombola. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 33, n. 2, p. 9-18, 2015. doi: 10.5380/cep.v33i2.47233

GENZ, F. **Avaliação dos efeitos da Barragem Pedra do Cavalo sobre a circulação estuarina do rio Paraguaçu e Baía de Iguape**. 2006. 266f. Tese (Doutorado em Ciências em Geologia) — Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2006.

GOMES, T. A. T. *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, supl. 1, p. 3-30, dec., 2016. doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015

GUEDES, A. C. V. *et al.* Aplicação das Boas Práticas por manipuladores de alimentos em lanchonetes da Universidade Federal do Tocantins. **Revista Higiene Alimentar**, v. 26, n. 206-207, p. 37-42, 2012.

JOHNSON, R. J.; RUSSO, A. T. Molecular epidemiology of estraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, p. 383-404, oct., 2005. doi: 10.1016/j.ijmm.2005.07.005

JOIRIS, C. R.; HOLSBEEK, L.; OTCHERE, F.A. Mercury in the bivalves *Crassostrea tulipa* and *Perna perna* from Ghana. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 5, p. 457-460, may, 2000. doi.org/10.1016/S0025-



326X(00)00014-X

KLEIN, G. L. Heavy Metals. *In*: CABALLERO, B.; ALLEN, L.; PRENTICE, A. (Eds.). **Encyclopedia of Human Nutrition**. 2. ed. Oxford: Elsevier Academic Press, p. 344-350. 2005.

LEAL, D. A. G, FRANCO, R. M. B. Moluscos bivalves destinados ao consumo humano como vetores de protozoários patogênicos: metodologias de detecção e normas de controle. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 10, n. 4, p. 48-57, oct./dec., 2008.

MARQUES, H. L. A. **Criação comercial de mexilhões**. São Paulo: Nobel, 1998. 111p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica **Manual Integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Brasília: Editora MS, 2010, 158p. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_integrado\\_vigilancia\\_doencas\\_alimentos.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf). Acesso em: 23 jul. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE\_\_\_\_\_. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. 2019. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/maio/17/Apresentacao-Surtos-DTA-Maio-2019.pdf>. Acesso em 03 jul. 2020.

MONTELES, J. S. *et al.* Percepção socioambiental das marisqueiras no município de Raposa, MA. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 4, n. 2, p. 34-45, 2009. doi.org/10.18817/repesca.v4i2.141

NASCIMENTO, G. A.; BARBOSA, J. S. BPF - Boas Práticas de fabricação: uma revisão. **Revista Higiene Alimentar**, v. 21, n. 148,

p. 24-30, 2007.

NASCIMENTO, V. A. *et al.* Qualidade microbiológica de moluscos bivalves - sururu e ostras submetidos a tratamento térmico e estocagem congelada. **Scientia Plena**, v. 7, n. 4, 2011. Disponível em: <https://www.scientiaplenu.org.br/sp/article/viewFile/227/147>. Acesso em 30 set. 2020.

NISHIDA, A. K.; LEONEOL, R. M. V. Occurrence, population dynamics and habitat characterization of *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819) (Mollusca, Bivalvia) in the Paraíba do Norte river estuary. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, v. 43, n.1, p. 41-43, 1995. doi.org/10.1590/S0373-55241995000100004

NISHIDA, A. K.; NORDI, N.; ALVES, R. R. N. Aspectos socioeconômicos dos catadores de moluscos do litoral paraibano, Nordeste do Brasil. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 8, n. 1, p. 207-215, 2008.

NUNES, M. L. *et al.* Produtos da pesca: valor nutricional e importância para a saúde e bem-estar dos consumidores. **Publicações Avulsas do IPIMAR**, n. 18, 2008.

PAN, K.; WANG, W. X. Mercury accumulation in marine bivalves: Influences of biodynamics and feeding niche. **Environmental Pollution**, v. 159, p. 2500-2506, oct., 2011. doi.org/10.1016/j.envpol.2011.06.029

PROST, C. Resex Marinha versus polo naval na Baía do Iguape. **Novos Cadernos NAEA**, v. 13, n. 1, p. 47-70, 2010.

PINSTRUP-ANDERSEN, P. Food Security: definition and measurement. **Food Security**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2009.

RIOS, E. C. **Compedium of brazilian sea shells**. Rio Grande, Porto Alegre, 2009. 668p.

RIOS, E. C. **Seashells of Brazil**. Rio Grande, Porto Alegre, 1994. 492p.

SANDE, D. *et al.* Prospecção de moluscos bivalves no estudo da poluição dos rios Cachoeira e Santana em Ilhéus, Bahia, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary and Research Animal Science**, v. 47, n. 3, p. 190-196, 2010.

SANDERS, B. Environmental Protection Agency. **Stress proteins: potential as multitiered biomarkers**. U.S.E.P.A. Washington, D. C. 1990.

SANTOS, G. L. **Determinação de cádmio e chumbo em tecidos de cetáceos por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite**. 2009. 92f. Dissertação (Mestrado em Química) — Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2009.

SANTOS, T. M. M. *et al.* Avaliação microbiológica e da concentração de vitamina A, ferro e zinco em preparações do molusco sururu (*Mytella falcata*). **Demetra**, v. 9, p. 811-822, 2014. doi.org/10.12957/demetra.2014.9440

SANTOS, L. F. P. *et al.* Assessment of cadmium and lead in commercially important seafood from São Francisco do Conde, Bahia, Brazil. **Food Control**, v. 33, n. 1, p.193-199, sep., 2013. doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.02.024

SANTOS, N. M.; SOUZA, K. M. C. Avaliação microbiológica das mãos de manipuladores de alimentos em escolas públicas de

Pirenópolis - GO. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 4, n. 1, p. 35-40, 2013.

SANTOS, T. M. *et al.* Inspeção visual e avaliações bacteriológicas e físico — química da carne de piramutaba (*Brachyplatistoma vaillanti*) congelada. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1538-1545, dec., 2008. doi.org/10.1590/S0102-09352008000600034

SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação**. 7. ed. São Paulo: Varela, 2014. 693 p.

SILVA, G. P. **Avaliação das boas práticas em unidades produtoras de refeição dos hotéis do município de Caruaru-PE**. 2010. 45f. Monografia (Graduação em Nutrição). Sociedade de Educação do Vale do Ipojuca — SESVALI. Faculdade do Vale do Ipojuca — FAVIP. Caruaru, 2010.

SILVA, H. A.; BATISTA, I. Produção, salubridade e comercialização de moluscos bivalves em Portugal. **Publicações Avulsas do IPIMAR**, n. 20, 2008.

SILVA, N. *et al.* **Manual de métodos de análises microbiológica de alimentos**. 5. ed. São Paulo: Blucher, 2017.

SILVA, W. P.; GANDRA, E. A. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 18, n.122, p.32-40. 2004.

SOUSA, C. L. *et al.* Diagnóstico das condições higiênico-sanitárias e microbiológicas de empresa fornecedora de comidas congeladas *light* na cidade de Belém/PA. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 3, p. 375-381, jul./set., 2009.

TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015. 760p.

TSALEV, D. L. **Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice**. Flórida: CRC Press, 1995.

UCB. Unidades de Conservação no Brasil. **Reserva extrativista marinha da Baía do Iguape**. Disponível em: <https://uc.socioambiental.org/arp/2584>. Acesso em: 03 jul. 2020.

VIEIRA, D. *Met al.* Características microbiológicas de carne de siri beneficiada em Antonina (PR) antes e após a adoção de medidas de boas práticas. **Scientia Agrária**, v. 7, p. 41-48, 2006. Doi: 10.5380/rsa.v7i1.7270



# Infecções por *Vibrio* associado a ostras

*Norma Suely Evangelista-Barreto*

*Elaine Araújo de Carvalho*

*Aline Simões da Rocha Bispo*

*Mariza Alves Ferreira*

Atualmente, a produção total global da aquicultura excede a produção pesqueira mundial em mais de 80 milhões de toneladas, e representa um grupo muito diversificado de plantas aquáticas e espécies animais (FAO, 2018). Diante desse panorama, a produção total de moluscos representou 17,1 milhões de toneladas ou 21,4% do total da aquicultura. Dentre os moluscos bivalves, as ostras representaram o maior grupo de espécies, com aumento da produção global de 4,5 para 5,9 milhões de toneladas entre os anos de 2010 e 2017, bem como, aumento dos valores de importação e exportação de comercialização (TACON, 2020).

O Brasil é o segundo maior produtor de moluscos bivalves da América Latina, com o estado de Santa Catarina responsável por 95% da produção (SUPLICY *et al.*, 2018). No estado da Bahia, o cultivo de ostras tem crescido lentamente ao longo do litoral baiano (SANTOS *et al.*, 2015). O cultivo de organismos no meio aquático promove benefícios à população, como geração de renda local e o aproveitamento de recursos naturais da região, possibilitando a geração de empregos, contribuindo para novos investimentos e minimizando as diferenças sociais (SANTOS; EVANGELISTA-BARRETO; BARRETO, 2017).

Sabe-se que o pescado e produtos da pesca se destacam nutricionalmente, dentre os produtos de origem animal por apresentarem vitaminas lipossolúveis A e D, e minerais como cálcio, fósforo, ferro, cobre e selênio. Além disso, apresentam ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, enquanto as proteínas presentes nestes alimentos contêm todos os aminoácidos essenciais ao ser

humano (ARU *et al.*, 2018). Apesar destas propriedades nutricionais, vários são os riscos encontrados nos moluscos bivalves, como, por exemplo, alguns tipos de metais pesados, toxinas marinhas, poluentes orgânicos e microrganismos patogênicos (FERREIRA *et al.*, 2019).

### **As ostras**

As ostras são moluscos bivalves que possuem o corpo protegido por um exoesqueleto com formato de uma concha de duas valvas, articuladas por uma charneira e mantidas unidas pelos músculos adutores. Para o processo de respiração e alimentação, os moluscos bivalves filtram a água que entra pela cavidade paleal e banha as brânquias, local onde ficam retidos as partículas orgânicas, microrganismos e fitoplâncton (SILVA; COSTA; RODRIGUES, 2008).

As ostras também são considera das organismos economicamente e ecologicamente importantes por acumularem em seus tecidos microrganismos presentes no ambiente, assim como grandes quantidades de substâncias orgânicas e inorgânicas, se revelando bioindicadores ideais para o monitoramento da qualidade da água (SUPLICY, 2018), principalmente quanto aos níveis de contaminantes presentes no local (ARU *et al.*, 2018). Por isso, são comumente utilizadas na detecção de metais pesados em ambientes aquáticos, já que fornecem informações sobre a biodisponibilidade desses elementos e sobre o impacto ambiental (FERREIRA *et al.*, 2019).

Nesse sentido, a depender das condições sanitárias da água de cultivo (SUPLICY, 2018), também é esperado encontrar uma alta concentração de patógenos bacterianos, devido seu papel filtrador, que contribui para a ocorrência de doenças infecciosas de origem alimentar relacionadas ao hábito do consumo de ostras cruas. As bactérias do gênero *Vibrio* são frequentes no ecossistema marinho e estão diretamente associadas a um maior risco de causarem infecções por meio do consumo de ostras, do que qualquer outro tipo de fruto do mar (NDRAHA; WONG; HSIAO, 2020).



Uma forma de garantir a qualidade dos moluscos bivalves é com a técnica de depuração, que permite a eliminação da maior parte das bactérias patogênicas presentes nas ostras, tornando-os adequados para o consumo humano do ponto de vista microbiológico. No entanto, a eficácia desse processo depende principalmente de fatores biológicos, como a atividade das ostras e a natureza dos microrganismos, bem como fatores ambientais, como a temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido, dentre outros (SHEN *et al.*, 2019).

Espécies de moluscos bivalves no litoral brasileiro são cultivadas de forma rudimentar pelas comunidades de pescadores. Dentre elas, existem as espécies associadas as estruturas aéreas da vegetação do mangue, como a *Crassostrea rhizophorae*, conhecida como ostra-do-mangue, uma das espécies mais encontradas no Brasil, e que possui características desejadas, como alta taxa de crescimento, produtividade por área e reprodução contínua, quando comparada a outras espécies (AMARAL; SIMONE, 2014).

Na Bahia, o cultivo de ostras tem sido considerado uma alternativa viável para aumentar a renda de ostreicultores e marisqueiras em comunidades estuarinas, tendo em vista que grande parte dessa população vive em condições precárias de moradia e possui baixo nível de escolaridade (SANTOS; EVANGELISTA-BARRETO; BARRETO, 2017). Apesar disso, a atividade da ostreicultura ainda é afetada pela falta de gestão participativa e de políticas públicas de apoio aos produtores para evitar os riscos à saúde dos consumidores, uma vez que as ostras estão entre os produtos da pesca mais apreciados em todo o mundo devido seu valor nutritivo e sabor, e seus consumidores estão dispostos a pagar um elevado preço por garantia de alta qualidade e segurança (NDRAHA; WONG; HSIAO, 2020).

### **Gastroenterite por moluscos**

As Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA) são manifestações clínicas causadas pela ingestão de alimentos contaminados

por microrganismos patogênicos, toxinas de microrganismos, substâncias químicas, objetos lesivos ou que contenham em sua constituição estruturas naturalmente tóxicas (BRASIL, 2015). Dentre elas, se destacam as doenças relacionadas diretamente ao consumo de pescado, que devem ser consideradas do grupo de alimentos de alto risco, principalmente quando bactérias *Clostridium botulinum* e *Vibrio parahaemolyticus* estão envolvidas (RASZL *et al.*, 2016).

Neste contexto, é possível considerar a classificação do pescado em alto grau de risco, no qual os moluscos e peixes crus estão incluídos, seguido por crustáceos e peixes (frescos ou congelados), servidos logo após o cozimento, e por último, um grupo de mais baixo grau de risco, composto por pescado que tenha sido preservado, ou seja, levemente salgado, marinado, fermentado ou defumado (HUSS; JORGENSEN; VOGEL, 2000).

Como a ingestão de moluscos bivalves pode ocorrer na forma in natura, o seu consumo está frequentemente relacionado a doenças infecciosas de origem alimentar, as quais são ocasionadas por ação direta do agente viral infeccioso, bacteriano ou parasitário, ou pela produção de toxinas produzidas por bactérias e por produtos químicos ou radiativos (ARU *et al.*, 2018).

Após a ingestão do alimento contaminado, a capacidade da bactéria infectar o organismo e causar doença, depende de determinantes de virulência, como a produção de toxinas bacterianas. Dentre as toxinas produzidas pelas bactérias, estão as exotoxinas (proteínas bacterianas tóxicas) que podem promover ações diretas no tecido intestinal, perda de líquidos e mudanças no fluxo de íons no intestino causando diarreia; as citotoxinas, toxinas que causam danos as células intestinais e as endotoxinas, estruturas lipopolissacarídicas (LPS) termoestáveis associadas às células que promovem atividade citotóxica (FORSYTHE, 2013).

Dados sobre a incidência de surtos alimentares no Brasil mostram que em 2018 foram relatados 503 surtos (SINAN, 2019), e a

proporção de DVA derivadas do consumo mundial de frutos do mar crus e malcozidos têm sido consideráveis. Muitos são os microrganismos capazes de causar doenças veiculadas pelo consumo de frutos do mar, principalmente decorrentes da contaminação de origem fecal, no entanto, as bactérias patogênicas do gênero *Vibrio* se destacam em surtos e infecções (MARTÍNEZ-URTAZA *et al.*, 2013). Para garantir a segurança no consumo dos frutos do mar, a Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos sugeriu um limite máximo de 4 log UFC.g<sup>-1</sup> de *V. parahaemolyticus* em frutos do mar vivos e crus (ICMSE, 2011).

No Brasil alguns surtos já foram registrados, decorrentes do consumo de alimentos contaminados com *Vibrio* (BRASIL, 2014). Segundo Raszl *et al.* (2016) a importância de um sistema de vigilância adequado se faz necessário, para que sejam confiáveis os dados gerados sobre a relação dos surtos com a ingestão de alimentos, como também garantir o tratamento correto a ser realizado.

De acordo com o Centro Norte Americano para Controle e Prevenção de Doenças (CDC), em 2014 foram relatadas 1.252 infecções por *Vibrio* (excluindo *V. cholerae* O1 e O139 toxigênico). Desse total, 326 (27%) pacientes foram hospitalizados e 34 (4%) vieram a óbito. A espécie mais isolada foi *V. parahaemolyticus*, em 605 (48%) dos pacientes, seguido de *V. alginolyticus* em 239 (19%) e *V. vulnificus* em 124 (10%). A maioria das pessoas com infecção por *Vibrio* veiculada por alimentos apresentam diarreia aquosa, enquanto outras infecções apresentam sintomas como cólicas, náuseas, vômitos, febre e calafrios (CDC, 2014).

Estudos recentes mostraram que o impacto das mudanças climáticas também é um fator importante e deve ser considerado, pois tais mudanças podem, não apenas afetar a biodiversidade, mas também a qualidade e a segurança dos alimentos, podendo representar uma ameaça significativa à saúde humana (NDRAHA; HSIAO, 2019). Nesse sentido, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) destacou recentemente, que o aumento da temperatura da água

do mar poderia ser um potencial problema emergente de segurança alimentar, pois pode afetar o crescimento de patógenos de origem alimentar, especialmente para os vibrios (EFSA, 2017).

### O gênero *Vibrio*

O gênero *Vibrio* contém 164 espécies (PARTE, 2018) e faz parte da família Vibrionaceae. As espécies do gênero *Vibrio* são classificadas como bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas que se apresentam em forma de bacilos ou com uma única curvatura rígida (AUSTIN, 2010). Naturalmente, são encontradas em estuários e ambientes marinhos, com distribuição e dinâmica de suas populações influenciadas por gradientes ambientais, como a temperatura, salinidade, disponibilidade de nutrientes e fatores biológicos (NDRAHA; HSIAO 2019).

As bactérias do gênero *Vibrio* desempenham papéis importantes em ambientes aquáticos, pois são capazes de absorver a matéria orgânica dissolvida, produzindo compostos com ação inibitória para outras bactérias, participando da ciclagem da matéria orgânica (THOMPSON; LIDA; SWINGS, 2004). Apesar de todos esses benefícios inerentes ao gênero, o estudo e a descrição da biodiversidade de vibrios no ambiente é fundamental para o controle da taxa de sobrevivência e o crescimento do patógeno (NDRAHA; WONG; HSIAO, 2020).

Dentre as espécies de *Vibrio* patogênicas ao homem estão *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. fulmissii*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* (THOMPSON; LIDA; SWINGS, 2004). As espécies de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* são patógenos humanos oportunistas, responsáveis por causarem as mais graves infecções relacionadas ao consumo de produtos de origem marinha mal cozidos, exposição de feridas ao ambiente marinho ou estuarino e pela ingestão de água contaminada. Outras espécies como *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. fluvialis*, *V. furnissi*, *V. metschnikovii* e *V. mimicus* são mais reconhecidas como agentes patogênicos em animais

marinhos, apesar de também já terem sido isoladas em seres humanos (METTEUCCI *et al.*, 2015).

As infecções causadas por bactérias do gênero *Vibrio* não são consideradas exclusivas aos seres humanos, pois já foram relatadas em várias espécies de pescado brasileiro, principalmente em moluscos bivalves, em várias regiões do Brasil. Com isso, a presença de *Vibrio* no ambiente marinho e estuarino é preocupante e como estes microrganismos possuem vida livre, há um interesse na compreensão da prevalência e dinâmica das populações dessas bactérias (THOMPSON; LIDA; SWINGS, 2004; ARU *et al.*, 2018). Uma recomendação para minimizar o crescimento da bactéria é controlar a temperatura do marisco durante a colheita, o processamento pós-colheita, bem como todo o manejo da cadeia de distribuição que deve ser essencial para controlar o crescimento de *Vibrio* e garantir a qualidade ou segurança alimentar para os consumidores (LOVE *et al.*, 2020).

Mundialmente, a espécie de *V. parahaemolyticus* é umas das mais importantes bactérias veiculadas por alimentos que se destaca pelo consumo de ostras cruas, por se encontrar distribuída em regiões costeiras e de clima temperado e tropical (NDRAHA; WONG; HSIAO, 2020). Esta espécie pode ser frequentemente encontrada em diferentes organismos aquáticos como moluscos, peixes, corais, esponjas, camarões e zooplânctons (MARTINEZ-URTAZA *et al.*, 2010). Para o seu desenvolvimento a temperatura considerada ótima é de 37 °C e a concentração de cloreto de sódio de 3% (GERMANO; GERMANO, 2008).

*Vibrio parahaemolyticus* produz enterotoxinas capazes de inflamar o revestimento do intestino delgado, levando ao surgimento de diarreia aquosa, cólicas, náuseas, vômitos, cefaleia e febre (GARCIA-LÁZARO; PULIDO; TORRES-CISNERO, 2010). Vale ressaltar que nem todas as cepas são patogênicas e sua patogenicidade se relaciona com a presença da enzima TDH (hemolisina termoestável direta) codificada pelo gene *tdh* e a enzima TRH (hemolisina termoestável relacionada) codificada pelo gene *trh* (NDRAHA; HSIAO, 2019). Estima-se que a dose

infecçiosa de *V. parahaemolyticus* seja de  $10^7$  a  $10^8$  células, embora, alguns estudos já tenham detectado doses significativamente menores ( $10^3$ - $10^4$  células) (MARTINEZ-URTAZA *et al.*, 2010).

Segundo Raszl *et al.* (2016) *V. parahaemolyticus* está relacionado ao maior número de casos de doenças veiculados pela água, causando gastroenterites, enquanto *V. vulnificus* está diretamente associado aos casos mais graves que levam a morte. A bactéria *V. vulnificus* é encontrada em zonas costeiras quentes, colonizando a fauna marinha, principalmente durante o verão. A veiculação de *V. vulnificus* ocorre pelo consumo de mariscos contaminados ou pela exposição de feridas cutâneas à água do mar, e a infecção por esse microrganismo ocorre por meio de septicemia primária e infecções de feridas, manifestações clínicas que podem se tornar letais até mesmo para uma pessoa saudável (TSAO *et al.*, 2013; RASZL *et al.*, 2016). A contaminação por esta bactéria também pode causar um quadro particular de toxinfecção alimentar que é chamado de septicemia fulminante, ocorrendo primordialmente em indivíduos com disfunção hepática (GERMANO; GERMANO, 2008).

Em relação aos possíveis fatores de virulência da espécie, podem ser citados a produção da citolisina, protease extracelular, cápsula polissacarídica, resistência a fagocitose e a capacidade de adquirir ferro a partir da transferrina, sendo que a manifestação da doença envolve um grande número de atributos de virulência (WHO, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2016).

Outra espécie que se destaca em relação a problemas de infecções alimentares é o *V. cholerae* que está presente na água, associado a plantas, zooplâncton, fitoplâncton e a organismos marinhos, como peixes, ostras e mexilhões (BRASIL, 2010). Esse microrganismo se desenvolve bem a temperatura interna do corpo humano (37 °C), e em concentração de cloreto de sódio de 0,5% (GERMANO; GERMANO, 2008). Além de fazer parte da microbiota marinha e fluvial, pode se apresentar de forma livre ou associado, e algumas dessas associações

permitem que a bactéria persista no ambiente durante períodos interepidêmicos, além de possibilitar a ocorrência de transmissão da cólera pelo consumo de peixes, mariscos e crustáceos crus ou malcozidos (CECCARELLI *et al.*, 2015).

A transmissão da cólera se dá predominantemente por meio da contaminação por água ou alimentos que foram contaminados com material de origem fecal. Com isso, a deficiência do sistema de abastecimento de água tratada, a falta de saneamento básico, o destino inadequado dos dejetos, a alta densidade populacional, a falta de infraestrutura habitacional e a higiene inadequada favorecem a instalação e a rápida disseminação do *V. cholerae* (WHO, 2015).

Diante do exposto, muitos são os fatores que podem favorecer o crescimento de espécies patogênicas, como variações climáticas, métodos de cultivo, manuseio, processamento, controle da cadeia do frio, dentre outros. Por isso, há uma forte tendência em melhorar a fiscalização na cadeia de produção de ostras, para assegurar a proteção da saúde do consumidor, uma vez que estas podem abrigar altas concentrações de vibrios.

## **Resistência antimicrobiana**

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) “os antimicrobianos correspondem a uma classe de fármacos que é consumida frequentemente em hospitais e na comunidade. Entretanto, são os únicos agentes farmacológicos que não afetam somente os pacientes que os utilizam, mas também interferem significativamente no ambiente hospitalar por alteração da ecologia microbiana”. A utilização adequada e o conhecimento dos princípios gerais do uso desses fármacos são fundamentais para a administração terapêutica correta e eficaz (ANVISA, 2007).

O uso profilático de antimicrobianos na aquicultura é comum, principalmente em países onde não há regulamentação para o uso de drogas em ambientes aquáticos. Muitos produtores ignoram que o

uso indiscriminado de antibióticos proporciona, dentre os principais riscos, a seleção de bactérias resistentes no ambiente aquático, à alteração da microbiota do ambiente de cultivo e a transferência de resistência para bactérias potencialmente patogênicas aos seres humanos, desencadeando risco da presença de resíduos nos alimentos destinados ao consumo humano (HOLMSTROM *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2018).

No ambiente aquático, a pressão seletiva mediante a contaminação do ambiente pelos seres humanos, por meio de dejetos contendo resíduos de antimicrobianos, oriundos do descarte de esgotos domésticos ou pela aquicultura, quando realizada sem práticas adequadas de produção, pode contribuir para o aumento da resistência antimicrobiana (BARCELOS *et al.*, 2016). O aumento de bactérias resistentes no mundo e o avanço de estirpes resistentes a múltiplas drogas favorece a morbidade, os custos inerentes as prestações com os cuidados à saúde, assim como o índice de mortalidade por infecções (DIAS; MONTEIRO, 2010).

As bactérias desenvolvem resistência aos antimicrobianos utilizando mecanismos como bombas de efluxo, inativação enzimática, redução da penetração dos antibióticos, modificação do local alvo, formação de biofilmes e a perda de porinas na membrana plasmática. Além disso, uma rede integrada de elementos de resistência nas bactérias promove a proteção contra os antimicrobianos (LIU *et al.*, 2020). Nas bactérias Gram negativas, a presença do envelope celular, composta por uma bicamada de lipopolissacarídeo-fosfolipídica desempenha papel de barreira física para a entrada de moléculas no interior da célula bacteriana. Já nas bactérias Gram positivas, a ausência da membrana externa contribui para a suscetibilidade a muitos antimicrobianos (CAUMO *et al.*, 2010).

Antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, estreptomicinas e aminoglicosídeos são comumente utilizados no combate a bactérias. No entanto, muitas moléculas não são metabolizadas no organismo e



seus resíduos se constituem como fontes potenciais de contaminação no ambiente terrestre e aquático por meio da descarga de esgotos urbanos, industriais e hospitalares (FUENTEFRIA *et al.*, 2008; ELBASHIR *et al.*, 2018). Estes resíduos precipitam e contaminam o ambiente aquático, causando efeitos prejudiciais sobre a microbiota e as espécies animais (ELBASHIR *et al.*, 2018).

Um dos mais importantes mecanismos de resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos é a produção de enzimas. A enzima  $\beta$ -lactamase é capaz de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico de antimicrobianos como penicilinas e cefalosporinas, inativando-os (STURENBURG; MARK, 2003). A habilidade das  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) em hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de todas as gerações e monobactâmicos, oferece um desafio substancial à terapia antimicrobiana por minimizar as opções de tratamento das doenças (LAGO; FUENTEFRIA; FIENEFRIA, 2010). A produção dessa enzima por uma bactéria explica o porquê da sua sobrevivência em um foco infeccioso, apesar do uso de um antimicrobiano  $\beta$ -lactâmico. Além disso, a presença de bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases, pode favorecer a sobrevivência de outros microrganismos sensíveis ao antimicrobiano, em um processo infeccioso (KUMARI; KUMAR; SOMASUNDARAM, 2015).

Enzimas TEM e SHV conferem resistência a todas as oximino-cefalosporinas, inativando as penicilinas, monobactâmicos e cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta geração. Frequentemente, essas enzimas são codificadas por plasmídeos, elementos móveis que transportam múltiplos determinantes de resistência aos antimicrobianos. A enzima CTX-M também apresenta atividade hidrolítica contra oximino-cefalosporinas, hidrolisando preferencialmente, a cefotaxima (KIRATISIN *et al.*, 2007; WANGKHEIMAYUM *et al.*, 2020). O gene *bla*CTX-M responsável por codificar a enzima CTX-M, já foi encontrada em *V. cholerae* (BONNET, 2004). *Vibrio alginolyticus* também foi avaliado quanto a prevalência

de genes de resistência e os resultados mostraram a presença dos genes *bla*TEM e *bla*CTX-M, sugerindo que esta espécie pode atuar como reservatório para genes de resistência no ambiente aquático (KUMARI; KUMAR; SOMASUNDARAM, 2015).

Perfis de múltipla resistência exibidos pelas bactérias causam preocupação, pois reduzem ou tornam ineficazes o tratamento de infecções utilizando antimicrobianos. Elmahdi, Da Silva e Parveen (2016), relataram que *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* apresentaram perfis de resistência a ampicilina, penicilina, tetraciclina e amicacina em diversos países, destacando que no Brasil, este perfil é de múltipla resistência. De acordo com os autores, este fato é preocupante, visto que, a tetraciclina tem sido recomendada em infecções graves causadas por vibrios.

Yu *et al.* (2016) relataram o risco potencial no consumo de frutos do mar em Xangai para os consumidores, devido o perfil de resistência a vários antimicrobianos como ampicilina, cefazolina, cefalotina, amoxicilina/ácido clavulânico, piperacilina e amicacina observado em cepas de *V. parahaemolyticus*. Cardoso *et al.* (2018), também, relataram resistência antimicrobiana em *V. parahaemolyticus* isolados em amostras de ostras em dois estuários do Baixo Sul, Bahia, para os antimicrobianos como amicacina, cefalotina, ampicilina, aztreonam e imipenem, enquanto Silva *et al.* (2018) relataram a resistência de *V. parahaemolyticus* aos antimicrobianos ampicilina, cefalotina, cloranfenicol e imipenem em moluscos bivalves coletados na região de São Francisco do Conde, Bahia.

A ocorrência da resistência antimicrobiana por *Vibrio* em ostras exige esforços que vão desde a necessidade de uma política direcionada ao uso adequado de antimicrobianos na aquicultura até a adoção de práticas de manuseio e processamento (SILVA *et al.*, 2018). As etapas envolvidas no manuseio e processamento de ostras quando realizadas de maneira incorreta, podem permitir que pequenas concentrações de *Vibrio* encontrem condições favoráveis de se multiplicarem (NDRAHA;

WONG; HSIAO, 2020). Uma alternativa para minimizar os efeitos contaminantes é a utilização de antimicrobianos naturais com o objetivo de eliminar ou reduzir a carga microbiana, e alcançarem concentrações aceitáveis do patógeno sem causar efeitos adversos (SHEN; SU, 2017; NDRAHA; WONG; HSIAO, 2020).

A utilização de antimicrobianos naturais pode ser uma alternativa para minimizar os problemas causados pela elevada resistência antimicrobiana. Estudos demonstram a eficácia dos métodos de imersão das ostras desconchadas, utilizando extrato de chá verde a 10%. Além disso, apesar dessa estratégia se concentrar em controlar o desenvolvimento de *Vibrio* na cadeia de suprimentos em processos de pós-colheita, armazenamento e distribuição, mais estudos podem determinar concentrações eficazes de antimicrobianos naturais no ambiente de cultivo (NDRAHA; WONG; HSIAO, 2020). Saeed *et al.* (2019) relataram a eficácia de antimicrobianos naturais de origem animal na inibição de *Vibrio*, como a pleurocidina e a quitosana. A pleurocidina é um peptídeo antimicrobiano com potencial uso em aplicações alimentares, devido à sua estabilidade ao calor e a sua tolerância à salinidade. Já a quitosana é um polissacarídeo encontrado principalmente em exoesqueletos de crustáceos marinhos, obtido a partir da desacetilação parcial da quitina e que apresenta propriedades que lhe permitem a sua aplicação em alimentos, devido à ausência de toxicidade, biodegradabilidade e a baixa alergenicidade.

Shen e Su (2017) ao estudarem a aplicação do extrato de semente de uva na depuração de ostras do Pacífico (*C. gigas*) para *V. parahaemolyticus*, desenvolveram um processo de depuração a 12,5 °C, usando água do mar artificial contendo 1,5% de extrato de semente de uva (conteúdo fenólico total de 3,1 mg/mL como equivalente de ácido gálico) para diminuir o tempo de depuração de 5 dias para 2 dias, com redução significativa de *V. parahaemolyticus*.

Liu *et al.* (2020) ao avaliarem o efeito do citral (principal ingrediente do óleo essencial do capim-limão) no crescimento

e na virulência de *V. alginolyticus*, relataram que este composto apresentou atividade antimicrobiana e anti-virulência, alterando a permeabilidade da membrana, reduzindo a motilidade, atenuando a virulência e inibindo a transcrição gênica. Segundo os autores, o uso do citral é recomendado tanto no tratamento quanto na prevenção de doenças em peixes causadas por *V. alginolyticus*, como uma estratégia para reduzir o uso de antimicrobianos convencionais na aquicultura.

Com isso, a administração de antimicrobianos quer seja no tratamento animal ou humano, envolve a implantação ordenada de intervenções baseadas em evidências, para otimizar o uso dessas drogas e retardar o surgimento da resistência a estes fármacos. Estudar a resistência microbiana no ambiente aquático contribui para elucidar as implicações da ação antrópica, os fatores que afetam o desenvolvimento da múltipla resistência e o nível de infecção e carga microbiana decorrentes do processo de resistência.

### **Detecção de *Vibrio***

A virulência ou a patogenicidade de bactérias do gênero *Vibrio* estão relacionadas com a capacidade de colonização de locais específicos, assim como a formação de substâncias como toxinas, enzimas ou outras moléculas que são capazes de causar danos aos hospedeiros (REDONDO *et al.*, 2006). A identificação do fator de virulência produzido pela bactéria contribui para a compreensão de um dos mecanismos responsáveis pela manifestação da doença, além de fornecer informações importantes sobre a presença do microrganismo de interesse (GUARDIOLA-AVILA *et al.*, 2015).

A patogenicidade das cepas de *V. parahaemolyticus* está associada com a produção de hemolisinas termoestável direta (TDH) e a hemolisina termoestável relacionada (TRH), que são codificadas pelos genes *tdh* e *trh*, respectivamente (SILVA *et al.*, 2018). Enquanto no *V. cholerae*, a produção da toxina pili co-reguladora (TCP) e toxina colérica (CTX) possibilita ao patógeno colonizar o intestino delgado do

hospedeiro, causando diarreia aquosa (JUNG; HAWWER; NG, 2015). Já *V. vulnificus* apresenta virulência associada à produção de hemolisina, sistema de captação de ferro, sendo a cápsula polissacarídica considerada um dos fatores mais importantes (BISHARAT *et al.*, 2013). Segundo Zhang *et al.* (2018) *V. parahaemolyticus* ToxR é altamente semelhante ao *V. cholerae* ToxR, sendo demonstrado que o ToxR está envolvido na regulação da expressão dos genes TDH, T3SS1 e T3SS2 em *V. parahaemolyticus*. No entanto, a importância e as contribuições da TDH e os dois sistemas T3SSs na patogenicidade de *V. parahaemolyticus* ainda não é bem compreendida.

Em geral, as técnicas utilizadas para verificar a presença de espécies de *Vibrio* em ostras contam com métodos baseados na contagem em placas com meio de cultura e técnicas moleculares. Avaliações de contagem de células em placas e testes fenotípicos utilizando chaves de identificação são necessárias para a triagem preliminar e requer amostras de uma dúzia de indivíduos previamente homogeneizados (NOGUEROLA; BLANCH, 2008; KLEIN; LOVELL, 2017). O avanço tecnológico nas últimas décadas melhorou, consideravelmente, tornando a detecção e a identificação das cepas mais precisas e confiáveis, por apresentar alta sensibilidade e elevada especificidade alavancando diversas pesquisas que permite aprofundar os conhecimentos sobre os mecanismos de ação (NDRAHA; WONG; HSIAO, 2020).

Técnicas utilizadas na biologia molecular possibilitam a comparação das sequências de nucleotídeos do DNA e a utilização desses dados nos estudos de identificação de espécies (SILVA; KAVALCO; PAZZA, 2012). A reação em cadeia da polimerase (PCR) utiliza os ciclos repetidos de oligonucleotídeos de DNA para a replicação de sequências definidas, formando base para amplificação e detecção de sequências específicas de nucleotídeos (GOUVÊA *et al.*, 2012). O desenvolvimento dessa técnica permite o aumento considerável da capacidade de quantificar bactérias patogênicas que estejam presentes na água

e em alimentos (POLOMINO-CAMARGO; GONZÁLVIZ-MUÑOZ, 2014). O PCR usando *primers* específicos é um dos métodos moleculares mais populares que permite a detecção rápida, exata e confiável de *V. parahaemolyticus* em amostras de frutos do mar (NDRAHA; WONG; HSIAO, 2020). O gene *tl* além de ser um marcador específico para a identificação de *V. parahaemolyticus*, codifica a hemolisina termolábil (TLH). Apesar da contribuição da hemolisina na patogenicidade da espécie ainda ser desconhecida, a sua expressão é regulada positivamente em condições que imitam o intestino humano (KLEIN *et al.*, 2014).

Os genes de resistência na maioria das vezes fazem parte do DNA de plasmídeos que podem ser transferidos entre bactérias. Alguns desses genes compõem transposons, unidades de DNA que apresentam a habilidade de se mover entre cromossomos e plasmídeos transmissíveis. A transposição conjugada leva ao surgimento da resistência a múltiplas drogas em diversos patógenos bacterianos, mas os mecanismos são pouco caracterizados (RUBIO-COSIALS *et al.*, 2018).

Klein e Lovell (2017) avaliaram o perfil de virulência de *V. parahaemolyticus* em ostras, utilizando testes bioquímicos presuntivos e confirmatórios, seguido de testes para os genes relacionados com a virulência (*tdh* e *trh*), usando protocolos e iniciadores de reação em cadeia da polimeras e aprimorados, constatando a presença desses genes nas amostras ambientais. Yu *et al.* (2016) ao investigarem a prevalência e suscetibilidade antimicrobiana de *V. parahaemolyticus* isolados em frutos do mar, inclusive ostras, após identificação bioquímica e ensaios de PCR realizaram rastreamento para as hemolisinas termoestável direta e termoestável relacionada, confirmando em 2,1% dos isolados o gene de virulência *tdh*.

Cardoso *et al.* (2018) ao quantificarem *Vibrio* spp. em amostras de ostras, identificaram a presença de *V. parahaemolyticus* usando o gene *tl*, marcador espécie-específico, além de cepas de *V. parahaemolyticus* contendo o gene *bla*TEM, responsável pela produção de enzimas

$\beta$ -lactamases na resistência antimicrobiana de  $\beta$ -lactâmicos. Silva *et al.* (2018) ao investigarem o perfil de suscetibilidade e fatores de virulência de *V. parahaemolyticus* isolados de água e moluscos bivalves, incluindo ostras; realizaram identificação fenotípica e caracterização genotípica para a detecção dos genes de virulência *tdh* e *trh*. Apesar dos autores não observarem a presença dos genes *tdh* e *trh*, alertam que todas as cepas apresentaram positividade para, ao menos, um fator de virulência testado no perfil enzimático. Essa condição pode causar danos ao sistema de defesa do hospedeiro, favorecendo o desenvolvimento de processos infecciosos.

Silva *et al.* (2016) ao estudarem o potencial de patogenicidade de isolados de *V. cholerae* em amostras de água e moluscos bivalves isolados na região de São Francisco do Conde, Bahia usando os genes de virulência *ctxAB*, *tcp*, *rfbO1* e *zot*, relataram a ausência dos genes nas amostras analisadas.

Kang *et al.* (2017) ao monitorarem áreas de cultivo de ostras na Coreia, relataram que 70% dos isolados de *V. parahaemolyticus* apresentaram o gene *toxR*, e que desse total, 9,1% apresentavam o gene *trh* e nenhuma cepa portava o gene *tdh*. Ainda segundo os autores a ocorrência do elevado percentual de cepas multirresistentes encontradas no meio ambiente pode ser um indicativo do uso excessivo de antimicrobianos nos campos de agricultura e aquicultura na região.

Assim, o monitoramento higiênico das ostras, o acompanhamento da utilização de antimicrobianos e o desenvolvimento de novas estratégias no controle de antimicrobianos na aquicultura são fundamentais para evitar infecções ocasionadas por várias espécies de *Vibrio*.

## Referências

AMARAL, V. S.; SIMONE, L. R. L. Revision of genus *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) of Brazil. **Journal of the Marine Biological Association**

**of the United Kingdom**, v. 94, n. 4, p. 811-836, jun., 2014. doi: 10.1017/S0025315414000058

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2007). **Antimicrobianos** – Bases teóricas e uso clínico. Disponível em:

[http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/conceitos.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm). Acesso em: 16 jul. 2020.

ARU, V. *et al.* The foodome of bivalve molluscs: From hedonic eating to healthy diet. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 69, p. 13-19, jun., 2018. doi.org/10.1016/j.jfca.2018.01.018

AUSTIN, B. *Vibrios* as causal agents of zoonoses. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 310-317, jan., 2010. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.015

BARCELOS, D. H. F. *et al.* Pesquisa de enterobactérias resistentes a antimicrobianos isoladas em poços tubulares na região serrana do Espírito Santo (Brasil). **Águas Subterrâneas**, v. 30, n. 1, p. 53-61, 2016. doi.org/10.14295/ras.v30i1.28583

BISHARAT, N. *et al.* Transcriptome profiling analysis of *Vibrio vulnificus* during human infection. **Microbiology Society**, v. 159, n. 9, p. 1878-1887, sep., 2013. doi: 10.1099/mic.0.067900-0

ONNET, R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 1-14, jan., 2004. doi: 10.1128/AAC.48.1.1-14.2004

BRASIL. Secretária de Vigilância Sanitária. **Doença transmitida por alimento**. 2015. Disponível em: <http://www.vigilanciasanitaria.sc.gov.br/index.php/inspecao-de-produtos-e-servicos-de-saude/alimentos/91-area-de-atuacao/inspecao-de-produtos-e-servicos-de-saude/alimentos/415-doenca-transmitida-por-alimento-dta>. Acesso em: 10 jul. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.



**Manual integrado de vigilância epidemiológica da cólera.** 2010. Disponível em: [http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_integrado\\_vigilancia\\_colera2ed.pdf](http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_colera2ed.pdf). Acesso em: 08 jul. 2020.

BRASIL. Centro de Vigilância Epidemiológica. **Manual de doenças transmitidas por alimentos.** 2014. Disponível em: [ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc\\_tec/hidrica/doc/18Vcholerae\\_rev2014.pdf](ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/doc/18Vcholerae_rev2014.pdf). Acesso em: 08 jul. 2020.

CARDOSO, V. L. *et al.* Genes of virulence and antimicrobial resistance in *Vibrio parahaemolyticus* prevalent in areas of ostreiculture. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 44, n. 3, p. 364-374, oct., 2018. doi: [org/10.20950/1678-2305.2018.364](https://doi.org/10.20950/1678-2305.2018.364).

CAUMO, K. *et al.* Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Revista Liberato**, v. 11, n. 16, p. 89-188, jul./dez., 2010.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Summary of human vibrio cases reported to CDC, 2014.** Disponível em <https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/covis-annual-summary-2014-508c.pdf>. Acesso em: 7 jul. 2020.

CECCARELLI, D. *et al.* Non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae* carrying multiple virulence factors and *V. cholerae* O1 in the Chesapeake Bay, Maryland. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 6, p. 1909-1918, mar., 2015. doi: [10.1128/AEM.03540-14](https://doi.org/10.1128/AEM.03540-14)

DIAS, M.; MONTEIRO, M. S. Antibióticos e resistência bacteriana, velhas questões, novos desafios. **Cadernos Otorrinolaringologia**, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2010.

EFSA. European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. **EFSA Journal**, v. 15, n. 12: 5077, p.228, 2017. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5077>. Acesso em: 12 jul. 2020.

ELBASHIR, S. *et al.* Seafood pathogens and information on antimicrobial resistance: A review. **Food Microbiology**, v. 70, p. 85-93,

apr., 2018. doi.org/10.1016/j.fm.2017.09.011

ELMAHDI, S.; DA SILVA, L. V.; PARVEEN, S. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: A review. **Food Microbiology**, v. 57, p. 128-134, aug., 2016. doi: 10.1016/j.fm.2016.02.008

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The state of world fisheries and aquaculture**. Meeting the sustainable development goals. Roma. 2018.

FERREIRA, C. P. *et al.* Metal bioaccumulation, oxidative stress and antioxidant responses in oysters *Crassostrea gasar* transplanted to an estuary in southern Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 685, p. 332-344, oct., 2019. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.384

FORSYTHE, S. J. Aspectos básicos. *In: Microbiologia da Segurança dos Alimentos*. São Paulo: ArtMed, Cap. 2, p. 90. 2013.

FUENTEFRIA, D. B. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 470-473, 2008. doi.org/10.1590/S0037-86822008000500007.

GARCIA-LÁZARO, M.; PULIDO, M. C. A.; TORRE-CISNEROS, R. J. Cólera y otras infecciones del género *Vibrio*. **Medicine**, v. 10, n. 52, p. 3486-96, 2010. doi: 10.1016/S0304-5412(10)70068-8

GERMANO, P. M. L; GERMANO, M. I. S. **Agentes bacterianos de toxinfecções**. Barueri: Manole, cap. 12, 2008. 338p.

GOUVÊA, R. *et al.* Isolamento bacteriológico e PCR na detecção de *Salmonella* spp. em peito de frango de estabelecimento varejista. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 1129-1137, 2012.

GUARDIOLA-AVILA, I. *et al.* Factores de virulência de *Vibrio mimicus*. **Revista de Ciências Biológicas e Saúde**, v. 17, n. 2, p. 38-49, 2015. doi: 10.18633/bt.v17i2.178

HOLMSTROM K. *et al.* Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. **International Journal Food Science and Technology**, v. 38, p. 255-266, mar., 2003. doi.org/10.1046/j.1365-2621.2003.00671.x

HUSS, H. H.; JORGENSEN, L.V.; VOGEL, B. F. Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 267-274, 2000. doi: 10.1016/s0168-1605(00)00347-0

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microorganisms in foods 8** — use of data for assessing process control and product acceptance. Boston, MA: Springer US. 2011.

JUNG, S. A.; HAWWER, L. A.; NG, W. L. Parallel quorum sensing signaling pathways in *Vibrio cholerae*. **Current Genetics**, v. 62, n. 2, p. 255-260, may., 2015. doi: 10.1007/s00294-015-0532-8

KANG, C. *et al.* Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea: Resistance to various antibiotics and prevalence of virulence genes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 118, n. 1-2, p. 261-266, may., 2017. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.02.070

KIRATISIN, P. *et al.* The emergence of a novel ceftazidime-resistant CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, CTX-M-55, in both community-onset and hospital-acquired infections in Thailand. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, n. 58, v. 3, p. 349-355, jul., 2007. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.02.005

KLEIN, S. L. *et al.* Genes similar to the *Vibrio parahaemolyticus* virulence-related genes *tdh*, *tlh*, and *vscC2* occur in other Vibrionaceae species isolated from a pristine estuary. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 2, p. 595-602, jan., 2014. doi: 10.1128/AEM.02895-13

KLEIN, S. L.; LOVELL, C. R. The hot oyster: levels of virulent *Vibrio parahaemolyticus* strains in individual oysters. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 2, p. fiw232, feb., 2017. doi: 10.1093/femsec/fiw232

KUMARI, P.; KUMAR, A.; SOMASUNDARAM, T. Identification of gene/enzimas responsible for antibiotic resistance in *Vibrio alginolyticus* strain PTS13. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 1, p. 76-83, 2015.

LAGO, A.; FUENTEFRIA, S. R.; FUENTEFRIA, D. B. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 430-434, jul./aug., 2010. doi.org/10.1590/S0037-86822010000400019

LIU, H. *et al.* Antimicrobial activity and virulence attenuation of citral against the fish pathogen *Vibrio alginolyticus*. **Aquaculture**, v. 515, p. 734578, jan., 2020. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734578

LOVE, D. C. *et al.* Performance of cold chains and modeled growth of *Vibrio parahaemolyticus* for farmed oysters distributed in the United States and internationally. **International Journal of Food Microbiology**, v. 313, p.108378, jan., 2020. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108378

MARTÍNEZ-URTAZA, J. *et al.* Climate anomalies and the increasing risk of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* illnesses. **Food Research International**, v. 43, p. 1780-1790, aug., 2010. doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.001

MARTÍNEZ-URTAZA, J. *et al.* Spread of Pacific Northwest *Vibrio parahaemolyticus* strain. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n., 16, p.1573-1574, oct., 2013. doi: 10.1056/NEJMc1305535

METTEUCCI, G. *et al.* Species diversity, spatial distribution, and virulence associated genes os culturable *Vibrios* in a brackish coastal Mediterranean environment. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 2311-2321, 2015.

NDRAHA, N.; WONG, H-C.; HSIAO, H-I. Managing the risk of *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with oyster consumption: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 3, p. 1187-1217, may., 2020. doi.org/10.1111/1541-4337.12557

NDRAHA, N.; HSIAO, H-I. The risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters in Taiwan under the seasonal variations, time horizons, and climate scenarios. **Food Control**, v. 102, p. 188-196, aug., 2019. doi: org/10.1016/j.foodcont.2019.03.020

NOGUEROLA, I.; BLANCH, A. R. Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous. **Journal Applied Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 175-185, jul., 2008. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03730.x

PARTE, A. C. LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 1825-1829, jun., 2018. doi.org/10.1099/ijsem.0.002786

POLOMINO- CAMARGO, C.; GONZÁLVEZ- MUÑOZ, Y. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos em alimentos: ventajas y limitaciones. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica**, v. 31, n. 3, p. 535-546, jul./set., 2014.

RASZL, S. M. *et al.* *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in South America: water, seafood and human infections. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 5, p. 1201-1222, nov., 2016. doi: 10.1111/jam.13246

REDONDO, P. N. *et al.* Relación entre virulencia y presencia de plásmidos em bacterias *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissi*, aisladas de pez dorado (*Carassius auratus*). **Veterinaria**, v. 37, n. 1, p. 29-42, 2006.

RUBIO-COSIALS, A. *et al.* Transposase-DNA Complex Structures Reveal Mechanisms for Conjugative Transposition of Antibiotic Resistance. **Cell**, v. 173, n. 1, p. 208-220, mar., 2018. doi: 10.1016/j.cell.2018.02.032

SAEED, F. *et al.* Use of natural antimicrobial agents: a safe preservation approach. *In: Active antimicrobial food packaging*. 2019. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/active-antimicrobial-food-packaging/use-of-natural-antimicrobial-agents-a-safe-preservation-approach>. Acesso em: 01 jul. 2020.

SANTOS, S. S. *et al.* Condições sanitárias de ostras produzidas e

comercializadas em Taperoá, Bahia e o efeito da depuração na redução da carga microbiana. **Actapesca**, v. 3, n. 2, p. 49-60, 2015.

SANTOS, S. S.; EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; BARRETO, L. M. Cadeia produtiva de ostras no Baixo Sul da Bahia: um olhar socioeconômico, de saúde pública, ambiental e produtivo. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 5, n. 1, p. 10-21, 2017.

SHEN, X.; SU, Y. C. Application of grape seed extract in depuration for decontaminating *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). **Food Control**, v. 73, p. 601-605, 2017. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.09.007

SHEN, X. *et al.* Efficacy of *Vibrio parahaemolyticus* depuration in oysters (*Crassostrea gigas*). **Food Microbiology**, v. 79, p. 35-40, jun., 2019. doi.org/10.1016/j.fm.2018.10.005

SILVA, H. A.; COSTA, P.; RODRIGUES, S. Morfologia, biologia e ecologia dos moluscos bivalves. **Publicações Avulsas do Instituto Português do Mar e da Atmosfera**, n. 20, 2008.

SILVA, I. P. *et al.* *Vibrio cholerae* non-O1 in bivalve mollusks harvesting area in Bahia, Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 26, p. 1005-1010, jul., 2016. doi.org/10.5897/AJMR2015.7889

SILVA, I. P. *et al.* Antimicrobial resistance and potential virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from water and bivalve mollusks from Bahia, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 131, part A, p. 757-762, jun., 2018. doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.05.007

SILVA, S. A.; KAVALCO, K. F.; PAZZA, R. Uso do sequenciamento de genes mitocondriais na identificação de filés de salmão. **Evolução e Conservação da Biodiversidade**, v. 3, n. 2, p. 64-67, 2012. doi: 10.7902/3issecbvol2.2012n8

SILVEIRA, D. R. *et al.* Fatores de patogenicidade de *Vibrio* spp. de importância em doenças transmitidas por alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. e1252013, jul., 2016. doi.org/10.1590/1808-

1657001252013.

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Geral de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Surto de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. Ministério da Saúde, 2019. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_integrado\\_vigilancia\\_doencas\\_alimentos.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf). Acesso em: 12 jul. 2020.

STURENBURG, E.; MARCK, D. Extended-spectrum b-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. **Journal of Infection**, v. 47, n. 4, p. 273-295, nov., 2003. doi: 10.1016/s0163-4453(03)00096-3

SUPLICY, F. M. **Plano estratégico para desenvolvimento sustentável da maricultura catarinense (2018 - 2028)**. Florianópolis: Epagri, 2018. 93p.

TACON, A. G. J. Trends in Global Aquaculture and Aquafeed Production: 2000-2017. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 28, n. 1, p. 43-56, sep., 2020. doi.org/10.1080/23308249.2019.1649634

THOMPSON, F. L.; LIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of Vibrios. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 403-431, sep., 2004. doi: 10.1128/MMBR.68.3.403-431.2004

TSAO, C. *et al.* Seasonality clinical types and prognostic factors of *Vibrio vulnificus* infection. **Journal of Infection Developing Countries**, v. 7, n. 7, p. 553-540, jul., 2013. doi: 10.3855/jidc.3008

ZHANG, Y. *et al.* Autoregulation of ToxR and Its Regulatory Actions on Major Virulence Gene Loci in *Vibrio parahaemolyticus*. **Frontiers in Cellular Infection Microbiology**, v. 8, art. 291, p. 1-12, sep., 2018. doi: 10.3389/fcimb.2018.00291

WANGKHEIMAYUM, J. *et al.* Occurrence of diverse aminoglycoside modifying enzymes with co-existing extended-spectrum- $\beta$ -lactamases within Enterobacteriaceae isolated in India. **Journal**

**of Global Antimicrobial Resistance**, v. 21, p. 369-374, jun., 2020. doi: 10.1016/j.jgar.2019.11.005

WHO. World health organization. **Risk assessment of *Vibrio vulnificus* in raw oysters**. 2005. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43365/1/9241563109\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43365/1/9241563109_eng.pdf?ua=1). Acesso em: 5 jul. 2020.

WHO. World Health Organization. **Prevention and control of cholera outbreaks: WHO policy and recommendations**. 2015. Disponível em: [http://www.who.int/cholera/prevention\\_control/en/](http://www.who.int/cholera/prevention_control/en/). Acesso em: 11 de jul. 2020.

YU, Q. *et al.* Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from retail shellfish in Shanghai. **Food Control**, v. 60, p. 263-268, 2016. 10.1016/j.foodcont.2015.08.005



# Contaminação de peixes em pesque e pague

*Adriana dos Santos Silva  
Ludmilla Santana Soares e Barros  
Danuza das Virgens Lima  
Daniela Simões Velame*

Água potável é essencial para os humanos e todas as outras formas de vida. Nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, a qualidade da água continua sendo uma grande preocupação com a saúde. Aproximadamente 780 milhões de pessoas em todo o mundo não têm acesso a água potável e mais de 2,5 bilhões não têm acesso a saneamento adequado (SAXENA; KAUSHIK; MOHAN, 2015).

As incidências quanto à contaminação das águas por dejetos animais e humanos vem aumentando e a consequência nefasta é a introdução de coliformes totais e *Escherichia coli* nos recursos hídricos. Os bacilos Gram-negativos de *E. coli*, pertencentes à família Enterobacteriaceae, que residem principalmente nos tratos intestinais dos homeotérmicos (mamíferos e aves) são usados como indicadores de contaminação fecal das águas (MACHADO, 2016).

Atualmente a aquicultura tem se destacado apresentando elevada taxa de crescimento, com a produção de peixes em cativeiro aumentando consideravelmente no Brasil e no mundo. No Brasil, a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foi o peixe de água doce mais produzido e a piscicultura de pesque e pague, considerado um novo ramo, que vem tomando espaço nacionalmente (KUBITZA *et al.*, 2015).

A pesca e a aquicultura têm um papel significativo na eliminação da fome, na promoção da saúde e na redução da pobreza. Nunca antes as pessoas consumiam tanto peixe ou dependiam tanto do setor para seu bem-estar. O peixe é extremamente nutritivo, considerado fonte vital de proteína e nutrientes essenciais, especialmente para muitos membros mais pobres da nossa comunidade global. Paralelamente, o

grande crescimento da aquicultura no país tem acarretado problemas ambientais e de caráter higiênico-sanitário, haja vista que condições inadequadas de qualidade da água podem contaminar os peixes e favorecer o desenvolvimento de infecções diarreicas, devido à carga microbiológica presente no mesmo e às alterações físico-químicas (PEIXOTO *et al.*, 2012; BRASIL, 2014; OSMAN; EL-KHATEEB, 2016; SILVA *et al.*, 2016).

Tomando como parâmetro o cenário descrito, manifestou-se o interesse em avaliar o perfil microbiológico e físico-químico de águas e peixes consumidos neste tipo de piscicultura, no Território do Recôncavo da Bahia e na ilha de Itaparica localizada no litoral baiano. As 10 propriedades selecionadas estão localizadas nos municípios de Amélia Rodrigues, Amargosa, Cruz das Almas, Sapeaçu, São Felipe, Conceição do Almeida, Dom Macedo Costa, Santo Antônio de Jesus, Nazaré, Salinas das Margaridas e na ilha de Itaparica. Os critérios principais para a escolha das pisciculturas foram a existência de viveiros escavados que ofereciam o serviço de pesque e pague com Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

A coleta das amostras ocorreu no período de março de 2017 a novembro de 2017 em dois períodos do ano (seco e chuvoso). Uma amostra de água de superfície (500 mL) foi colhida em até 3 viveiros, sendo coletada em quatro pontos equidistantes de cada um dos viveiros, totalizando 48 amostras. Para tal, frascos previamente esterilizados foram mergulhados na água e só então, abertos. Uma vez preenchidos com água, foram acondicionados em caixas isotérmicas com gelo e transportados ao Laboratório de Parasitologia e Microbiologia Animal (LPM) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) para análise. As amostras de peixe foram coletadas semanalmente. De cada piscicultura foram coletadas duas amostras de peixe em até três viveiros, totalizando ao final da pesquisa 90 amostras de peixes. Os peixes foram coletados com auxílio de varas de pescar ou tarrafas das próprias pisciculturas e foram abatidos pelo método de abate por

choque térmico (termonarcese). As amostras foram acondicionadas em caixas térmicas refrigeradas e transportadas para o laboratório.

Para o preparo do peixe foi realizada a evisceração e em seguida, 25g de cada amostra foram adicionadas a 225 mL de água peptonada a 0,1%, para a preparação da primeira diluição. Foram realizadas diluições seriadas até a diluição  $10^6$  (SILVA *et al.*, 2010). Esses procedimentos foram realizados para cada amostra dos diferentes fornecedores. O peixe foi preparado para o processamento conforme as metodologias de Silva *et al.* (2010) e da APHA (2012). Esses procedimentos foram realizados para cada amostra dos diferentes fornecedores.

A análise de coliformes totais e *E. coli* para os peixes foi realizada por meio da técnica de plaqueamento em profundidade *pour plate* com utilização do meio de cultura Chromocult® Coliformes Agar (SILVA *et al.*, 2010). Para a análise de coliformes totais e *Escherichia coli* para a água, utilizou-se a técnica do substrato cromogênico Colilert (sistema patenteado por IDEXX Laboratories), um método qualitativo e quantitativo que permite determinar o número mais provável (NMP) de coliformes totais e *E. coli* (BARROSet *al.*, 2015). A análise de *E. coli* O157 para águas e peixes foi realizada por meio da técnica de plaqueamento em profundidade *Pour Plate*, com utilização do meio de cultura Fluorocult® *E. coli* O157 Agar (SILVA *et al.*, 2010). Para a contagem de microrganismos mesófilos foi utilizada a técnica de plaqueamento em profundidade, com o meio de cultura Plate Count Agar (PCA) da Merck (SILVA *et al.*, 2010). Os resultados foram expressos em log UFC/g. O método escolhido para análise de *Staphylococcus aureus* foi o Petrifilm™ Staph Express, um sistema pronto de meio de cultura, validado pelo Método AOAC® Official 2.003,11 com metodologia realizada conforme as normas do fabricante.

Para as análises físico-químicas da água foram utilizados os parâmetros de cor, pH e turbidez, os quais foram avaliados com a utilização colorímetro, pHmetro e turbidímetro, respectivamente. Foi

analisado também o oxigênio dissolvido e demanda bioquímica de oxigênio, segundo diretrizes do fabricante.

Todos os resultados foram comparados com a legislação vigente no Brasil: a Resolução Nº 12 de 2001 que dispõe sobre os padrões microbiológicos para alimentos de origem animal (BRASIL, 2001) e a Resolução nº 431 de 2011 que determina padrões físico-químicos e microbiológicos em água (BRASIL, 2011). Para a análise estatística os dados foram processados e analisados pelo programa R CORE TEAM. Todas as variáveis qualitativas passaram pelo teste de normalidade dos dados (*Shapiro-Wilks*). Foram realizadas estatísticas descritivas e analíticas, como média, mediana, desvio padrão, máxima e mínima, distribuição percentual, coeficiente de correlação de Spearman. O nível de significância adotado foi ( $p < 0,01^{**}$ ) e ( $p < 0,05^{*}$ ) e teste de ANOVA (análise da variância) que foram realizados para comparar o perfil microbiológico dos pesque e pagues (R CORE TEAM, 2017).

Os resultados do número mais provável em log (NMP/100 mL) de contaminação por coliformes totais, *E. coli* e contagem de bactérias mesófilas (log UFC/100 mL) em águas de cultivo dos pesque e pagues analisados estão apresentados na Tabela 1. Pôde-se perceber que, das 48 amostras de água avaliadas, 100% destas apresentaram contaminação por coliformes totais que variou de 2,13 a 6,38, com média de 5,80 log UFC/100 mL no período chuvoso e 6,03 log FC/100 mL no período seco. Na contagem de *E. coli* constatou-se que 100% das amostras apresentaram contaminação, sendo que 73% ( $n = 34/48$ ) das amostras estavam em desacordo com a legislação. A contaminação variou de <1 a 5,24, sendo a média de 3,73 log UFC/100 mL no período chuvoso e 4,02 log UFC/100 mL no período seco.

Ao avaliar qualitativamente a presença ou ausência de *E. coli* O157:H7, constatou-se que 66,7% das amostras avaliadas no período chuvoso e 99% das amostras avaliadas no período seco foram positivas (Tabela 1). As bactérias mesófilas apresentaram-se em números elevados. Os valores encontrados variaram de 2,95 a 6,13 com média

de 4,23 log UFC/100 mL no período chuvoso e 4,21 log UFC/100 mL no período seco (Tabela 1). Ao avaliar estatisticamente com a análise da variância (ANOVA), observou-se que houve variação significativa entre os tanques para os coliformes totais e *E. coli* ( $p > 0,05$ ), o que indica que há, pelo menos, uma diferença entre os grupos analisados (Tabela 2).

**Tabela 1.** Análises microbiológicas. Média dos resultados em log, dos números mais prováveis (Log NMP/100 mL) em água do viveiro dos pesque e pague localizados na região do Recôncavo baiano e ilha de Itaparica do Estado da Bahia, no período de março a novembro de 2017.

Propriedades	Período chuvoso			Período seco		
	CT log NMP/ 100 mL	<i>E. coli</i> log NMP/ 100mL	Mesófilos log UFC/g	CT log NMP/ 100mL	<i>E. coli</i> log NMP/ 100mL	Mesófilos log UFC/g
P1	2,13	1,74	3,79	6,02	<1	4,84
P2	5,79	3,63	4,30	6,38	3,16	4,05
P3	6,38	3,29	6,13	6,38	4,05	4,52
P4	6,38	5,24	4,12	6,02	4,38	5,94
P5	6,38	3,47	4,18	6,38	<1	2,95
P6	6,38	4,38	4,56	5,76	4,45	5,19
P7	6,15	4,00	4,34	4,98	3,30	3,46
P8	6,21	4,36	3,39	6,38	4,68	3,63
P9	5,84	3,49	3,55	5,63	4,38	3,60
P10	6,38	3,79	3,96	6,38	3,79	3,96
Mínimo	2,13	1,74	3,39	4,98	<1	2,95
Máximo	6,38	5,24	6,13	6,38	4,68	5,94
Média	5,80	3,73	4,23	6,03	4,02	4,21
Desvio padrão	1,30	0,91	0,75	0,46	0,55	0,90

P: propriedades. CT: coliformes totais. NMP: Número Mais Provável. UFC: Unidade Formadora de Colônia.

**Tabela 2.** Análise comparativa dos valores microbiológica entre locais de coleta. A análise da variância (ANOVA) em águas e peixes do viveiro dos pesque e pague localizados na região do Recôncavo baiano e ilha de Itaparica do Estado da Bahia, no período de março a novembro de 2017.

ANOVA ENTRE LOCAIS DE COLETA						
		Soma dos Quadrados	Gl	Quadrado Médio	F	Sig.
Coliformes totais - Água	Entre grupos	25,076	9	2,786	3,627	,002**
	Nos grupos	29,192	38	,768		
	Total	54,267	47			
<i>Escherichia coli</i> - Água	Entre grupos	55,315	9	6,146	8,171	,000**
	Nos grupos	28,583	38	,752		
	Total	83,898	47			
Mesófilos - Água	Entre grupos	18,208	9	2,023	1,814	,097
	Nos grupos	42,372	38	1,115		
	Total	60,580	47			
Coliformes totais - Peixe	Entre grupos	20,695	9	2,299	4,520	,001**
	Nos grupos	17,297	34	,509		
	Total	37,992	43			
<i>Escherichia coli</i> - Peixe	Entre grupos	37,199	9	4,133	8,197	,000**
	Nos grupos	17,145	34	,504		
	Total	54,344	43			
Mesófilos - Peixe	Entre grupos	48,217	9	5,357	5,047	,000**
	Nos grupos	36,089	34	1,061		
	Total	84,306	43			
<i>Staphylococcus aureus</i> - Peixe	Entre grupos	25,673	9	2,853	3,376	,005**
	Nos grupos	28,725	34	,845		
	Total	54,398	43			

\*\* significativo 5%, respectivamente, pelo teste de F.

Os parâmetros físico-químicos (pH, cor aparente, turbidez, OD e DBO) em águas de cultivo dos pesque e pagues analisados estão apresentados na Tabela 3. Os valores do pH variaram de 5,00 a 7,11 sendo a média de 6,13 no período chuvoso e 6,01 no período seco.

Então, concluiu-se que 87% (n =42/48); das amostras estavam nos padrões exigidos. Os valores encontrados de turbidez indicam que 100% das amostras nos dois períodos apresentaram em conformidade com o valor estabelecido pela legislação, sendo a média de 13,79 NTU no tempo chuvoso e 11,83 NTU, no seco (Tabela 3).

**Tabela 3.** Análises dos parâmetros físico-químicos (pH, cor aparente, turbidez, OD e DBO) em águas de cultivo dos pesque e pague analisados, em água do viveiro dos pesque pagues localizados na região do Recôncavo baiano e ilha de Itaparica do Estado da Bahia, no período de março a novembro de 2017.

Propriedades	Período chuvoso					Período seco				
	pH	Turbidez	Cor	OD	BOD	pH	Turbidez	Cor	OD	BOD
P1	6,79	21,11	46	28,50	6,44	6,00	8,08	33	7,06	6,04
P2	7,11	7,96	80	29,26	4,97	6,00	1,04	30	3,13	8,90
P3	6,42	10,81	63	22,77	6,11	6,00	21,3	93	14,6	11,54
P4	5,00	9,60	60	6,07	12,86	6,00	8,39	36	8,61	10,83
P5	6,00	8,20	100	10,07	11,43	6,00	7,86	65	6,05	6,58
P6	6,00	18	100	11,00	6,79	6,00	12,00	80	8,56	11,20
P7	6,00	12,33	100	10,70	6,87	7,00	31,10	100	15,96	13,44
P8	6,00	25,30	100	5,77	7,80	6,00	8,88	100	16,28	12,39
P9	6,00	22,13	100	3,89	8,01	6,00	14,43	90	14,09	10,26
P10	6,00	2,50	36	18,36	10,67	6,00	5,22	36	18,36	10,67
Mínimo	5,00	2,50	36	3,89	4,97	6,00	1,04	30	3,13	6,04
Máximo	7,11	25,30	100	29,26	12,86	7,00	31,10	100	18,36	13,44
Média	6,13	13,79	78,5	14,63	8,19	6,01	11,83	56,3	11,27	10,18
Desvio padrão	0,56	7,41	25,29	9,44	31,10	0,31	8,68	29,81	5,18	2,37

OD: Oxigênio dissolvido. BOD: Demanda Bioquímica de Oxigênio. Cor: cor aparente.

Em relação à cor aparente, constataram-se a não conformidade com a legislação em 66,6% das amostras na época das chuvas e em 45% das amostras na época da seca. A média desses valores foi 78,5 mg Pt/L para a época das chuvas e 56,3 mg Pt/L para a época seca (Tabela 3).

O oxigênio dissolvido OD apresentou média de 14,63 no período chuvoso e 11,27 no seco, sendo que 87,5% das amostras em ambos os períodos estavam em não conformidade. A demanda bioquímica de oxigênio DBO neste estudo apresentou-se média de 8,19 mg/L O<sub>2</sub> no período chuvoso e 10,18 mg/L O<sub>2</sub> no período seco, sendo 87% não

conformes no período chuvoso e 100% no seco. Ou seja, fora dos padrões de limites estabelecidos pelo CONAMA (357/2005), que devem ser de até 5 mg/L O<sub>2</sub> (Tabela 3).

Nos peixes coletados foram realizadas as análises microbiológicas de CT, *E. coli*, *E. coli* O157H7, *S. aureus* e bactérias mesófilas, em 90 amostras (Tabelas 4 a 6).

**Tabela 4.** Análises microbiológicas. Média dos resultados em log, de coliformes totais (CT, *E. coli*, e mesófilos), unidades formadoras de colônias (log UFC/mL), em peixes do viveiro dos pesque e pague localizados na região do Recôncavo baiano e ilha de Itaparica do Estado da Bahia, no período de março a novembro de 2017.

Propriedades	Período chuvoso			Período seco		
	CT log UFC/g	<i>E. coli</i> log UFC/g	Mesófilos log UFC/g	CT log UFC/g	<i>E. coli</i> log UFC/g	Mesófilos log UFC/g
P1	4,06	2,93	4,22	2,84	2,30	3,30
P2	5,00	3,20	6,08	3,95	1,47	4,90
P3	3,87	<1	4,13	3,97	<1	4,51
P4	5,12	3,16	8,63	4,79	3,45	5,41
P5	2,96	<1	7,14	-	-	<1
P6	4,26	2,35	7,00	3,76	1,86	3,98
P7	5,90	2,92	5,35	4,78	2,23	4,96
P8	6,81	3,18	7,09	4,57	4,12	6,29
P9	4,1	2,13	4,49	5,3	1,88	5,68
P10	4,22	3,54	5,09	4,79	3,53	6,63
Média total dos períodos	4,63 log UFC/g	2,92 log UFC/g	5,92 log UFC/g	4,30 log UFC/g	2,60 log UFC/g	5,07 log UFC/g

**Tabela 5.** A avaliação qualitativa de *E. coli* O157:H7, em peixes de viveiro dos pesque e pague, localizados no Recôncavo baiano e ilha de Itaparica, no Estado da Bahia, no período de março a novembro de 2017.

<i>E. coli</i> O157:H7			
<i>E. coli</i> O157H7 período chuvoso		<i>E. coli</i> O157:H7 período seco	
P	34	P	39
N	13	N	7
72,3% positivas		84,7% positivas	

P= presença, N= ausência de *E. coli* O157:H7.



**Tabela 6.** Análises microbiológicas. Média dos resultados em Log, de, *S. aureus*, em unidades formadoras de colônias (Log UFC. mL<sup>-1</sup>), em peixes do viveiro dos pesque e pague localizados na região do recôncavo baiano e ilha de Itaparica do Estado da Bahia, no período de março a novembro de 2017.

Propriedades	Período chuvoso	Período seco
	<i>S. aureus</i> Média log UFC/g	<i>S. aureus</i> Média log UFC/g
P1	2,84	<1
P2	3,8	4,47
P3	2,63	<1
P4	3,50	3,22
P5	2,79	<1
P6	4,46	4,46
P7	4,00	2,95
P8	3,52	3,94
P9	3,05	3,83
P10	4,14	<1
Média total por período	3,47 log UFC/g	3,81 log UFC/g

Em 100% das amostras testadas houve contaminação por coliformes totais, variando de 2,63 a 8,00 log UFC/100g, com média de 4,65 log UFC/100g no período chuvoso e 4,41 log UFC/100g no período seco (Tabela 4). A contagem de *E. coli* neste estudo variou de <1 a 4,32 log UFC/100g, com média de 2,92 log UFC/100g no período chuvoso e 2,60 log UFC/100g no período seco, sendo que destas, 40% (n = 36/90) estavam fora do padrão recomendado pela legislação. Ao avaliar a presença de *E. coli* O157H7, constatou-se que 72,3% no período chuvoso e 84,7% período seco foram positivas, totalizando 81,1% (n = 73/90) das amostras como positivas (Tabela 4 e 5).

A contaminação por *S. aureus* foi constatada nos peixes, com contagens de <1 a 6,06 log UFC/100g (Tabela 5). A média de *S. aureus* foi de 3,47 log UFC/100g no período chuvoso e 3,81 log UFC/100g no período seco. Todas as amostras de peixes apresentaram contaminação por *S. aureus* e 65,5% (n = 59/90) das amostras estavam fora do limite estabelecido pela legislação. As contagens de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas no peixe variaram de 3,30 a 8,63 log UFC/100g, com

média de 5,92 log UFC/100g no período chuvoso e 5,07 log UFC/100g no período seco (Tabela 6).

A análise da variância (ANOVA) indicou variação significativa entre os tanques para os coliformes totais (CT), *E. coli* e *S. aureus* e bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas ( $p > 0,05$ ). Conclui-se que existem pelo menos dois pesque e pague com valores significativamente diferentes para os microrganismos avaliados (Tabela 2).

Após elaboração de uma matriz de correlação de Pearson foram escolhidos os parâmetros cujos testes apresentaram significância confirmada para  $p \leq 0,01$  e  $p \leq 0,05$ . As variações de cada um dos parâmetros são mostradas na (Tabela 7).

**Tabela 7.** Correlação de Pearson, em unidades formadoras de colônias (Log UFC. mL<sup>-1</sup>), em águas e peixes do viveiro dos pesque e pague localizados na região do recôncavo baiano e ilha de Itaparica do Estado da Bahia, no período de março a novembro de 2017.

Correlação de Pearson												
	CT - Água	<i>E. coli</i> - Água	Meso Água	pH	Cor	Turbidez	OD	DBO	CT - Peixe	<i>E. coli</i> - Peixe	Meso Peixe	<i>S. aureus</i> - Peixe
CT - Água	1	<b>,423**</b>	,221	<b>-,341*</b>	,129	<b>-,575**</b>	<b>-,426**</b>	,278	,064	-,089	,241	,026
<i>E. coli</i> - Água	<b>,423**</b>	1	,033	<b>-,354*</b>	,240	-,125	-,055	<b>,536**</b>	<b>,423**</b>	,140	<b>,566**</b>	,262
Mesófilos - Água	,221	,033	1	,087	-,165	-,105	,066	-,103	-,150	-,246	-,096	-,182
pH	<b>-,341*</b>	<b>-,354*</b>	,087	1	,041	,111	<b>,599**</b>	<b>-,413**</b>	-,171	,046	<b>-,450**</b>	-,043
Cor	,129	,240	-,165	,041	1	,146	-,005	,100	,190	-,085	,027	,046
Turbidez	<b>-,575**</b>	-,125	-,105	,111	,146	1	,272	-,239	,027	-,056	-,151	-,116
OD	<b>-,426**</b>	-,055	,066	<b>,599**</b>	-,005	,272	1	-,263	-,108	,184	-,185	-,130
DBO	,278	<b>,536**</b>	-,103	<b>-,413**</b>	,100	-,239	-,263	1	-,019	,053	,267	-,045
CT - Peixe	,064	<b>,423**</b>	-,150	-,171	,190	,027	-,108	-,019	1	<b>,444**</b>	<b>,706**</b>	,227
<i>E. coli</i> - Peixe	-,089	,140	-,246	,046	-,085	-,056	,184	,053	<b>,444**</b>	1	<b>,436**</b>	,241
Mesófilos - Peixe	,241	<b>,566**</b>	-,096	<b>-,450**</b>	,027	-,151	-,185	,267	<b>,706**</b>	<b>,436**</b>	1	,206
<i>S. aureus</i> - Peixe	,026	,262	-,182	-,043	,046	-,116	-,130	-,045	,227	,241	,206	1

\*. A correlação é significativa no nível 0,05 (bilateral).

\*\* A correlação é significativa no nível 0,01 (bilateral).

OD: Oxigênio Dissolvido. DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio. Meso: Bactérias mesófilas. Cor: cor aparente.

Neste estudo, as correlações de Pearson apresentaram-se positivas e negativas. As correlações positivas em níveis de significância  $p \leq 0,01$  foram: CT na água e *E. coli* na água, sendo o nível de significância de 0,423; *E. coli* na água e CT na água, *E. coli* na água e DBO. Os CT no peixe, mesófilos no peixe de 0,423; 0,536 e 0,423 respectivamente; os CT no peixe e *E. coli* na água significância de 0,423, CT no peixe e *E. coli* no peixe 0,444, CT no peixe e mesófilos no peixe 0,706. *E. coli* no peixe apresentou correlação entre CT no peixe e mesófilos no peixe de 0,444 e 0,436 respectivamente. Já os mesófilos apresentaram correlação entre *E. coli* na água 0,566, CT no peixe 0,706 e *E. coli* no peixe 0,36. O pH apresentou correlação OD de 0,599, a DBO correlacionou com *E. coli* na água 0,536.

As correlações negativas foram ao nível de significância  $p \leq 0,05$ . Os microrganismos *E. coli* na água e CT na água apresentaram correlação negativa com pH de -0,341 e -0,354 respectivamente; pH apresentou correlação entre: *E. coli* na água, CT na água e DBO de -0,341, -0,354, -0,413 respectivamente. A turbidez com CT na água de -0,575. O OD com CT na água -0,426 (Tabela 7).

Nossos resultados corroboram com os de Santos *et al.* (2012) que constataram a presença de coliformes totais, *E. coli* e bactérias heterotróficas em 100% das pisciculturas avaliadas. *E. coli* é geralmente considerada uma bactéria inofensiva que se espalha pela via fecal-oral. No entanto, várias doenças intestinais, infecção do trato urinário, meningite neonatal e gastroenterites têm *E. coli* como agente etiológico. A infecção da população com poucas cepas de *E. coli* patogênicas, como *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), causam riscos graves para a saúde. Mesmo outras cepas, como *E. coli* produtora de toxinas citolética distendida e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) foram também relatadas como diarreicas (FERNANDES; GOIS, 2015; SAXENA; KAUSHIK; MOHAN, 2015; WANG *et al.*, 2017; HAMED *et al.*, 2018; SUDHA RANI *et al.*, 2018).

Em 100% das amostras testadas houve contaminação por *E. coli* e que a maioria estava acima do permitido pela legislação brasileira. Estes dados corroboram com outros estudos que evidenciam a presença em números elevados de *E. coli* em águas e pescados (NOVOSLAVSKIJ *et al.*, 2016). Segundo a resolução do CONAMA 431/11 (BRASIL, 2011), para águas doces destinadas à aquicultura e atividade de pesca (classe 2), a população de coliformes termotolerantes não deverá exceder 1.000 (= 3 log) de coliformes termotolerantes /100 mL, em 80% ou mais de pelo menos seis amostras coletadas durante um ano. Sendo assim, os valores encontrados no estudo referente às águas dos pesque e pagues analisados estão em desacordo com a legislação vigente.

Contagens elevadas de CT e coliformes termotolerantes (*E. coli*) foram evidenciadas em vários estudos (LORENZON *et al.*, 2010). Nestes estudos encontraram-se valores entre 4,61 log UFC/100 mL e 3,85 log UFC/100 mL, sendo que das amostras analisadas, apenas uma (3,17 UFC/100 mL) estava em não conformidade com a legislação. Estas notificações demonstram a existência de uma correlação positiva significativa por estes microrganismos, indicando que quanto maior o número de CT, maiores as chances de encontrar *E. coli* e *E. coli* O157:H7. Fato esperado, uma vez que a origem fecal dos coliformes pode ser a mesma, ou seja, origem de resíduos de esgoto ou mesmo de produtos urbanos. Ressalta-se que neste experimento verificaram-se altas percentagens de *E. coli* O157:H7 em amostras de água e peixes.

A contaminação dos peixes por *E. coli* e CT apresentou correlação positiva significativa, tanto de *E. coli* na água para CT no peixe, assim como de CT no peixe com *E. coli* na água e *E. coli* no peixe. Essa correlação evidencia que a contaminação da água está contaminando o peixe e quanto maior a presença dos microrganismos na água, maior a presença destes no peixe, uma vez que tais microrganismos não fazem parte da microbiota intestinal dos peixes (LORENZON *et al.*, 2010; OSMAN; EL-KHATEEB, 2016).

Níveis elevados de *E. coli* são preocupantes e se configuram como um problema de saúde pública, uma vez que *E. coli* é um microrganismo que possui estirpes patogênicas para o ser humano, como *E. coli* O157:H7. A infecção por *E. coli* O157:H7 geralmente causa diarreia hemorrágica aguda e grave com cólicas abdominais, embora também seja possível diarreia não hemorrágica. Adicionalmente, estão associadas à síndrome hemolítico-urêmica (SHU), na qual os glóbulos vermelhos são destruídos e os rins falham. Cerca de 2 a 7% das infecções levam a essa complicação e nos Estados Unidos, a SHU é a principal causa de insuficiência renal aguda em crianças e a maioria dos casos é causada por *E. coli* O157:H7 (FERNANDES; GOIS, 2015; SAXENA; KAUSHIK; MOHAN, 2015; VOLKWEIS *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2017; HAMED *et al.*, 2018; SUDHA RANI *et al.*, 2018).

*E. coli* O157:H7 é uma bactéria bem adaptada para sobreviver no ambiente aquático e já foi detectada em uma variedade de ambientes, como água bruta e água de superfície e é comumente presente em águas residuais animais e humanas. Sua sobrevivência no ambiente depende de vários fatores, como disponibilidade de nutrientes, temperatura, radiações ultravioletas e predação. Vários estudos microbiológicos demonstraram que as bactérias entram em estado viável, mas não cultivável, quando expostas a estresses como mudanças na temperatura, nutrientes, pH e cloro, mesmo sob condições simples de inanição (LORENZON *et al.*, 2010; SAXENA; KAUSHIK; MOHAN, 2015; NOVOSLAVSKIJ *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2017).

As contagens de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas na água foram elevadas nos dois períodos. Os níveis elevados de bactérias mesófilas podem afetar negativamente o nível de OD, indicando que quanto maior o número de mesófilos menor será o número de OD na água, devido à utilização do mesmo para o crescimento destas bactérias. As bactérias mesófilas quando presentes em grandes quantidades indicam condições higiênico-sanitárias insatisfatórias (OSMAN; EL-KHATEED, 2016). A presença desses é indicativa de problema de saúde

pública, uma vez que as bactérias heterotróficas mesófilas em sua maioria são patogênicas para o homem e pelo fato de que as bactérias presentes na água podem estar contaminando os peixes (FERNANDES; GOIS, 2015).

Segundo a RDC n° 12 de 02 de janeiro de 2001 da ANVISA (BRASIL, 2001), os padrões microbiológicos para peixes “in natura” e resfriados são: *S. aureus* até  $10^3$  NMP/100 mL (máximo Log UFC/g: 3,0), *Salmonella* spp. (ausência em 25g). Embora, não exista padrão estabelecido para coliformes totais na legislação vigente, valores elevados destes indicam condições higiênico-sanitárias deficientes. A presença de coliformes termotolerantes em alimentos sugere que há presença elevada de *E. coli*, permitindo assim obter os níveis de contaminação e a qualidade sanitária em que os alimentos se encontram. A contagem de *E. coli* neste estudo indica que as amostras de peixes avaliadas estão em desacordo com a legislação vigente (BRASIL, 2001) e que o alimento está impróprio para o consumo.

Esta contaminação pode estar ocorrendo devido à presença de animais homeotérmicos próximos aos viveiros como cães, bovinos e aves, os quais foram visualizados no momento da coleta, ou por contaminação por esgotos, ou fossas. Estes dados vão de acordo com outros trabalhos realizados por Silva *et al.* (2016); Lorenzon *et al.* (2010) e Alencar *et al.* (2012).

As bactérias mesófilas quando presentes em grandes quantidades indicam condições higiênico-sanitárias insatisfatórias. Embora não tenham limites estabelecidos para microrganismos mesófilos para pescado, é importante que se façam tais análises, pois se pode ter um parâmetro higiênico-sanitário. Nas pesquisas de Lanzarin *et al.* (2012), os dados variaram de 4,69 a 7,92 log UFC/g e 5,30 a 8,08 log UFC/g para tambacu eviscerado e em banda, respectivamente. Basso *et al.* (2014) encontrou valores de aeróbios mesófilos variando em torno de 6,03 – 8,23 log UFC/100g. Estes valores corroboram com os encontrados neste estudo.

Os testes de correlação de Pearson para as bactérias mesófilas em peixes apresentam correlação positiva ao nível de significância de  $p \leq 0,01$  com, *E. coli* na água, CT no peixe e *E. coli* no peixe indicando que quando há um aumento de bactérias mesófilas há também o aumento destes microrganismos. Isso ocorre devido às bactérias mesófilas que se multiplicam entre 10 e 45°C. Além disso, inclui a maioria dos contaminantes dos alimentos de origem animal, podendo atingir altas contagens quando o alimento é mantido à temperatura ambiente (RITTER *et al.*, 2012).

Contagens de *S. aureus* são de grande importância, pois este microrganismo é um dos mais envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares relacionadas ao consumo de alimentos contaminados pela manipulação do alimento em condições higiênico-sanitárias inadequadas (SAXENA; KAUSHIK; MOHAN, 2015). O risco potencial de uma toxinfecção causada por este microrganismo existe e dependerá da manipulação do produto e seu posterior armazenamento e processamento (ALVES; SILVA; MELO JÚNIOR, 2016). Estes resultados podem estar relacionados com contaminação de origem humana e configura-se como possível risco à saúde pública, pois o *S. aureus* é uma bactéria patogênica oportunista para humanos e peixes (ALVES; SILVA; MELO JÚNIOR, 2016). A detecção de *S. aureus* em águas indica uma situação de contaminação do ambiente e condições ruins de saneamento (BASSO *et al.*, 2014).

Os viveiros de peixes ao ar livre são potencialmente expostos à contaminação contínua por patógenos, que podem ser introduzidos diariamente na água, mantendo constante o nível de patógenos. A flutuação diária da temperatura e outros fatores ambientais também podem influenciar a sobrevivência do patógeno. Em um tanque de peixes, *E. coli* O157:H7 e *S. aureus*, por exemplo, também podem entrar nos sedimentos no fundo do tanque e sobreviver (LINGAMMA; NIVEDITHA, 2014; SAXENA; KAUSHIK; MOHAN, 2015; MUSOKE *et al.*, 2016). Adicionalmente, um alto número de patógenos nos órgãos

internos nos peixes pode causar um risco potencial à saúde humana, lembrando que o patógeno pode ser espalhado no peixe e no ambiente de processamento de alimentos (MUSOKE *et al.*, 2016; LINGAMMA; NIVEDITHA, 2016).

Os peixes liberaram matéria orgânica como resíduo na água, o que pode ter contribuído para o aumento da microflora aquática concorrente. A matéria orgânica também pode vir do alimento. Ao contrário de um cenário de lagoa natural mais dinâmico, este estudo foi realizado em um sistema fechado que poderia ter levado a uma deterioração mais rápida da qualidade da água. Essas condições poderiam ter um efeito adverso na capacidade de sobrevivência do patógeno.

Em baixas temperaturas, observou-se que *E. coli* O157:H7 pode persistir por um longo período na água. Também foi indicado que este patógeno sobrevive melhor em água pura do que em lago ou água de reservatório com contagens microbianas mais altas e pode sobreviver em água engarrafada por 4.300 dias. Vários fatores podem influenciar a taxa de sobrevivência de *E. coli* O157:H7 na água. Os microrganismos indígenas que atuam como concorrentes na água da lagoa podem se tornar um fator limitante que contribui para a rápida diminuição de *E. coli* O157:H7 na água. Além disso, temperatura, alta salinidade, compostos encontrados na água da superfície agrícola e presença de produtos químicos, incluindo fertilizantes, pesticidas e herbicidas, reduziram a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 (LINGAMMA; NIVEDITHA, 2014; RITTER *et al.*, 2012; SEXENA; KAUSHIK; MEDICHERLA, 2015). Pode-se perceber que houve uma diferença entre as médias para os microrganismos tanto na água como em peixes e nos parâmetros físico-químicos da água entre os períodos, sendo que no período chuvoso a concentração desses microrganismos foi maior que no período seco. Com o aumento da chuva, ocorre o processo de lixiviação dos solos, que com eles arrastam a matéria orgânica e com estes microrganismos modificam a microbiota do solo, aumentando as concentrações destes



que são naturais da microbiota da água e agregando outras que contaminam os peixes e modificam os parâmetros físico-químicos da água. O pH adequado no viveiro é de extrema importância para o desenvolvimento dos peixes, uma vez que variações de pH podem favorecer o desenvolvimento de infecções e doenças parasitárias. A maioria das amostras estava nos padrões exigidos pelo CONAMA 431/11 (BRASIL, 2011), que estabelece valores de 6,0 a 9,0 como sendo ideais para a criação de peixes. Outros trabalhos têm apresentado resultados que corroboram com os descritos neste estudo, com pH que varia numa faixa de 6,8 a 8,0 (ALENCAR *et al.*, 2012; ALVES; SILVA; MELO JÚNIOR, 2016). Porém, foram encontrados valores fora do padrão e estes devem ser corrigidos, uma vez que influenciam na qualidade física e microbiológica da água (SILVA *et al.*, 2016).

A análise estatística entre os fatores físico-químicos, tais como pH e OD, e pH e DBO, onde o pH e OD apresenta uma correlação positiva significativa a  $p \leq 0,01$  que indica que quando ocorre o aumento de pH ocorre o aumento de OD. A correlação entre pH e DBO demonstrou uma correlação negativa com índice de significância de  $p \leq 0,01$ , na qual o aumento de pH representa um decréscimo da DBO da água. Este fato pode estar ocorrendo devido à acidificação da água por um processo fermentativo gerado a partir do crescimento de bactérias (PAIVA *et al.*, 2012; ROCHA *et al.*, 2013), algo evidenciado neste estudo. Fato corroborado pela análise negativa do pareamento dos dados entre pH e CT, *E. coli* e bactérias mesófilas, ou seja, quando ocorreu aumento destes, observou-se diminuição do pH, com valores ao nível de significância de  $p \leq 0,05$ . Dados parecidos foram encontrados por outros autores (BARROS *et al.*, 2010).

Para o parâmetro oxigênio dissolvido foram obtidos os seguintes resultados: 100% das amostras apresentaram valores de oxigênio dissolvido elevados na água, dados que indicam condições adequadas ao ambiente aquático (Tabela 7). Segundo resolução do CONAMA nº 431/11, na água de classe 2 as concentrações de oxigênio

dissolvido devem conter no mínimo 5,00 mg/L. Os dados encontrados neste estudo corroboram com os observados em estudos realizados em outros pesque e pagues que sugerem um valor superior a 5 mg/L (BRASIL, 2011; ALENCAR *et al.*, 2012; ALVES; SILVA; MELO JÚNIOR, 2016).

Avaliar os aspectos físico-químicos da água do viveiro é de fundamental importância para a cultura e a qualidade do peixe consumido. Analisar o pH, o oxigênio dissolvido, assim como a boa alimentação, está diretamente relacionados à qualidade da água. Outro fator que pode estar influenciando nesses parâmetros assim como na qualidade da água é ausência de coliformes fecais e a quantidade de ração utilizada para alimentar os peixes. Isto pode levar a eutrofização do ambiente aquático, ocasionando redução do oxigênio dissolvido e assim, favorecer a contaminação por *S. aureus* já que a ração é manipulada por seres humanos e diversos estudos associam a contaminação cruzada como um importante fonte de contaminação, uma vez que estes estão sendo isolados em mãos de manipuladores (ALVES; SILVA; MELO JÚNIOR, 2016).

A demanda bioquímica de oxigênio DBO neste estudo apresentou-se fora dos padrões de limites estabelecidos pelo CONAMA (BRASIL, 2011), que devem ser de até 5 mg O<sub>2</sub>/L (Tabela 7). A DBO é um indicador de matéria orgânica na água, sendo definido como a concentração de oxigênio dissolvido necessário para estabilizar os níveis de matéria orgânica no ambiente aquático e evitar o processo de eutrofização do meio. Desta forma, pode-se afirmar que os valores encontrados são indicativos de contaminação e qualidade higiênico-sanitária inadequada das águas dos viveiros e conseqüentemente dos peixes que neles vivem (SAMOCHA *et al.*, 2004). Deste modo, os resultados referentes à DBO encontrados neste estudo são indicativos de contaminação da água do viveiro e explica números elevados de OD. Com isto, maior é o número de DBO para que assim ocorra a diminuição de matéria orgânica, com isso ocorra a diminuição do número de bactérias (SAMOCHA *et al.*, 2004).

Os níveis de cor aparente e turbidez encontram-se em concordância com os limites estabelecidos pelo CONAMA (431/2011), que devem ser de até 75 mg Pt/L e 100 NTU, respectivamente (BRASIL, 2011). Segundo Alencar *et al.* (2016) a turbidez pode estar relacionada a um elevado índice de componentes dissolvidos, desde matéria orgânica até microrganismos patogênicos, que podem causar a contaminação de produtos.

Pode-se concluir que as águas utilizadas na atividade de piscicultura local estão fora dos limites estabelecidos pela legislação para *E. coli*. Com relação aos parâmetros físico-químicos avaliados neste estudo, a DBO está fora do padrão estabelecido indicando contaminação e observa-se alta carga microbiológica. Os peixes avaliados apresentaram-se fora do padrão para os limites estabelecidos pela legislação para *E. coli*, *S. aureus* entre os dois períodos avaliados, sendo estes classificados impróprios para o consumo, configurando-se como risco a saúde pública. A presença de estirpes patogênicas de *E. coli* O157:H7 nos peixes avaliados é algo preocupante uma vez que estas são de alto grau de virulência e patogênicas para homens e estão na lista de bactérias envolvidas em surtos alimentares, configurando assim como risco à saúde pública. A presença de enterobactérias nos peixes e na água representa um risco potencial à saúde do consumidor uma vez que o consumo de peixe cru ou malcozido contaminado, pode configurar como fatores importantes para ocorrer infecção e/ou intoxicação alimentar. Sendo assim, o monitoramento da qualidade da água dos viveiros é de suma importância, enfatizando os cuidados no preparo e manipulação desses alimentos, de modo a minimizar os riscos de contaminação por microrganismos, pois a partir desta é possível garantir um alimento seguro e de qualidade para o consumo.

Não existe manejo adequado das águas dos viveiros e conseqüentemente dos peixes que são criados. Isso é um dos fatores que contribuem diretamente para qualidade higiênico-sanitária dos pesque-pague. Desta forma faz-se necessária uma qualificação tanto

dos proprietários como da mão de obras utilizadas, visando à qualidade da água dos viveiros e dos peixes consumidos nestes estabelecimentos.

## Referências

ALENCAR, S. R. *et al.* Avaliação ambiental, físico-química e microbiológica do pesque-pague do clube recreativo grangeiro, Crato-CE. **Caderno de Cultura e Ciência**, v. 10, n. 1, p. 28-36, 2012.

ALVES, W. S.; SILVA, P. B.; MELO JÚNIOR, H. N. Variação sazonal da qualidade da água em pesque pague do semiárido cearense. **Caderno de Cultura e Ciência**, v. 15, n. 1, p.93-103, 2016.

APHA. Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater. 22 Ed.: **American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Washington, DC. 2012.**

BARROS, L. S. S.; SILVA, C. R.; SILVA, V. C. Qualidade das águas de nascentes na bacia hidrográfica do rio Paraguaçu, **Cruz das Almas, Bahia**. Revista Brasileira de Recursos Hídricos, v. 20, n. 3, p. 668-676, 2015.

BARROS, L. S. S. *et al.* Microcystin-LR in brazilian aquaculture production systems. **Water Environment Research**, v. 82, n. 3, p. 240-248, 2010.

BASSO A. P. *et al.* Antibiotic resistance and enterotoxin genes in *Staphylococcus* sp. isolates from polluted water in Southern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 4, p. 1813-1820, 2014.

BRASIL. **Ministry of Health. National Health Surveillance Agency. RDC Resolution No. 12**, of January 2, 2001. Technical Regulation on Microbiological Standards for Food. Official Gazette of the Federative Republic of Brazil, Brasília, DF, Section 1, p. 45. Jan 10 2001.

BRASIL. **Ministry of the Environment. National Environment Council - CONAMA**. Resolution No. 431 of May 24, 2011. Provides for

the classification of bodies of water and environmental guidelines for their classification, as well as establishing the conditions and standards for the discharge of effluents, and other measures. Official Gazette, Brasília. Official Gazette, Brasília 2011.

BRASIL. **Ministry of Health. Foodborne Diseases**. 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/653-secretaria-svs/vigilancia-de-aaz/doencas-transmitidas-for-food-dta/11216-description-of-the-disease>. Acesso em: 15 mar. 2020.

FERNANDES, L. L.; GOIS, R. V. Evaluation of the main methodologies applied to microbiological analysis of water for human consumption aimed at detecting total and thermotolerant coliforms. **Scientific Journal of the Faculty of Education and Environment**, v. 62, n. 2, p. 49-64, 2015.

HAMED, S. B. *et al.* Fish pathogen bacteria: Adhesion, parameters influencing virulence and interaction with host cells. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 80, p. 550-562, 2018.

KUBITZA, F. P.H.D. *et al.* Aquicultura no Brasil principais espécies, áreas de cultivo, rações, fatores limitantes e desafios. **Panorama da Aquicultura**, v. 25, p. 10-23, 2015.

LANZARIN, M. *et al.* Quantification of aerobic mesophilic heterotrophic microorganisms and occurrence of *Salmonella* spp. in hybrid "tambacu (*Piaractus mesopotamicus* x *Colossoma macropomum*), marketed in Cuiabá, Mato Grosso. **Biosphere Encyclopedia**, v.8, n.15, p. 1500-1509, 2012.

LINGAMMA, V. P.; NIVEDITHA, S. A review: detection of *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal Pharmaceutical Pharmaceutical Science Research**, v. 4, p. 49-52, 2014.

LORENZON, C. S. *et al.* Perfil microbiológico de peixes e água de cultivo em pesque-pagues situados na região Nordeste do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 4, p. 617-624, 2010.

MACHADO, A. L. *et al.* Resistência antimicrobiana em linhagens de *Escherichia coli* de peixes marinhos vendidos na feira Mucuripe na cidade de Fortaleza-CE, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 41, n. 4, p. 931-943, 2016.

MUSOKE, D. *et al.* The role of environmental health in One Health: A Uganda perspective. **One Health**, v. 2, p.157-160, 2016.

NOVOSLAVSKIJ, A. M. *et al.* Major foodborne pathogens in fish and fish products: a review, **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 1-15, 2016.

OSMAN, G. A.; EL-KHATEEB, M. A. Impact of water contamination on tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish yield. **International Journal of ChemTech Research CODEN**, v.9, n. 12, p. 166-181, 2016.

PAIVA, S. K. M. *et al.* Survey of *Staphylococcus aureus* in Nile tilapia stored on ice. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 3, p. 239-242, 2012.

PEIXOTO, L. J. S. *et al.* *Aeromonas* spp.: virulence factors and resistance patterns to antimicrobial and heavy metals. **Archives of the Biological Institute**, v. 79, n. 3, p. 453-461, 2012.

R CORE TEAM. R 2017. **A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.** Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em: 15 dez. 2016.

ROCHA, F. A. G. *et al.* Coagulase positive staphylococci fillets in tilapia (*Oreochromis niloticus*) sold in the market Nerival Araújo, Corrais Novos/RN. **Holos**, v. 29, n. 1, p. 84, 2013.

RITTER, D. O. *et al.* qualidade bacteriológica de cacharas (*Pseudoplatystoma fasciatum*) provenientes de piscicultura. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n.15, p.1472-1480, 2012.

SAMOCHA, T. M. *et al.* Substitution of fish meal by co-extruded soybean poultry by-product meal in practical diets for the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 231, n. 1-4, p. 197-203, 2004.

SANTOS, D. M. S. *et al.* Microbiological water quality and histopathology of fish gills from fish farms in the municipality of Itapecuru-Mirim, State of Maranhão. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v. 34, n. 2, p. 199-205, 2012.

SAXENA, T.; KAUSHIK, P.; MOHAN, M. K. Prevalence of *E. coli* O157:H7 in water sources: an overview on associated diseases, outbreaks and detection methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 82, n. 2, p. 249-264, 2015.

SILVA, J. L. S. D. *et al.* Aquatic microbiota diversity in the culture of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using bioflocs or periphyton: virulence factors and biofilm formation. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, v. 38, n. 3, p. 233-241, 2016.

SILVA, N. *et al.*, **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**, 4. ed., São Paulo: Ed. Varela, 2010.

SUDHA RANI, P. *et al.* Perennial occurrence of heterotrophic, indicator and pathogenic bacteria in the coastal Bay of Bengal (off Visakhapatnam) - Impact of physical and atmospheric processes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 127, p. 412-423, 2018.

VOLKWEIS, D. S. H. *et al.* Microbiological quality of water used in food production by family agribusinesses in the city of Constantina/RS. **Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology (REGET)**, v. 19, n. 4, p. 18-26, 2015.

WANG, L. *et al.*, Prevalence, antimicrobial resistance and multiple locus variable number tandem repeat analysis profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from different retail foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 249, p. 44-52, 2017.

**Degradação de azo corantes por leveduras**



Tiago Araújo Pinho Alcântara  
Elina Isaque Delane  
Liliane Andrade Sande da Silva  
Márcia Luciana Cazetta

A poluição dos corpos hídricos é uma das maiores preocupações ambientais da humanidade neste século. Os efluentes industriais contendo corantes, especialmente da indústria têxtil, são um dos principais problemas devido à natureza recalcitrante e tóxica de muitas destas substâncias.

Os corantes industriais são compostos de estrutura sintética e aromática capazes de conferir cor a diferentes tipos de substratos, possibilitando sua utilização em variados setores industriais. Dentre eles, os azocorantes são os mais utilizados (aproximadamente 10 milhões de toneladas/ano) e também um dos mais tóxicos, com propriedades carcinogênicas, mutagênicas e genotóxicas (SATHIYA *et al.*, 2007; RAUF; ASHARE, 2012; RAWAT *et al.*, 2016; RAWAT *et al.*, 2018).

Métodos físico-químicos são os mais utilizados no tratamento de corantes, porém, com baixa eficiência, já que costumam apresentar alto custo e não são capazes de degradar completamente as moléculas, gerando uma parcela significativa de lodo químico, o que resulta em um segundo problema de poluição, a disposição final do resíduo (BAFANA *et al.*, 2011; SEN *et al.*, 2016).

As pesquisas com métodos biológicos (biorremediação) empregando microrganismos para tratamento de efluentes contendo corantes são crescentes por serem considerados ecologicamente corretos, apresentarem custo mais competitivo, menor produção de lodo, além de ser possível a obtenção de produtos finais de baixa toxicidade e, até mesmo, a degradação completa (mineralização) (RAWAT *et al.*, 2016; VARJANI *et al.*, 2020). Por isso, a cada dia, diversos microrganismos vêm sendo selecionados para a otimização e desenvolvimento de novos tratamentos.

Devido ao seu aparato enzimático, os fungos apresentam um grande potencial na descoloração de corantes do tipo azo. Por meio do seu sistema enzimático-oxidativo e ligninolítico não específico, estes microrganismos são capazes de degradar diferentes tipos de corantes sintéticos (MORTARELL *et al.*, 2012; SEN *et al.*, 2016). Dentre os fungos, as leveduras apresentam diversas vantagens biotecnológicas e vem se mostrando muito eficientes na descoloração de azocorantes, não somente pelo rápido crescimento, mas por serem resilientes em ambientes desfavoráveis (YANG *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2011; PAJOT *et al.*, 2011; MARTORELL *et al.*, 2012).

Diante deste contexto, essa breve revisão traz informações sobre os azocorantes, sua toxicidade, bem como os mecanismos e fatores físico-químicos que influenciam na sua degradação por leveduras.

### **Azocorantes: estrutura e toxicidade**

Os corantes têxteis são classificados de acordo com sua estrutura química como: ácidos, básicos, dispersos, azoicos, diazoicos, metalizados e reativos (CATANHO *et al.*, 2006). Dentre esses diferentes tipos, os corantes do tipo azo constituem a classe mais utilizada, correspondendo a mais de 70% da demanda industrial global, sendo extensivamente utilizados na indústria têxtil, de cosméticos, medicamentos, papel e alimentos (TONY *et al.*, 2009; RAWAT *et al.*, 2016; VARJANI *et al.*, 2020). Isso ocorre devido à facilidade de síntese, custo-benefício, estabilidade e variedade estrutural, o que confere a esse tipo de corante uma diversa gama de cores (BAFANA *et al.*, 2011).

Os azocorantes são caracterizados pela presença de um ou mais agrupamentos azo (-N=N-), podendo ser classificados como monoazo, diazo, triazo e poliazo (BAFANA *et al.*, 2011). Estão ligados a anéis aromáticos, como os compostos benzidina, naftaleno, bem como outros compostos heterocíclicos aromáticos e alifáticos, o que contribui para a natureza xenobiótica destes compostos, dificultando muito sua degradação. Por isso, os azocorantes são considerados

perigosos e notórios poluentes ambientais e sua completa degradação é de grande interesse e amplamente estudada (CUBAS *et al.*, 2020).

Entretanto, sua toxicidade não é atribuída somente ao corante propriamente dito, mas também aos produtos da sua degradação. A ligação azo é a porção da molécula mais propensa à hidrólise por mecanismos enzimáticos microbianos, possibilitando a liberação de aminas aromáticas, derivados da benzidina como dimetil-benzidina e dimetoxi-benzidina, e outros compostos com elevada toxicidade (aguda e crônica), carcinogenicidade e mutagenicidade (BAFANA *et al.*, 2011; RAWAT *et al.*, 2018; VIRJANI *et al.*, 2020). Deve-se considerar, também, as interações entre corantes quimicamente diversos com a diversidade metabólica microbiana, produzindo metabólitos de toxicidade variada sob diferentes condições ambientais (RAWAT *et al.*, 2016).

Os seres humanos são expostos a aminas aromáticas derivadas de corantes de diversas formas. Corantes do tipo azo presentes nos produtos alimentícios ou têxteis, podem ser metabolizados pela microbiota intestinal ou da pele, levando à exposição às aminas tóxicas. Stingley *et al.* (2010) demonstraram que as bactérias da pele podem reduzir os corantes Vermelho de Metila e Alaranjado II, liberando aminas aromáticas. Da mesma forma, Xu *et al.* (2010) demonstraram a capacidade de redução de alguns corantes por bactérias do cólon humano formando aminas potencialmente tóxicas. Além disso, um estudo mostrou atividade mutagênica em água para beber, na qual foi detectada a contaminação por efluentes têxteis contendo azocorantes (ALVES DE LIMA *et al.*, 2007).

Em função disso, para que a biorremediação de ambientes contaminados com corantes seja considerada eficiente, não basta que ocorra a diminuição da intensidade ou desaparecimento da cor, é necessário que haja redução da toxicidade dos efluentes para níveis aceitáveis (SALAS-VEIZAGA *et al.*, 2013). Uma vez que os efluentes são descartados nos corpos d'água, diversos estudos de ecotoxicidade

utilizando organismos marinhos como indicadores precisam ser realizados para determinar a real toxicidade dos corantes e seus metabólitos, pois muitas vezes, os produtos da degradação são mais tóxicos do que o próprio corante (RAWAT *et al.*, 2018).

Rawat *et al.* (2016) alertam que a maioria dos trabalhos sobre degradação de corantes considera apenas o desaparecimento da cor e não realiza testes ambientais para determinar se os produtos da degradação apresentam toxicidade. Novotný *et al.* (2006), entretanto, estudaram a toxicidade de azocorantes em diversos microrganismos, mostrando inibição da luminescência de *Vibrio fischeri* e do crescimento da microalga *Selenastrum capricornutum*, sendo que os efeitos tóxicos foram atribuídos às aminas aromáticas produzidas pela degradação das moléculas. Essas aminas se mostraram muito tóxicas, também, para organismos aquáticos como dáfnias, peixes e moluscos (RAMOS *et al.*, 2002).

Em trabalho usando plantas como indicadoras, Prasad e Rao (2013) observaram o efeito negativo do corante Vermelho Direto 22 sobre a germinação de leguminosas (*Vigna mungo* e *V. radiata*) e sorgo (*Sorghum bicolor*), além da redução do índice mitótico em bulbos de cebola (*Allium cepa*).

Alcântara *et al.* (2017) também observaram aumento da toxicidade após a degradação do azo corante Alaranjado G pela levedura *Candida cylindraceae* SJL6, cujos testes de toxicidade com bulbos de cebola apresentaram aberrações cromossômicas, bem como elevada mortalidade nos testes com o microcrustáceo artemia (*Artemia salina*).

Entretanto, as pesquisas mostram um comportamento variado entre as espécies de leveduras. Silva (2015), estudando a biodegradação do azo corante Alaranjado G por *Candida* sp. e *Pichia kudriavzevii* observaram, em testes com artemia e com sementes de alface (*Lactuca sativa*), uma diminuição da toxicidade após a degradação.

Silva *et al.* (2017) estudando a toxicidade dos produtos de degradação do corante Azul Brilhante de Remazol por cinco leveduras

isoladas de moluscos bivalves de água doce, observaram que, para três dos isolados, a toxicidade se elevou de tal maneira que não foi possível medir a concentração letal, pois a toxicidade dos produtos da degradação foi muito maior do que o corante. Entretanto, duas outras cepas apresentaram diminuição da toxicidade após os testes com artemia.

Tan *et al.* (2016), Song *et al.* (2017) e Guo *et al.* (2019) também descreveram a diminuição da toxicidade após degradação de azocorantes pelas leveduras *Scheffersomyces spartinae* TLHS-SF1, *Pichia occidentalis* G1 e *Galactomyces geotrichum* GG, respectivamente. Da mesma forma, Delane *et al.* (2020) relataram a diminuição da toxicidade em testes com artemia e sementes de alface após biodegradação do corante Preto Reativo 5 pela levedura *Pichia kudriavzevii* SD5, isolada de tecido intervalval do molusco *Mytela guianensis*.

Para algumas leveduras, o tempo de cultivo também influenciou na toxicidade, sendo que para algumas espécies o aumento do tempo de cultivo diminuiu a toxicidade (SILVA, 2015; DELANE *et al.*, 2020) e para outras a toxicidade se elevou ainda mais (SILVA *et al.*, 2017). O tempo de exposição ao corante e seus metabólitos pode fazer com que as enzimas microbianas tenham mais tempo para degradar os produtos tóxicos produzidos pela hidrólise da molécula do corante ou, ao contrário, produzam mais metabólitos tóxicos ao longo do tempo.

Por isso, a associação de diferentes microrganismos em co-cultura pode ser uma alternativa para a completa mineralização de moléculas de difícil degradação e que geram compostos tóxicos, bem como para aumentar a estabilidade diante das flutuações ambientais. Ali *et al.* (2020) descreveram que o consórcio entre três leveduras, *Yarrowia sp.*, *Barnettozyma californica* e *Sterigmatomyces halophilus* foi bem sucedido na degradação e mineralização de azocorantes, devido à indução de azorredutases produzidas pelas interações metabólicas coordenadas das leveduras, com produção de substâncias atóxicas no final do processo.

## Mecanismos de biodescoloração

Espécies de leveduras com origens distintas apresentam diferentes potenciais de descoloração, com significativa vantagem em relação às bactérias e fungos filamentosos, uma vez que apresentam rápido crescimento como as bactérias e, como os fungos filamentosos, possuem enzimas inespecíficas que lhes conferem a capacidade de biodescoloração de corantes sintéticos, além de agirem como adsorventes, em alguns casos (YU; WEN, 2005; MORTARELL *et al.*, 2012; MAHMOUD *et al.*, 2016).

Os mecanismos de descoloração por leveduras envolvem bioadsorção (ou bioissorção), degradação enzimática ou a combinação de ambos (SEN *et al.*, 2016). A bioissorção é um processo que independe do metabolismo, podendo ser definida como a ligação do soluto à biomassa por meio de um processo que não envolve transporte ativo com gasto de energia metabólica, embora cada processo possa ocorrer simultaneamente quando biomassa viva é utilizada (TOBIN *et al.*, 1994; FU; VIRARAGHAVAN, 2001). A capacidade de bioissorção de um microrganismo é atribuída aos componentes da parede celular, que contêm diferentes grupos funcionais como aminas, carboxilas, hidroxilas, fosfatos e outros grupos carregados, capazes de causar uma forte atração entre o corante e a parede da célula (VITOR; CORSO, 2008).

Entretanto, embora eficiente na descoloração, esse processo gera um acúmulo de biomassa e formação de lodo que, posteriormente, necessitará de um destino final, provocando um segundo problema de poluição (KAUSHIK; MALIK, 2009; BAFANA *et al.*, 2011). Por isso, a bioprospecção e o estudo da descoloração por leveduras focados na biodegradação, especialmente na mineralização, são os principais objetivos.

A biodegradação de corantes industriais é um processo dependente de energia e envolve a hidrólise das moléculas, podendo ocorrer por vias aeróbicas e anaeróbicas (SOLÍS *et al.*, 2012; SEN *et al.*, 2016). Entretanto, a maioria das leveduras realiza a descoloração por

meio da degradação enzimática na presença de oxigênio e, em virtude disso, são muito mais comuns os processos realizados com agitação. A agitação aumenta a transferência de massa, oxigênio e nutrientes, entre as células e o meio de cultura, acelerando o processo de degradação. Para a completa mineralização de azocorantes, as condições aeróbicas são preferidas e, mesmo nos processos anaeróbicos, o oxigênio é necessário, ainda que em pequena quantidade, para a regeneração dos cofatores enzimáticos (NADH e NADPH) e das enzimas oxidativas envolvidas no processo (PANDEY *et al.*, 2007; RAMALHO *et al.*, 2004; RAUF; ASHARE, 2012; SOLÍS *et al.*, 2012; SEN *et al.*, 2016; KIYAI *et al.*, 2019).

Os fungos possuem um aparato enzimático diverso e capaz de degradar compostos orgânicos complexos, constituído por enzimas ligninolíticas extracelulares inespecíficas que podem degradar moléculas xenobióticas como os corantes (SEN *et al.*, 2016). Para as leveduras, as principais enzimas descritas na degradação de azocorantes são: lacase (Lac), lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP), diclorofenol-indofenol redutase (NADH-DCIP), tirosinases (Tyr), azorredutases e aminopirina N-desmetilase, sendo que a contribuição dessas enzimas na degradação de azocorantes pode diferir para cada espécie (Tabela 1).

**Tabela 1.** Leveduras e condições físico-químicas/ biológicas na degradação de azocorantes.

Espécie	Condições e enzimas	Corante, concentração e descoloração (%)	Referências
<i>Candida oleophila</i>	Aerobiose; 26 °C, glicose 0,5%; Lac, MnP	Preto Reativo 5 (200 ppm), 100%	Lucas <i>et al.</i> , 2006
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Anaerobiose; pH 6, 30 °C, 16 min; LiP, NADH-DCIP redutase, Tyr, azorredutase	Vermelho de Metila (100 ppm), 100%	Jadhav <i>et al.</i> , 2007

<i>Galactomyces geotrichum</i>	Aerobiose; pH 3, 30 °C, 1 h; Lac, Lip, NADH-DCIP redutase	Vermelho de Metila (100 ppm), 100%	Jadhav <i>et al.</i> , 2008
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	Aerobiose; 28 °C, glicose 1%, 24 h; MnP	Preto Reativo 5 (200 ppm), 100%	Yang <i>et al.</i> , 2008
<i>Candida tropicalis</i>	Aerobiose; 28 °C, glicose 1%, 24 h; MnP	Preto Reativo 5 (200 ppm), 100%	Yang <i>et a.</i> , 2008
<i>Candida rugopelliculosa</i>	Anaerobiose; pH 4-5, 28 °C, glicose 0,5%, 48 h	Azul Reativo 13 (50 ppm), 90%	Liu <i>et al.</i> , 2011
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Aerobiose; 25 °C, glicose 2%, 36 h	Azul RR-BB (200 ppm), 97%;	Pajot <i>et al.</i> , 2011
<i>Trichosporon akiyoshidainum</i>	Aerobiose; 25 °C, glicose 2%, 36 h	Azul RR-BB (200 ppm), 91%; Vermelho 7B-HE (200 ppm), 95%	Pajot <i>et al.</i> , 2011
<i>Galactomyces geotrichum</i>	Aerobiose; pH 7, 30 °C, 24 h, glicose 0,5%; NADH-DCIP redutase, Lac	Mistura de vários corantes (70 ppm), 88%	Waghmode <i>et al.</i> , 2011
<i>Williopsis californica</i>	Aerobiose; 25 °C, glicose 2%, 72 h; MnP, Tyr	Preto B-V (200 ppm), 86%	Martorell <i>et al.</i> , 2012
<i>Williopsis saturnus</i>	Aerobiose; 25 °C, glicose 2%, 72 h; MnP, Tyr	Amarelo 4R-HE (200 ppm), 90%; Preto B-V (200 ppm), 91%	Martorell <i>et al.</i> , 2012
<i>Candida.sp.</i>	Aerobiose; 25 °C, glicose 2%, 72h; MnP, Tyr	Preto B-V (200 ppm), 96%	Martorell <i>et al.</i> , 2012
<i>Trichosporon porosum</i>	Aerobiose; 25°C, glicose 2%, 72 h; MnP, Tyr	Preto B-V (200 ppm), 95%; Vermelho 7B-HE, 91%	Martorell <i>et all.</i> , 2012
<i>Pichia sp.</i>	Aerobiose; 30°C, glicose 1%, 10 h	Vermelho Acido B (100 ppm), 90%	Qu <i>et al.</i> , 2012
<i>Issatchenkia orientalis</i>	Aerobiose; pH 7, 32 °C; glicose 1%, 18 h	Preto Reativo 5 (200 ppm) 98%	Jafari <i>et al.</i> , 2014
<i>Candida tropicalis</i>	Aerobiose; pH 4-6, 35 °C, glicose 0,4-1%, 24 h	Acido Brillhante Escarlatet GR (100 ppm), 100%	Tan <i>et al.</i> , 2013



<i>Magnusiomyces ingens</i>	Aerobiose; células imobilizadas, pH 5-7, 30 °C, glicose 0,4%, 7 h	Vermelho Acido B (300 ppm), 100%	Tan <i>et al.</i> , 2014
<i>Scheffersomyces spartinae</i> TLHS-SF1	Aerobiose, 30 °C, 160 rpm, sacarose 0,2%, pH 5-6, 16 h	Vermelho Escarlata 3R (80 ppm), >90%	Tan <i>et al.</i> , 2016
<i>Pichia occidentalis</i> G1	Aerobiose, 30 °C, 160 rpm, pH 5, NADH-DCIP redutase, LiP, MnP, glicose 2%, 20-36 h	Vermelho Ácido B (100-600 ppm), >90%	Song <i>et al.</i> , 2017
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC9763	Aerobiose, 30 °C, 180 rpm, glicose 2% e sacarose, 7 h	Carmoisina (50 ppm), >80%	Kiyai <i>et al.</i> , 2019
<i>Galactomyces geotrichum</i> GG	Aerobiose, 30 °C, 180 rpm, pH 7-8, glicose 0,2%, NADH-DCIP redutase, LiP e Lac, 10 h	Vermelho Escarlata GR (100 ppm), >92%	Guo <i>et al.</i> , 2019
<i>Candida tropicalis</i> SYF1	Aerobiose, 30 °C, 160 rpm, glicose 0,4%, LiP, Lac, 12 h	Vermelho Ácido B, (50 ppm), >95%	Tan <i>et al.</i> , 2020

## Fatores físico-químicos e biodegradação

A eficiência dos processos de biodegradação de corantes é fortemente influenciada por vários fatores físico-químicos do meio. Dentre os principais fatores estão as fontes de carbono e nitrogênio, concentração do corante, temperatura e pH.

## Fontes de carbono e nitrogênio

As diferentes características metabólicas microbianas explicam as diferenças na utilização das fontes de carbono, afetando a descoloração dos corantes, que está bastante associada com o processo de crescimento das leveduras e seu metabolismo primário (LUCAS *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2008; MARTORELL *et al.*, 2012). Embora Pajot *et al.* (2011) e Martorell *et al.* (2012) tenham proposto que leveduras oligotróficas com alto potencial

de descoloração podem crescer em meio contendo apenas o corante como fonte de carbono e energia, geralmente, as leveduras não crescem sem uma fonte de carbono que seja facilmente metabolizada (YANG *et al.*, 2008; SOLÍS *et al.*, 2012; TAN *et al.*, 2013; JAFARI *et al.*, 2014).

Além disso, os azocorantes são deficientes em carbono, portanto, a biodegradação sem uma fonte alternativa de energia é muito difícil (ASGHER *et al.*, 2008; TONY *et al.*, 2009). Portanto, na maior parte dos casos, células de leveduras não crescem sem glicose ou qualquer outra fonte de carbono facilmente metabolizável, uma vez que, além de ser importantes fontes de energia para o crescimento e manutenção celular, atuam como doadores de elétrons para a hidrólise das ligações azo (YEMENDZHIEV *et al.*, 2009; SOLÍS *et al.*, 2012). O comportamento de leveduras isoladas de moluscos bivalves confirmou essas observações, uma vez que a degradação do corante ocorreu somente na presença de glicose, em concentrações que variaram entre 0,5 e 1%. Aumentos progressivos na concentração de glicose não influenciaram na taxa de descoloração (SILVA 2015; SILVA *et al.*, 2017; ALCÂNTARA *et al.*, 2017). Entretanto, a concentração da fonte de carbono deve ser cuidadosamente dosada, pois, tanto a falta quanto o excesso podem diminuir o processo de descoloração, como observado por Tan *et al.* (2016). Geralmente, quando as fontes orgânicas externas de carbono estão em excesso podem ser utilizadas preferencialmente pelos microrganismos, em detrimento dos corantes (QU *et al.*, 2012).

A glicose é a fonte de carbono mais citada nos trabalhos de degradação de corantes por leveduras (Tabela 1), embora também seja descrito o uso de sacarose, maltose, amido, bem como algumas fontes de origem agroindustrial como melão de cana-de-açúcar e, até mesmo, material lignocelulósico como cascas e bagaços vegetais (serragem, casca de soja, palha de arroz, bagaço e caule de milho, bagaço de cana) (JIN *et al.*, 2007; TONY *et al.*, 2009; CHARUMATHI; DAS, 2010; PONRAJ *et al.*, 2011; DAS *et al.*, 2011; SONG *et al.*, 2017; ALI *et al.*, 2020; KIYAI *et al.*, 2019).

As fontes de nitrogênio também são essenciais nos processos

de degradação de corantes. Diferentes fontes de nitrogênio foram responsáveis por aumentos consideráveis na descoloração de corantes para diferentes microrganismos, especialmente as fontes orgânicas como peptona, extrato de carne, com destaque para o extrato de levedura, que é o mais utilizado (MOOSVI *et al.*, 2007; SONG *et al.*, 2017; KIYAI *et al.*, 2019). Como a biodegradação de corantes está associada ao crescimento, as fontes de nitrogênio são essenciais para a manutenção do metabolismo celular, contribuindo para o aumento das taxas de biodegradação. O extrato de levedura, além de ser fonte de nitrogênio, também contribui para o suprimento de outros fatores de crescimento como vitaminas e aminoácidos essenciais. Alguns fungos, inclusive, não conseguem produzir algumas enzimas, como lignina peroxidase, na ausência de uma fonte orgânica de nitrogênio (EL-RAHIM *et al.*, 2017). Entretanto, sua utilização deve ser cuidadosamente estudada, uma vez que podem atrapalhar o processo de descoloração. A peptona, por exemplo, pode agir como um aceptor de elétrons em condições anaeróbicas e competir pelos elétrons das azorredutases (doadores de elétrons), afetando negativamente o processo de descoloração (INRAM *et al.*, 2015).

Fontes inorgânicas de nitrogênio também são utilizadas, embora quase sempre associadas com fontes orgânicas, e a mais citada é o sulfato de amônio (TAN *et al.*, 2016; SONG *et al.*, 2017; GUO *et al.*, 2019; TAN *et al.*, 2019). Essa associação pode ser bastante interessante, uma vez que as fontes inorgânicas fornecem nitrogênio e as fontes orgânicas fornecem, além de nitrogênio na forma de aminoácidos essenciais, também vitaminas e minerais que atuam como cofatores enzimáticos, de modo que se complementam, melhorando a degradação dos corantes.

### **Concentração do corante**

A degradação microbiana é muito afetada pela concentração do corante. Diversos autores relataram que o aumento da concentração

reduziu gradualmente a taxa de descoloração, provavelmente em função da toxicidade dos corantes e/ou dos metabólitos resultantes da biodegradação (YU; WEN, 2005; WANG *et al.*, 2009; QU *et al.*, 2012; TAN *et al.*, 2013; GUO *et al.*, 2019).

As leveduras apresentaram comportamento variado com relação à concentração dos corantes (Tabela 1). Silva *et al.* (2017) descreveram elevada taxa de descoloração (acima de 70%) até, no máximo 100 ppm do corante Azul Brilhante de Remazol. A levedura *C. cylindracea* SJL6, apresentou taxa de descoloração acima de 90% até 500 ppm do corante Alaranjado G (ALCÂNTARA *et al.*, 2017). Para o mesmo corante, *Candida* sp. e *P. kudriavzevii* apresentaram elevadas taxas de descoloração entre 50 ppm e 100 ppm, respectivamente. Por outro lado, *P. kudriavzevii* SD5 apresentou descoloração em concentrações acima de 90% do corante Preto Reativo cinco até 850 ppm e em torno de 60% a 1000 ppm (DELANE *et al.*, 2020). Leveduras que resistam a elevadas concentrações de corantes são as mais procuradas, pois os efluentes industriais apresentam variados níveis de concentração de corantes quando lançados no meio ambiente.

## **pH e temperatura**

Com relação ao pH e temperatura, a maioria dos trabalhos descreve que valores de pH ácidos e temperaturas na faixa mesófila, variando entre 25 - 37 °C, são as melhores condições para a descoloração por leveduras (Tabela 1). Essas características estão associadas às condições ótimas para produção e atividade das enzimas envolvidas nos processos bioquímicos de degradação e no crescimento celular. É bem conhecido que o crescimento ótimo de fungos, de maneira geral, e a máxima atividade de enzimas ligninolíticas, que são muito associadas à descoloração de azocorantes, são observados em condições de baixo pH (SHAH; PATEL, 2014; SEN *et al.*, 2016). Além disso, o pH pode influenciar na solubilidade em água dos corantes, afetando o processo de descoloração, como descrito por Guo *et al.* (2019) para o corante

Ácido Escarlata GR. Para a maioria das leveduras isoladas dos moluscos bivalves do Rio Subaé, Bahia, as melhores taxas de descoloração ocorreram na faixa ácida de pH, entre 3 e 6, e temperaturas entre 20 a 35 °C (SILVA, 2015; SILVA *et al.*, 2017; ALCÂNTARA *et al.*, 2017). Entretanto, uma exceção a esse comportamento foi observada para *P. kudriavzevii* SD5 que continuou apresentando elevadas taxas de descoloração (acima de 90%) até 45 °C, sendo classificada como uma espécie termotolerante (SILVA, 2015; DELANE *et al.*, 2020). Microrganismos resilientes ao aumento da temperatura são interessantes para aplicação em processos de biorremediação de efluentes, uma vez que suportam melhor a variação de temperatura encontrada nos ambientes naturais ou tanques de tratamento.

### **Perspectivas futuras**

O desenvolvimento de tecnologias eficazes e sustentáveis para o tratamento de efluentes contendo corantes ainda é um desafio. As leis estão se tornando mais rígidas e as indústrias precisam, se adequar às novas legislações. O uso excessivo de água é um problema que vem sendo trabalhado por diversas indústrias atualmente, incluindo as têxteis, entretanto, a utilização e descarte dos azocorantes continuam sendo um grande problema ambiental. Portanto, novas metodologias precisam ser desenvolvidas para tratar o problema.

O isolamento de novos microrganismos e enzimas para fins de biorremediação, bem como o uso de consórcios microbianos, podem ser conjugados com métodos físico-químicos ou processos avançados de oxidação para reduzir problemas secundários de poluição. Além disso, conhecer os mecanismos biológicos e bioquímicos envolvidos no processo de biodescoloração fornecem dados para o desenvolvimento de azos corantes que sejam mais suscetíveis aos tratamentos dos efluentes.

## Referências

ALCÂNTARA, T. A. P.*et al.* Aerobic decolorization of azo dye orange g by a new yeast isolate *Candida cylindracea* SJL6. **Bioscience Journal**, v. 33, n. 5, p. 1340-1350, sept., 2017.

ALI, S. S.*et al.* Construction of a new lipase- and xylanase-producing oleaginous yeast consortium capable of reactive azo dye degradation and detoxification. **Bioresource Technology**, v.313, 123631, oct., 2020. doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123631

ALVES DE LIMA, R. O.*et al.* Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 626, n. 1, p. 53-60, jan., 2007. doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.08.002

ASGHER, M.*et al.* Optimization of medium for decolorization of Solar golden yellow R direct textile dye by *Schizophyllum commune* IBL-06. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 61, n. 2, p. 189-193, mar., 2008. doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.07.009

BAFANA, A.; DEVI, S. S.; CHAKRABARTI, T. Azo dyes: past, present and the future. **Environmental Reviews**, v. 19, n. NA, p. 350-371, sep., 2011. doi.org/10.1139/a11-018

CATANHO, M.; MALPASS, G. R. P.; MOTHEO, A. J. Avaliação dos tratamentos eletroquímico e fotoeletroquímico na degradação de corantes têxteis. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 983-989, 2006.

CHARUMATHI, D.; DAS, N. Bioaccumulation of synthetic dyes by *Candida tropicalis* growing in sugarcane bagasse extract medium. **Advances in Biological Research**, v. 4, n. 4, p. 233- 240, 2010.

CUBAS, P. J.*et al.* Synthesis of  $\text{CuCr}_2\text{O}_4$  by self-combustion method and photocatalytic activity in the degradation of azo dye with visible

light. **Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry**, v. 401, 112797, oct., 2020. doi.org/10.1016/j.jphotochem.2020.112797

DAS, D.; CHARUMATHI, D.; DAS, N. Bioaccumulation of the synthetic dye Basic Violet 3 and heavy metals in single and binary systems by *Candida tropicalis* grown in a sugarcane bagasse extract medium: Modelling optimal conditions using response surface methodology (RSM) and inhibition kinetics. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, n. 2, p. 1541-1552, feb., 2011. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.12.038

DELANE, E. I.; EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; CAZETTA, M. L. Levedura *Pichia kudriavzevii* SD5 como biocatalizador na descoloração do corante Preto Reativo 5. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 25, n. 2, p. 361-369, mar./apr., 2020. doi.org/10.1590/s1413-41522020182911

EL-RAHIM, W. M. A. *et al.* Optimization of conditions for decolorization of azo-based textile dyes by multiple fungal species. **Journal of Biotechnology**, v. 260, p. 11-17, oct., 2017. doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.08.022

EVANGELISTA-BARRETO, N. S. *et al.* Cometabolic decolorization of the reactive azo dye orange II by *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986. **Textile Research Journal**, v. 79, n. 14, p. 1266-1273, 2009. doi.org/10.1177/0040517508087858

FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. **Bioresource technology**, v. 79, n. 3, p. 251-262, 2001. doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00028-1

GUO, G. *et al.* Aerobic decolorization and detoxification of Acid Scarlet GR by a newly isolated salt-tolerant yeast strain *Galactomyces geotrichum* GG. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 145, p. 104818, nov., 2019. doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104818

IMRAN, M. *et al.* Microbial biotechnology for decolorization of textile wastewaters. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 14, p. 73-92, 2015.

JADHAV, J. P. *et al.* Decolourization of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. **Chemosphere**, v. 68, n. 2, p. 394-400, 2007. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.12.087

JADHAV, S. U.; KALME, S. D.; GOVINDWAR, S. P. Biodegradation of Methyl Red by *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, n. 2, p. 135-142, sep., 2008. doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.12.010

JAFARI, N.; SOUDI, M. R.; KASRA-KERMANSHAHI, R. Biodecolorization of textile azo dyes by isolated yeast from activated sludge: *Issatchenkia orientalis* JKS6. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 475-482, 2014.

JIN, X. C. *et al.* Decolorization of a dye industry effluent by *Aspergillus fumigatus* XC6. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 1, p. 239-243, feb., 2007.

KAUSHIK, P.; MALIK, A. Fungal dye decolourization: recent advances and future potential. **Environment International**, v. 35, n. 1, p. 127-141, jan., 2009. doi: 10.1016/j.envint.2008.05.010

KHOUNI, I.; MARROT, B.; AMAR, R. Treatment of reconstituted textile wastewater containing a reactive dye in an aerobic sequencing batch reactor using a novel bacterial consortium. **Separation and Purification Technology**, v. 87, p. 110-119, mar., 2012. doi.org/10.1016/j.seppur.2011.11.030

KIAYI, Z. *et al.* Microbial degradation of azo dye carmoisine in aqueous medium using *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. **Journal of Hazardous Materials**, v. 373, p. 608-619, jul., 2019. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.03.111

LIU, X. *et al.* Biochemical degradation pathway of reactive blue 13 by *Candida rugopelliculosa* HXL-2. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 135-141, jan., 2011. doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.10.005

LUCAS, M. S. *et al.* Biodegradation of the diazo dye Reactive Black 5 by a



wild isolate of *Candida oleophila*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 1, p. 51-55, jun., 2006. doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.09.004

MAHMOUD, M. S. Decolorization of certain reactive dye from aqueous solution using Baker's Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strain. **Housing and Building National Research Center Journal**. v. 12, n. 1, p. 88-98, apr., 2016. doi.org/10.1016/j.hbrcj.2014.07.005

MARTORELL, M. M.; PAJOT, H. F.; DE FIGUEROA, L. I. C. Dye-decolourizing yeasts isolated from Las Yungas rainforest. Dye assimilation and removal used as selection criteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 66, n. 1, p. 25-32, jan., 2012. doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.10.005

MOOSVI, S.; KHER, X.; MADAMWAR, D. Isolation, characterization and decolorization of textile dyes by a mixed bacterial consortium JW-2. **Dyes and Pigments**, v. 74, n. 3, p. 723-729, 2007. doi.org/10.1016/j.dyepig.2006.05.005

NOVOTNÝ, C. *et al.* Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo- and anthraquinone dyes. **Chemosphere**, v. 63, n. 9, p. 1436-1442, jun., 2006. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.10.002

PAJOT, H. F. *et al.* Unraveling the decolourizing ability of yeast isolates from dye-polluted and virgin environments: an ecological and taxonomical overview. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 3, p. 443-456, mar., 2011. doi: 10.1007/s10482-010-9495-4

PANDEY, A., SINGH, P., IYENGAR, L. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, n. 2, p. 73-76, jan., 2007. doi: 0.1016/j.ibiod.2006.08.006

PONRAJ, M.; JAMUNARANI, P.; ZAMBARE, V. Isolation and optimization of culture conditions for decolorization of true blue using dye decolorizing fungi. **Asian Journal of Experimental Biological Sciences**, v. 2, n. 2, p. 270-76, 2011.

PRASAD, A. A. S.; RAO, B. K. V. Aerobic biodegradation of azo dye by *Bacillus cohnii* MTCC 3616: an obligately alkaliphilic bacterium and toxicity evaluation of metabolites by different bioassay systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 16, p. 7469-7481, aug., 2013. doi: 10.1007/s00253-012-4492-3

QU, Y. *et al.* Aerobic decolorization and degradation of Acid Red B by a newly isolated *Pichia* sp. TCL. **Journal of Hazardous Materials**, v. 223, p. 31-38, jul., 2012. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.034

RAMALHO, P. A. *et al.* Characterization of azo reduction activity in a novel ascomycete yeast strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2279-2288, apr., 2004. doi: 10.1128/AEM.70.4.2279-2288.2004

RAMOS, E. U.; VAAL, M. A.; HERMENS, J. L. M. Interspecies sensitivity in the aquatic toxicity of aromatic amines. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 11, n. 3, p. 149-158, jul., 2002. doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00004-2

RAUF, M. A.; ASHRAF, S. S. Survey of recent trends in biochemically assisted degradation of dyes. **Chemical Engineering Journal**, v. 209, p. 520-530, oct., 2012. doi.org/10.1016/j.cej.2012.08.015

RAWAT, D.; MISHRA, V.; SHARMA, R. S. Detoxification of azo dyes in the context of environmental processes. **Chemosphere**, v. 155, p. 591-605, jul., 2016. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.068

RAWAT, D. *et al.* Ecotoxic potential of a presumably non-toxic azo dye. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.148, p. 528-537, feb., 2018. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.10.049

SALAS-VEIZAGA, D. M.; MORALES-BELPAIRE, I.; TERRAZAS-SILES, E. Evaluation of the genotoxic potential of Reactive Black 5 solutions subjected to decolorizing treatments by three fungal strains. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 9, p. 125-129, mar., 2013. doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.11.034

SATHIYA, M. *et al.* Decolorization of textile dyes and their effluents using white rot fungi. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 424-429, 2007.

SEN, S. K. *et al.* Fungal decolouration and degradation of azo dyes: A review. **Fungal Biology Reviews**, v. 30, n. 3, p. 112-133, jul., 2016. doi.org/10.1016/j.fbr.2016.06.003

SILVA, L. A. S. **Descoloração de corantes industriais por leveduras isoladas de moluscos do rio Subaé-Bahia**. 2015. 86 folhas. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2015.

SILVA, L. A. S. *et al.* Descoloração do corante Azul Brilhante de Remazol R por leveduras isoladas de moluscos do Rio Subaé, no estado da Bahia, Brasil. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 22, n. 6, p. 1065-1074, aug., 2017. doi.org/10.1590/s1413-41522017157568.

SHAH, M. P., PATEL, K. A. Microbial decolorization and degradation of remazol black & mordant orange by microbial consortia isolated from common effluent treatment plant. **International Journal of Environmental Biorremediation & Biodegradation**, v. 2, n. 3, p. 117-124, 2014. doi: 10.12691/ijebb-2-3-4

SOLÍS, M. *et al.* Microbial decolouration of azo dyes: a review. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1723-1748, dec., 2012. doi.org/10.1016/j.procbio.2012.08.014

SONG, L. *et al.* Performance of a newly isolated salt-tolerant yeast strain *Pichia occidentalis* G1 for degrading and detoxifying azo dyes. **Bioresource Technology**, v. 233, p. 21-29, jun., 2017. doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.065

STINGLEY, R. L. *et al.* Metabolism of azo dyes by human skin microbiota. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 108-114, jan., 2010. doi: 10.1099/jmm.0.012617-0

TAN, L. *et al.* Aerobic decolorization and degradation of azo dyes

by growing cells of a newly isolated yeast *Candida tropicalis* TL-F1. **Bioresource Technology**, v. 138, p. 307-313, jun., 2013. doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.183

TAN, L. *et al.* Aerobic decolorization and degradation of azo dyes by suspended growing cells and immobilized cells of a newly isolated yeast *Magnusiomyces ingens* LH-F1. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 321-328, apr., 2014. doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.063

TAN, L. *et al.* Aerobic decolorization, degradation and detoxification of azo dyes by a newly isolated salt-tolerant yeast *Scheffersomyces spartinae* TLHS-SF1. **Bioresource Technology**, v. 203, p. 287-294, mar., 2016. doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.058

TAN, L. *et al.* Enhanced azo dye biodegradation performance and halotolerance of *Candida tropicalis* SYF-1 by static magnetic field (SMF). **Bioresource Technology**, v. 295, p. 122283, jan., 2020. doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122283

TOBIN, J. M.; WHITE, C.; GADD, G. M. Metal accumulation by fungi: applications in environmental biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 126-130, mar., 1994.

TONY, B. D.; GOYAL, D.; KHANNA, S. Decolorization of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 4, p. 462-469, jun., 2009. doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.01.003

VARJANI, S. *et al.* Microbial degradation of dyes: An overview. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 123728, oct., 2020. doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123728

VITOR, V.; CORSO, C. R. Decolorization of textile dye by *Candida albicans* isolated from industrial effluents. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 11, p. 1353-1357, nov., 2008. doi: 10.1007/s10295-008-0435-5

WAGHMODE, T. R.; KURADE, M. B.; GOVINDWAR, S. P. Time dependent

degradation of mixture of structurally different azo and non azo dyes by using *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 3, p. 479-486, jun., 2011. doi. org/10.1016/j.ibiod.2011.01.010

WANG, H. *et al.* Biological decolorization of the reactive dyes Reactive Black 5 by a novel isolated bacterial strain *Enterobacter* sp. EC3. **Journal of Hazardous Materials**, v. 171, n. 1-3, p. 654-659, nov., 2009. doi. org/10.1016/j.jhazmat.2009.06.050

XU, H. *et al.* Sudan azo dyes and Para Red degradation by prevalent bacteria of the human gastrointestinal tract. **Anaerobe**, v. 16, n. 2, p. 114-119, apr., 2010. doi: 10.1016/j.anaerobe.2009.06.007

YANG, Q. *et al.* Effects of glucose on the decolorization of Reactive Black 5 by yeast isolates. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, n. 1, p. 105-108, 2008. doi.org/10.1016/S1001-0742(08)60016-9

YEMENDZHIEV, H.; ALEXIEVA, Z.; KRASTANOV, A. Decolorization of synthetic dye Reactive Blue 4 by mycelial culture of white-rot fungi *Trametes versicolor*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, n. 3, p. 1337-1339, apr., 2009. doi: 10.1080/13102818.2009.10817665

YU, Z.; WEN, X. Screening and identification of yeasts for decolorizing synthetic dyes in industrial wastewater. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 56, n. 2, p. 109-114, 2005. doi. org/10.1016/j.ibiod.2005.05.006



# RNA interferente no controle de pragas

*Jonatha dos Santos Silva  
Layanna Rebouças de Santana Cerqueira  
Eduardo Chumbinho de Andrade*

Desde o surgimento da agricultura, diversas técnicas de manejos e tecnologias permitiram seu desenvolvimento e estabelecimento em altos níveis de produção. Entretanto, é evidente que a agricultura moderna ainda não atingiu seu potencial máximo de produção. Insetos, patógenos e plantas daninhas são os principais problemas fitossanitários responsáveis pelas perdas de rendimento. Para evitar maiores danos, os produtores dispõem de uma grande variedade de pesticidas sintéticos, sejam de ação de contato ou sistêmico. Entretanto, a baixa seletividade destes agroquímicos promove o aumento do custo ambiental, uma vez que pode eliminar a fauna benéfica ou favorecer o surgimento de populações de patógenos e insetos-praga resistentes. Além disso, o processo obtenção de novos pesticidas é cada vez mais caro e complexo, com custos que alcançam US\$ 250 milhões e pelo menos dez anos desde a descoberta da molécula até a liberação de um novo pesticida (BOREL, 2017).

Estratégias para proteção de culturas utilizando vias genéticas vêm sendo estudadas ao longo dos últimos anos e se mostram altamente promissoras. O mecanismo de RNA interferente (RNAi), descoberto no início dos anos 90, pode ser utilizado como uma eficiente ferramenta para o controle de pragas. O RNAi é ativado pela presença de uma molécula de RNA de fita dupla (dsRNA), e promove o silenciamento de RNAs mensageiros (mRNAs) homólogos (FIRE, 1998). A especificidade da sequência do dsRNA permite a possibilidade do silenciamento de genes que sejam críticos à sobrevivência do organismo alvo. Nesta tendência, a tecnologia de RNAi é uma das mais recentes apostas no campo de controle de pragas e conceitualmente se aproxima do pesticida “ideal”:

ele atinge apenas a praga alvo e possibilita um impacto mínimo sobre organismos não-alvo (polinizadores, parasitoides, predadores e vertebrados). Logo, desenvolvimento de medidas de controle via RNAi torna possível a produção de um produto à base de dsRNA, uma molécula orgânica e biodegradável, portanto com risco mínimo para a saúde humana e o meio ambiente. Como o dsRNA (considerado como o ingrediente ativo) é produzido enzimaticamente *in vitro* ou em sistema fermentativo (por bactérias), pode inclusive ser considerado como um “produto natural” (pesticida biológico) (ANDRADE; HUNTER, 2016).

Neste capítulo, vamos apresentar o mecanismo de RNAi, discutir seu potencial no controle de pragas, possíveis métodos de aplicação em uma abordagem não transformativa e técnicas de produção em larga escala de dsRNA.

### **RNA interferente - mecanismo**

O silenciamento de genes por RNA interferente (RNAi) é um processo natural que ocorre nas células eucarióticas, e está envolvido na atividade de regulação gênica e defesa antiviral celular. O fenômeno de silenciamento gênico foi observado pela primeira vez em 1990 por pesquisadores que buscavam alterar geneticamente a coloração de flores do gênero *Petunia*, inserindo uma cópia extra do gene da Chalcone sintase (CHS), responsável pela biossíntese de antocianinas (NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990). Entretanto, o que se obteve foram flores com diferentes padrões de variegação ou mesmo com nenhuma pigmentação (brancas). Foi constatado que a despigmentação estava relacionada à diminuição dos níveis do mRNA do CHS, tanto do gene endógeno quanto da cópia introduzida. Este fenômeno foi denominado como co-supressão (NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990). Em 1998 foi constatado que o mecanismo foi ativado eficientemente no nematoide *Caenorhabditis elegans* via alimentação oral por moléculas de RNA de fita dupla (dsRNA) (FIRE, 1998). Estes resultados mostraram



ser possível o controle de pragas pela administração oral de dsRNA, abrindo o caminho para o que hoje se denomina tecnologia RNAi.

O silenciamento gênico pode ocorrer tanto pelo impedimento da tradução do mRNA quanto pela sua degradação, resultando na diminuição da expressão ou supressão total da expressão do gene homólogo ao dsRNA. Em mais detalhes, o processo básico do RNAi pode ser dividido em três etapas principais. Primeiro, o mecanismo é ativado pela presença de uma molécula de dsRNA (denominada de molécula gatilho). Este dsRNA é então cortado em pequenos RNAs de fita dupla (21-25pb), chamados de small interfering RNA (siRNA), pela Dicer. Na segunda etapa do mecanismo de RNAi, uma das fitas do siRNA é removida e a fita que permanece (chamada de fita guia) é incorporada ao complexo RISC. Na última etapa, o complexo RISC atua para identificar e degradar mRNAs que compartilhem homologia com o siRNA (TOMARI; ZAMORE, 2005). A Dicer é uma enzima essencial no mecanismo de RNAi, sendo responsável pelo tamanho do dsRNA formado. Proteínas Argonautas são componentes principais do complexo RISC, pois tem a função de se ligar ao miRNAs/siRNAs, selecionar qual das fitas do miRNA/siRNA permanece ligado ao RISC e possuem atividade de endonuclease que cliva os mRNAs complementares a estes siRNAs (RIVAS *et al.*, 2005; HÖCK; MEISTER, 2008).

Os dsRNAs podem ser classificados em duas principais categorias de acordo com sua função e origem; micro RNAs (miRNAs) e pequenos RNAs interferentes (siRNA — short interfering RNA). Os miRNA se originam de um transcrito primário longo, que ainda no núcleo assume formato de fita dupla, sofre processamento via complexo enzimático mediado por uma RNase III (Drosha), tornando-se um pré-miRNA, de aproximadamente 70 pb. Este pré-miRNA é exportado para o citoplasma, onde é processado por uma ribonuclease III, chamada Dicer, formando um miRNA maduro, com cerca de 22 pares de bases. Os siRNAs são originados do processamento de moléculas de dsRNAs exógenas (vírus, transposons e dsRNA sintéticos), que ao entrarem na

célula, são processados pela Dicer com tamanhos entre 19 a 30 pares de bases (CARMELL *et al.*, 2002; MORRIS *et al.*, 2004). O siRNA é acoplado a um complexo RISC, e leva a degradação de RNAs homólogos. Os siRNAs podem ser sintetizados *in vitro*, e introduzidos na célula alvo. Uma vez gerados, o miRNA e siRNA são acoplados a um complexo proteico conhecido como o complexo de silenciamento induzido por RNA (RNA Induced Silencing Complex, RISC), que utiliza o miRNA ou siRNA para encontrar mRNAs homólogos, promovendo o silenciamento gênico (YI *et al.*, 2003; TOMARI; ZAMORE, 2005; RIVAS *et al.*, 2005).

Pela especificidade do mecanismo, em teoria, qualquer mRNA de uma célula pode ser degradado de forma específica via RNAi. Outra característica do mecanismo de RNAi é seu caráter sistêmico, ou seja, após ser ativado em uma célula, um sinal é “transmitido” para as outras células. Este sinal sistêmico é um siRNA, pois além de ser pequeno e de fácil movimento, é a molécula que confere a especificidade ao mecanismo (MLOTSHWA *et al.*, 2002). Entretanto, a sistematicidade do RNAi não ocorre em todos os organismos eucariotos, a exemplo de muitas espécies de insetos que o fenômeno não foi observado nem comprovado (CHRISTIAENS; SMAGGHE, 2014). Muitos avanços foram feitos desde a descoberta e elucidação do mecanismo de RNAi, e suas características permitem uma ampla adaptabilidade de uso desta técnica para o controle de pragas e patógenos.

## **Tecnologia de RNAi**

Numa abordagem transformativa, é possível desenvolver plantas transgênicas utilizando a tecnologia do RNAi. A primeira planta transgênica utilizando o mecanismo de RNAi para controle de doença foi um mamoeiro transgênico resistente ao vírus *Papaya ringspot virus* (PRSV), causador da mancha anelar, liberada comercialmente no Hawaii, USA em 1998 (SHEN *et al.*, 2014; JIA *et al.*, 2017). A resistência é obtida mediante a expressão de um fragmento contendo a sequência parcial do gene do capsídeo do vírus. Mais recentemente, outro transgênico, o

milho SmartStax PRO, desenvolvido pela Monsanto, é a primeira planta comercial que utiliza da tecnologia de RNAi para controle de inseto, neste caso a *Diabrotica virgifera virgifera*. O SmartStax foi liberado para comercialização em 2016 no Brasil e Canadá e Estados Unidos em 2017 (HEAD *et al.*, 2017).

A abordagem transformativa do RNAi é uma forma interessante de introduzir resistência em uma dada cultura de forma altamente específica, porém, este método enfrenta certas desvantagens ou limitações; estudos com plantas transgênicas são caros e exigem adequações regulatórias que podem durar alguns anos. No Brasil, as atividades com transgênicos e biotecnologia são reguladas pela Lei 11.105/05. Um organismo geneticamente modificado (OGM) é obrigado a passar por muitos estudos, que podem durar até 10 anos de pesquisa, desde sua descoberta até se tornar um produto comercial (BRASIL, 2005). Além desses fatores, é inviável, do ponto de vista prático, criar um OGM para cada organismo alvo ou cultura.

Por outro lado, a utilização da tecnologia do RNAi por uma abordagem não transformativa tem se tornado alvo de grande interesse, tanto para pesquisa, quanto para fins comerciais, visto possibilitar o uso do RNAi em qualquer cultura. Neste caso, há a aplicação direta de dsRNA na planta via foliar como em aplicações no solo para absorção radicular, que passa a mover sistemicamente pela planta (HUNTER *et al.*, 2012; ANDRADE; HUNTER, 2016). Este método é denominado de RNAi tópico, e vem sendo explorado para o controle de pragas (LI *et al.*, 2015; KOCH *et al.*, 2013; SAMMONS *et al.*, 2015; ANDRADE 2016; ANDRADE; HUNTER, 2017).

Neste contexto, o dsRNA pode ser considerado como um ingrediente ativo para a formulação de inseticidas, fungicidas, produtos com ação antiviral, herbicidas, etc., podendo ter diferentes modos de aplicação. Estes produtos baseados em dsRNA podem chegar ao mercado em quatro categorias: i) Agentes de controle direto; ii) Repressores de fatores de resistência (supressão de genes

associados a resistência/tolerância a agroquímicos); iii) Disruptores de desenvolvimento (p. ex: supressão de genes envolvidos na produção de hormônios em insetos) e iv) Promotores de crescimento (supressão temporária de genes envolvidos no controle do florescimento em plantas) (US/EPA, 2013; US/EPA, 2014; ZOTTI; SMAGGHE, 2015; SAN MIGUEL; SCOTT, 2016; ANDRADE, 2016; ZOTTI *et al.*, 2018).

Importante ressaltar que o uso do RNAi tópico para o controle de pragas deverá ser analisada caso a caso, visto que cada praga responde de forma variável ao RNAi. Por exemplo, *D. virgifera* é extremamente sensível a ingestão de dsRNA (LC50 de 4,3 ng/mL) (BOLOGNESI *et al.* 2012; BACHMAN *et al.*, 2013), enquanto Lepidópteras em geral são recalcitrantes, sendo menos sensíveis à ingestão oral de dsRNA devido à presença de nucleases na saliva e trato digestivo que levam a degradação do dsRNA antes de ser absorvido pelas células do epitélio intestinal (TERENIUS *et al.*, 2011; KATOCH; THAKUR, 2012; SHUKLA *et al.*, 2016).

Outro ponto a ser considerado para que produtos à base de dsRNA sejam comercialmente viáveis na agricultura é a solução de dois gargalos: (1) produção de dsRNA em larga escala e baixo custo, e (2) e tecnologias que promovam maior estabilidade do dsRNA, permitindo assim prolongar sua integridade no ambiente e sua absorção pelas células do organismo alvo. Felizmente, tem-se observado acelerado aumento no conhecimento técnico-científico em diversas áreas relacionadas à tecnologia de RNAi, que estão solucionando estes gargalos.

### **Aplicações contra pragas**

O RNAi é particularmente eficiente contra alguns insetos, em especial aos da ordem Coleoptera. Por outro lado, insetos pertencentes as ordens Lepdoptera e Hemiptera parecem ser menos afetados, sugerindo certa limitação para o controle desses insetos.

Para insetos sugadores, as moléculas de dsRNA devem estar presentes no sistema vascular das plantas. Neste sentido, o método de

entrega é um dos principais desafios para controle desses organismos. Outro problema é a possibilidade de degradação das moléculas no corpo de alguns insetos. Foi observado a degradação de moléculas de dsRNAs em estomago ou por secreção salivar em duas espécies hemíptera; *Acyrtosiphon pisum* e *Lygus lineolaris* (ALLEN; WALKER, 2012; CHRISTIAENS; SMAGGHE 2014). A instabilidade das moléculas de dsRNAs está associado a presença de nucleases e/ou devido ao pH altamente alcalino, muito comum em Lepidoptera, com pH variando entre 11 ou 12.

Alguns estudos também demonstram bons resultados para o controle de insetos sugadores. Andrade e Hunter (2017) observaram taxas de até 56% de mortalidade para o psilídeo dos citros, *D. citri*, após submetem o inseto a alimentação em brotações tratadas com dsRNA homólogo ao gene da Argenina kinase, proteína associada ao metabolismo energético. Wang *et al.* (2015) testaram o RNAi contra o pulgão-do-grão, *Sitobion avenae*. Os pulgões foram submetidos à dieta líquida artificial contendo moléculas de dsRNA. O gene alvo foi o precursor da subunidade da Citocromo C oxidase. Insetos que se alimentaram na dieta com dsRNA tiveram taxa de mortalidade superior a 94%. O controle da mosca-branca, *Bemisia tabaci*, foi extremamente eficiente utilizando plantas de *N. tabacum* expressando dsRNAs homólogos aos genes da Acetilcolinesterase (AChE) e receptor da ecdisona (EcR) (MALIK *et al.*, 2016). Plantas expressando o dsRNA da AChE causaram de 98% de mortalidade após 4 dias de alimentação, enquanto a planta que expressa dsRNAs para os dois genes ocasionou 100% de mortalidade após 9 dias de alimentação (MALIK *et al.*, 2016).

Lepidópteras são pragas em que há grande interesse em controle via RNAi. Liu *et al.* (2015) observaram taxa de mortalidade de 55% contra lagartas de *Helicoverpa armigeras* quando foram alimentadas por três dias em plantas de *Arabidopsis thaliana* expressando dsRNA para o gene da Arginina kinase (Ak). Christiaens *et al.* (2018) também obtiveram sucesso no controle de *Spodoptera exigua*, mas utilizando

outra estratégia. As lavas de *S. exigua* possuem o intestino altamente alcalino (pH > 9,0). Para proteger o dsRNA da degradação, as moléculas foram complexadas a polímeros guanilados. No bioensaio, os insetos foram alimentados durante 7 dias com discos foliares tratados com o dsRNA para o gene da Quitina sintase (ChSB) complexado com o polímero guanilado. Foi observada a taxa de 53% de mortalidade 13 dias após início do bioensaio. Em contrapartida, o tratamento que continha discos foliares tratados apenas com o dsRNA observaram-se apenas 16% de mortalidade de lagartas, mostrando que o uso de dsRNA puros não tem efeito em lepidópteras devido a degradação do dsRNA no processo de ingestão pelo inseto (CHRISTIAENS *et al.*, 2018).

Estudo também demonstraram bons resultados para o controle de coleópteras. Mehlhorn *et al.* (2020) utilizaram dsRNA para silenciamento do gene da actina em *Leptinotarsa decemlineata*. Larvas de segundo estágio (instar) foram submetidas a alimentação em discos foliares tratados com o dsRNA. Foi observada mortalidade superior a 82% após 5 dias de avaliação. Também foi observado retardo no desenvolvimento desses insetos.

Os ácaros também são considerados pragas importantes para diversas culturas agrícolas e plantas ornamentais. Duas espécies se destacam nesse cenário, *Tetranychus urticae* e *Panonychus citri*. O uso massivo de pesticidas tornou *T. urticae* resistente a quase todos os tipos de acaricidas. Os estudos sobre o genoma e os mecanismos de silenciamento pós-transcricionais do *T. urticae*, realizados por Khila e Grbić (2007), serviram de base para estudos posteriores visando a aplicação do mecanismo do RNAi para controle de ácaros. Usando desse conhecimento, Kwon, Park e Lee (2013) conseguiram taxas de mortalidade superiores a 65% contra *T. urticae*, usando disco foliar tratados com dsRNA que visavam a supressão de um gene responsável por uma subunidade proteica relacionada ao transporte de membrana do retículo endoplasmático (*Coatomer Protein Complex*, T-COPB2). Li *et*

al. (2017) utilizaram a mesmo método com disco foliar, obtiveram taxa de 56% de mortalidade em ninfas de *P. citri*.

As vias e componentes do RNAi são relativamente conservadas entre os eucariotos, de modo que estão presentes na grande maioria dos fungos, existindo raras exceções que não possuam esta maquinaria celular. Levando isto em consideração, boa parte dos fungos podem ser alvos da tecnologia do RNAi. Fungos do gênero *Fusarium* são responsáveis por causar doenças em diversas culturas de interesse econômico, dentre elas o milho, trigo e soja. Koch *et al.* (2013) ao tratar culturas, *in vitro*, de *Fusarium graminearum* com dsRNA complementar ao gene do citocromo P450, conseguiram controle semelhantes ao observados com uso do fungicida Tebuconazole. O fungo apresentou mudanças morfológicas além da inibição de seu crescimento. Posteriormente, Koch *et al.* (2016) também testou a eficiência do RNAi contra o *F. graminearum in vivo*. Foram usados dsRNA homólogos a genes envolvidos na biossíntese de ergosterol. Foram feitas pulverizações em folhas de cevada, que foram capazes de inibir o crescimento fúngico tanto no local da aplicação quanto em folhas distais não pulverizadas. Este experimento demonstrou a capacidade de absorção e translocação das moléculas de dsRNA pelo sistema vascular das plantas e absorção pelas hifas fúngicas.

As viroses de plantas são outro problema de difícil controle, sendo responsáveis por grandes perdas de qualidade e produção de diversas culturas, podendo ocasionar perda total da cultura. O mecanismo de RNAi é naturalmente utilizado pelas células eucarióticas no controle de infecções virais, interferindo nos processos de replicação dessas entidades. Isso significa que o mecanismo do RNAi pode ser utilizado para o controle das mais variadas doenças virais. Tenllado *et al.* (2003) utilizaram *Escherichia coli* engenheirada para produção de dsRNA do gene da replicase do vírus PMMoV. Extrato bruto dos ácidos nucleicos da cultura bacteriana foram pulverizadas em plantas de *Nicotiana benthamiana*, inoculadas com o vírus. O tratamento controle

apresentou sintomas de infecção viral após 6 dias de inoculação, enquanto as tratadas com o dsRNA se mantiveram livres de sintomas por até 10 semanas após inoculação. Mais recentemente, Worrall *et al.* (2019) testaram a aplicação foliar para proteção contra infecção viral mediada por transmissão por pelo afídeo *Mizus persicae*. O dsRNAs homólogos a regiões conservadas do *Bean common mosaic virus* (BCMV) foram carregados em nano-folhas HDL, e aplicados em plantas de *N. benthamiana* e *Vigna unguiculata*. As plantas foram submetidas a infestação por *M. persicae* cinco dias após aplicação do dsRNA-HDL. O vírus foi detectado em apenas 8% das plantas de *N. benthamiana* e nenhuma das plantas de *V. unguiculata* foram infetadas 25 dias após aplicação do dsRNA-HDL.

Os estudos iniciais sobre o mecanismo do RNAi ocorreram no modelo nematoide, *C. elegans*, onde o foi descrito como sistêmico e capaz de ser transmitido à próxima geração por meio da injeção ou alimentação de dsRNA. A maioria dos trabalhos encontrados para o controle desses organismos por meio da tecnologia do RNAi são por abordagens transformativas. Huang *et al.* (2006) geraram plantas de *Arabidopsis thaliana* expressando dsRNA homólogo a genes responsáveis pela integração nematoide-hospedeiro. Essas plantas apresentaram resistência contra *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla*. Houve uma redução de 93% no número de ovos de quando comparada a plantas que não expressavam o dsRNA.

## Considerações

Um dos pontos chaves para o funcionamento da tecnologia do RNAi no manejo de pragas, é a identificação de genes que sejam essenciais ou críticos a sobrevivências do organismo alvo. Outro ponto muito importante é como fazer a molécula de dsRNA adentrem as células do organismo alvo para desencadear o silenciamento gênico. O processo de aquisição do dsRNA pelo organismo alvo pode ocorrer de maneira direta ou indireta. A primeira, ocorre quando a molécula de



dsRNA é absorvida por contato direto ou por alimentação de tecidos da planta contendo o dsRNA em sua superfície. Para a forma indireta, as moléculas de dsRNA devem ser translocadas pelo sistema vascular das plantas, e então serem absorvidas pelo organismo alvo. O processo de aquisição pelo organismo alvo está fortemente relacionado com a estratégia de entrega, visto que cada organismo apresenta particularidades no seu modo de alimentação, refletindo na forma de aquisição do dsRNA.

O processo de definição das estratégias de entrega irá variar de acordo com o organismo alvo (localização da praga na planta, biologia da praga, etc.) e cultura. Com base nestas variáveis, o dsRNA pode ser aplicado na superfície foliar, podendo permanecer aderido à epiderme ou ser absorvido pelas folhas e translocado pelo sistema vascular, realizar a injeção direta em troncos, bem como fazer a aplicação no solo para absorção do dsRNA pelas raízes. Entretanto, a aplicação direta do dsRNA pode não ser viável devido à instabilidade das moléculas de dsRNA diante das adversidades ambientais, principalmente a incidência de luz UV, remoção pela chuva ou mesmo degradação por microrganismos. Desta forma, aplicações de dsRNAs puro em campo podem fornecer intervalos de proteção muito curtos, tornando a viabilidade prática questionável. Neste contexto, pesquisadores vem estudando estratégias nanotecnológicas para a proteção de dsRNA. As nanocápsulas são reconhecidas atualmente como um dos principais veículos para transportar moléculas para terapia gênica (ABDELMAWLA *et al.*, 2011). Elas envolvem a cobertura (coating) de dsRNA ou siRNA por substâncias como lipídeos, polímeros ou sua encapsulação em nanopartículas (SUTTON *et al.*, 2006; CHEN; XIE, 2012). Zhang, Zhang e Zhu (2010), encapsularam dsRNA homólogos ao gene da quitina sintase em nanopartículas de quitosana. Após fornecer a larvas de *Anopheles gambiae* via ingestão, foi capaz de observar os efeitos de RNAi nas larvas (redução da expressão gênica e conteúdo de

quitina no corpo do inseto). Os pesquisadores ressaltaram que o dsRNA fornecido sem proteção da nanocapsula não resultou nos efeitos de RNAi, provavelmente por haver a degradação do dsRNA por enzimas presentes no estomago da larva. Ainda, é possível além da proteção, a nanopartícula pela sua carga positiva, seja melhor absorvida pelas células da parede do estomago (ZHANG; ZHANG; ZHU, 2010).

Mitter *et al.* (2017) demonstraram que o dsRNA pode ser protegido ao carrega-lo em nano-folhas de argila do tipo Hidróxido duplo lamelar (HDL, *Layered Double Hydroxide*) não-toxica e biodegradável. As nano-folhas LDH são capazes de carregar grandes quantidades de dsRNA, e o complexo dsRNA-LDH é chamando de BioClay. Neste experimento, plantas de *Nicotiana tabacum* foram submetidas a pulverização com soluções contendo moléculas de dsRNA-LDH. O dsRNA protegido pôde ser detectado até 30 dias após aplicação. Uma única aplicação foi capaz de proteger as plantas por pelo menos 20 dias ao vírus PMMoV (*Pepper mild mottle virus*). Esta uma alternativa eficiente que promete romper as barreiras que limitam o uso da tecnologia do RNAi para proteção agrícola.

### **Aplicação de dsRNA**

**Aplicação foliar:** A pulverização foliar pode ser uma alternativa de entrega das moléculas de dsRNA para as pragas que se alimentam e crescem na filosfera. Produto como esse, formulado a base de dsRNA, atuaria como os pesticidas sintéticos de aplicação local, porém, com uma vida útil mais curta, devido às características químicas do dsRNA. Diversos estudos explorando essa estratégia de entrega apresentaram resultados significativos no controle de insetos. Gonget *al.* (2013) conseguiram índices de até 60% de mortalidade após alimentarem larvas de *Plutella xylostella* com folhas de *Brassica* spp. pulverizadas com siRNAs. San Miguel e Scott (2016) demonstraram em condições de casa de vegetação que moléculas de dsRNA podem permanecer

estáveis por até 28 dias, além de obterem resultados significativos para o controle de *Leptinotarsa decemlineata*. Andrade e Hunter (2016) testaram a aplicação foliar para *Diaprepes abbreviatus*, e a técnica se mostrou promissora para o controle desses insetos. A aplicação também se mostrou eficiente para o manejo de patógenos. Wang *et al.* (2017) aplicaram moléculas de siRNAs e dsRNA em frutas, vegetais e flores, e conseguiram inibir o desenvolvimento do fungo *Botrytis cinerea* por até dez dias. Eles também testaram a especificidade dos RNAs; aplicaram as mesmas moléculas contra o fungo *Verticillium dahlia*, e não obtiveram nenhum efeito de controle.

**Injeção em tronco:** Este método de entrega de dsRNA é especialmente adequado para plantas perenes. As moléculas de RNA são injetadas diretamente no sistema vascular das plantas, por onde podem ser translocadas para outros tecidos da planta. Hunter *et al.* (2012) injetaram solução de dsRNA em plantas de videira e citros, e foi possível detectar a molécula até sete semanas após a aplicação. Também foi constatado a supressão do desenvolvimento de insetos, como o psilídeo dos citros, *D. citri*.

**Irrigação:** Esse método para entrega de moléculas de dsRNA é uma boa alternativa para culturas irrigadas. Atualmente, a irrigação por gotejamento é mais utilizada em muitas culturas devido seu potencial de economizar água e nutrientes. A técnica permite que a água goteje lentamente para as raízes das plantas. Incorporar dsRNA a irrigação permitiria um suplemento contínuo dessas moléculas ao solo, de onde seriam absorvidas pelas raízes das plantas. Como demonstrado por Dubelman *et al.* (2014), as moléculas de dsRNA podem permanecer no solo por apenas 2 ou 3 dias. Li *et al.* (2015) obtiveram até 50% de mortalidade para ninfas de *Nilaparvata lugens*, após imersão de raízes de arroz em soluções contendo dsRNA. Neste mesmo trabalho, também obtiveram altas taxas de mortalidade para larvas de *Ostrinia furnacalis*, após se alimentarem de mudas de milho que foram irrigadas com solução de dsRNA.

## **Produção de dsRNA**

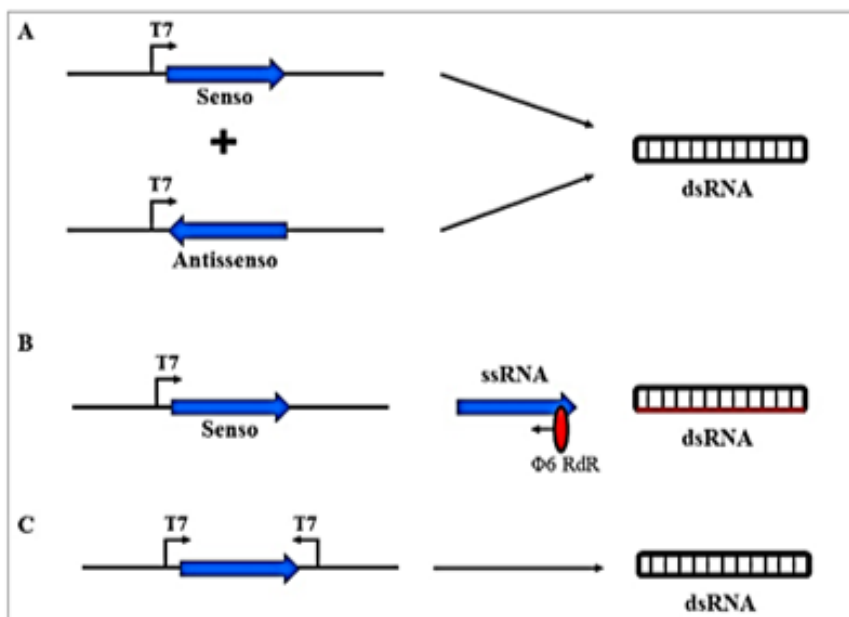
A expressão de dsRNA para uso no controle de pragas pode ser alcançada usando sistemas de produção de dsRNA *in vitro* ou *in vivo*. Em ambos sistemas, para a transcrição de RNA é necessário a presença de promotores de RNA polimerase dependentes de DNA (DdRp) T7 ou T3 nas extremidades da molécula de DNA molde. O promotor DdRp pode estar disposto em apenas uma extremidade do DNA ou em ambas. As sequências promotoras são inseridas na etapa de síntese do fragmento do gene de interesse via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) pela adição da sequência promotora na extremidade 5' dos oligonucleotídeos. Outra opção é o uso de plasmídeos vetores, como o vetor L4440 (Addgene, EUA), que abriga dois promotores da T7 RNA polimerase flanqueando o sítio múltiplo de clonagem (MCS), permitindo a transcrição bidirecional do fragmento clonado.

### **Produção *in vitro***

A produção *in vitro* de dsRNA pode ser realizada de duas maneiras. Uma estratégia é transcrever separadamente as fitas senso e antissenso do fragmento de interesse. Após a transcrição, os RNAs de fita simples (ssRNA) complementares são purificados e misturados permitindo que se anelem formando o dsRNA (Figura 1A). Uma variação desta estratégia é sintetizar o ssRNA e posteriormente utilizar a RNA polimerase do bacteriófago phi 6 ( $\phi 6$ ) para gerar a fita complementar, criando o dsRNA (Figura 1B) (ROBINSON; WORRALL; MITTER, 2014). Esses métodos geralmente produzem dsRNA de excelente qualidade e pureza, sendo adequado para estudos laboratoriais. Entretanto, para grandes estudos e aplicação em campo, não é economicamente viável. Na segunda estratégia, o fragmento de DNA molde contém a sequência promotora da RNA polimerase (geralmente a do phago T7) em ambas extremidades, desta forma as fitas senso e antissenso são geradas durante a reação de síntese, anelando-se naturalmente e obtendo-se

o dsRNA ao final da reação. Este processo é o mais utilizado em escala de laboratório, com diversos kits comerciais disponíveis no mercado. Atualmente já existem empresas especializadas na produção de dsRNA por síntese *in vitro*, que oferecem o serviço de produção de dsRNA em escalas de vão de miligramas até quilogramas.

**Figura 1.** Representação esquemática das estratégias para produção *in vitro* de dsRNA. (A) A transcrição separada de cada uma das fitas de ssRNA nos sentidos senso e antissenso, que são posteriormente misturadas para permitir o anelamento. (B) Inicialmente ocorre a síntese da fita de ssRNA senso, e posteriormente é adicionado polimerase do phago  $\phi 6$  ( $\phi 6$  RdR) que realiza a síntese da fita complementar gerando o dsRNA. (C) Transcrição simultânea das fitas senso e antissenso a partir dos promotores T7 posicionado em direções opostas.



Fonte: Adaptado de Robinson; Worrall; Mitter (2014).

### Produção *in vivo*

A produção *in vivo* de dsRNA é realizado via processo fermentativo. O organismo utilizado neste processo geralmente é *Escherichia coli*,

uma vez que essa bactéria é bem caracterizada em termos de genética molecular, fisiologia e sistemas de expressão. Entre as vantagens de se usar *E. coli* destaca-se a existência de métodos precisos e rápidos para modificação de seu genoma, seu rápido crescimento, a sobrevivência em diferentes condições ambientais, dispensa o uso de um meio de cultura caro, alto rendimento em produto, além das facilidades de cultivo, de redução de protease, de crescer em altas densidades celulares, acumulação de proteína heteróloga acima de 50% de sua massa celular, entre outras.

Diversas estirpes de *E. coli* são modificadas geneticamente e amplamente utilizada em trabalhos com tecnologia do DNA recombinante. A estirpe HT115(DE3) é a mais usada para produzir grandes quantidades de dsRNA para estudos de silenciamento, mas outras estirpes também podem ser utilizadas como, por exemplo, BL21; W3110; SDF204; HB101; TG1; SCS110; XL1-azul MRF0.

*E. coli* HT115 abriga o pró-fago DE3 que codifica o gene T7 RNA da polimerase induzível por isopropil -D1-tiogalactopiranósido (IPTG), e também possui o gene *rnc*, que codifica a enzima RNase III, inativado pela presença de um transposon.

O método para gerar dsRNA *in vivo* é relativamente simples. A bactéria é previamente transformada com o plasmídeo contendo em seu MCS uma construção gênica composta de fragmento do gene de interesse flanqueado em ambas extremidades pelas sequências terminadora e promotora reconhecidas pela enzima T7 RNA polimerase. Em seguida a bactéria é cultivada em meio líquido, sob condições específicas de meio de cultivo, temperatura, agitação e indução, de acordo com o protocolo de Timmons, Court e Fire (2001). A eficiência de produção de dsRNA irá variar de acordo com as condições de cultivo e indução utilizadas, sendo importante que todas as variáveis sejam testadas para maximizar a produção de dsRNA por mL de meio de cultivo. Após a indução da expressão, as bactérias são coletadas por centrifugação e o RNA total é extraído utilizando diferentes métodos.

## Referências

- ABDELMAWLA S. *et al.* Pharmacological characterization of chemically synthesized monomeric phi29 pRNA nanoparticles for systemic delivery. **Molecular Therapy**, v. 19, p. 1312–1322, 2011.
- ALLEN, M. L.; WALKER, W. B. Saliva of *Lygus lineolaris* digests double stranded ribonucleic acids. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, p. 391-396, 2012.
- ANDRADE, E. C.; HUNTER, W. B. RNA Interference — natural gene-based technology for highly specific pest control (HiSPeC). **InTech**, v. 1, p. 391-409, 2016.
- ANDRADE, E. C. Genetic strategies for weed control - emphasis on RNA interference. *In*: Dana Katia Meschede; Dionisio Luiz Pisa Gazzieiro. (Org.). **A era glyphosate: agricultura, meio ambiente e homem**. 1 ed. Londrina: Midiograf II, v. 1, p. 155-165, 2016.
- ANDRADE, E. C.; HUNTER, W. B. RNAi Feeding bioassay: development of a non-transgenic approach to control asian citrus psyllid and other hemipterans. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 2, p. 389-396, 2017.
- BACHMAN, P. M. *et al.* Characterization of the spectrum of insecticidal activity of a double-stranded RNA with targeted activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). **Transgenic Research**, v. 22, p. 1207-1222, 2013.
- BOLOGNESI, R. *et al.* Characterizing the mechanism of action of Double-Stranded RNA activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). **PLoS One**, v. 7, p. e47534, 2012.
- BOREL, B. When the pesticides run out. **Nature**, v. 543, p. 302-304, 2017.
- BRASIL. **Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005**. 184º da Independência e 117º da República.
- CARMELL, M. A. *et al.* The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and

tumorigenesis. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 16, p. 2733-2742, 2002.

CHEN, J.; XIE, J. progress on RNAi-based molecular medicines. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 3971-3980, 2012.

CHRISTIAENS, O.; SMAGGHE, G. The challenge of RNAi-mediated control of hemipterans. **Current Opinion in Insect Science**, v. 6, p. 15-21, 2014.

CHRISTIAENS, O.; SWEVERS, L.; SMAGGHE, G. DsRNA degradation in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) associated with lack of response in RNAi feeding and injection assay. **Peptides**, v. 53, p. 307-314, 2014.

CHRISTIAENS, O. *et al.* Increased RNAi efficacy in *Spodoptera exigua* via the formulation of dsRNA with guanylated polymers. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 1-13, 2018.

DUBELMAN, S. *et al.* Environmental fate of double-stranded RNA in agricultural soils. **PLoS One**, v. 9, p. e93155, 2014.

FIRE, A. Z. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806-811, 1998.

GONG, L. *et al.* Testing insecticidal activity of novel chemically synthesized siRNA against *Plutella xylostella* under laboratory and field conditions. **PLoS One**, v. 8, p. 1-8, 2013.

HEAD, G. P. *et al.* Evaluation of SmartStax and SmartStax PRO maize against western corn rootworm and northern corn rootworm: efficacy and resistance management. **Pest Management Science**, v. 73, p. 1883-1899, 2017.

HÖCK, J.; MEISTER, G. The Argonaute protein family. **Genome Biology**, v. 9, p. 1-8, 2008.

HUANG, G. *et al.* Hussey R.S. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 103, p. 14302-14306, 2006.



HUNTER, W. B. *et al.* Advances in RNA interference: dsRNA treatment in trees and grapevines for insect pest suppression. **Southwestern Entomologist**, v. 37, p. 85-87, 2012.

JIA, R. *et al.* Use of RNAi technology to develop a PRSV-resistant transgenic papaya. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-9, 2017.

KATOCH, R.; THAKUR, N. Insect gut nucleases: a challenge for RNA interference mediated insect control strategies. **International Journal of Biochemistry and Biotechnology**, 1, 198-203, 2012.

KHILA, A.; GRBIĆ, M. Gene silencing in the spider mite *Tetranychus urticae*: dsRNA and siRNA parental silencing of the Distal-less gene. **Development Genes and Evolution**, v. 217, p. 241-251, 2007.

KOCH, A. *et al.* Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14-demethylase-encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, p. 19324-19329, 2013.

KOCH, A. *et al.* An RNAi-Based Control of *Fusarium graminearum* infections through spraying of long dsRNAs involves a plant passage and is controlled by the fungal silencing machinery. **Plos Pathogens**, v.12, p. 1-22, 2016.

KWON, D. H.; PARK, J. H.; LEE, S. H. Screening of lethal genes for feeding RNAi by leaf disc-mediated systematic delivery of dsRNA in *Tetranychus urticae*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 105, p. 69-75, 2013.

LI, G. *et al.* Characterization and expression patterns of key ecdysteroid biosynthesis and signaling genes in a spider mite (*Panonychus citri*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, p. 1-44, 2017.

LI, H. *et al.* New insights into an RNAi approach for plant defence against piercing-sucking and stem-borer insect pests. **Plant, Cell & Environment**, v. 38, p. 2277-2285, 2015.

LIU, F. *et al.* Silencing the HaAK gene by transgenic plant-mediated RNAi impairs larval growth of *Helicoverpa armigera*. **International Journal of Biological Sciences**, v. 11, p. 67-74, 2015.

MALIK, H. J. *et al.* RNAi-mediated mortality of the whitefly through transgenic expression of doublestranded RNA homologous to acetylcholinesterase and ecdysone receptor in tobacco plants. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-11, 2016.

MEHLHORNA, S. G. *etal.* Profiling of RNAi sensitivity after foliar dsRNA exposure in different European populations of Colorado potato beetle reveals a robust response with minor variability. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 166, p. 1-11, 2020.

MITTER, N. *et al.* Induction of virus resistance by exogenous application of double-stranded RNA. **Current Opinion in Virology**, v. 26, p. 49-55, 2017.

MLOTSHWA, S. *et al.* RNA silencing and the mobile silencing signal. **The Plant Cell**, v. 14, p. 289-301, 2002.

MORRIS, K. V. *et al.* Small interfering RNA—induced transcriptional gene silencing in human cells. **Science**, v. 305, p. 1289-1292, 2004.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible cosuppression of homologous genes in trans. **The Plant Cell**, v. 2 p. 279-89, 1990.

RIVAS, F. V. *et al.* Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 12, p. 340-349, 2005.

ROBINSON, K. E.; WORRALL, E. A.; MITTER, N. Double stranded RNA expression and its topical application for non-transgenic resistance to plant viruses. **Journal of Plant Biochemistry Biotechnology**, v. 23, p. 231-237. 2014.

SAMMONS, R. D. *et al.* Method for controlling herbicide-resistant plants, US9121022, 1. Set. 2015. **Google Patents**.

SAN MIGUEL, K.; SCOTT, J. G. The next generation of insecticides: DsRNA is stable as a foliar-applied insecticide. **Pest Management Science**, v. 4, p. 801-809, 2016.

SHEN, W. *et al.* Resistance of non-transgenic papaya plants to *papaya ringspot virus* (PRSV) mediated by intron-containing hairpin dsRNAs expressed in bacteria. **Acta Virologica**, v. 58, p. 261-266, 2014.

SHUKLA, J. N. *et al.* Reduced stability and intracellular transport of dsRNA contribute to poor RNAi response in lepidopteran insects. **RNA Biology**, 13, 656-669, 2016

SUTTON, D. *et al.* Efficient suppression of secretory clusterin levels by polymer-siRNA nanocomplexes enhances ionizing radiation lethality in human MCF-7 breast cancer cells *in vitro*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, p. 155-162, 2006.

TENLLADO, F. *et al.* Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. **BMC Biotechnology**, v. 3, p.1-11, 2003.

TERENIUS, O. *et al.* RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, p. 231-245, 2011.

TIMMONS, L.; COURT, D. L.; FIRE, A. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. **Gene**, v. 263, p. 103- 263. 2001.

TOMARI, Y.; ZAMORE, P. D. Perspective: machines for RNAi. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 19, p. 517-529, 2005.

US/EPA. **Environment protection agency, RNAi technology as a pesticide: Problem formulation for human health and ecological**

**risk assessment**. 2013. Disponível em: <http://www.thecre.com/premium/wpcontent/uploads/2012/04/RNAi-White-Paper.pdf>.

US/EPA. **Environment protection agency, RNAi technology as a pesticide: problem formulation for human health and ecological risk assessment**. 2014. Disponível em: <http://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/012814minutes.pdf>.

WANG, D. *et al.* Double-stranded RNA in the biological control of grain aphid (*Sitobion avenae* F.). **Functional & Integrative Genomics**, v. 15, p. 211-223, 2015.

WANG, M.; THOMAS, N.; JIN, H. Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi for powerful innovative pre- and post-harvest plant protection. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 38, p. 133-141, 2017.

WORRALL, E. A. *et al.* Exogenous application of RNAi-inducing double-stranded RNA inhibits aphid-mediated transmission of a plant virus. **Plant Science**, v. 10, p. 1-9, 2019.

YI, R.; QIN, Y.; CULLEN, B.R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-micro RNAs and short hairpin RNAs. **Genes & Development**, v. 17, p. 3011-3016, 2003.

ZHANG, X.; ZHANG, J.; ZHU, K.Y. Chitosan/doublestranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). **Insect Molecular Biology**, v. 19, p. 683-693, 2010.

ZOTTI, M. J.; SMAGGHE, G. RNAi Technology for insect management and protection of beneficial insects from diseases: lessons, challenges and risk assessments. **Neotropical Entomology**, v. 44, p. 197-213, 2015.

ZOTTI, M. J. *et al.* RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. **Society of Chemical Industry**, v. 78, p. 1239-1250, 2018.

# Sisal: podridão vermelha e o biocontrole

Ana Cristina Fermino Soares

Jéssica Silva Santos

Renata Alves de Sousa

Leonardo de Oliveira Barbosa

Elizabeth Amélia Alves Duarte

Aristóteles Góes Neto

## A podridão vermelha

A podridão vermelha é o principal problema fitossanitário da cultura do sisal (*Agave sisalana* Perrine) no Brasil (COUTINHO, 2006; ABREU, 2010; DUARTE *et al.*, 2018). Esta doença foi registrada pela primeira vez no Brasil em 1951, no estado da Paraíba, por Machado (1951), que a descreveu como um apodrecimento pardo-avermelhado do cepo, causando o enrolamento e coloração arroxeadada nas folhas e a denominou de podridão parda do colo (MEDINA, 1954). Com base nos estudos realizados por Black (1948), que descreveu sintomas de podridão úmida e podridão seca do cepo em plantas de sisal na Tanganica, atual Tanzânia, na África, e Wallace (1950) que isolou o fungo *Aspergillus niger* do sisal com sintomas de podridão úmida e seca, com resultados positivos nos testes de patogenicidade, Medina (1954) indicou que a podridão observada por Machado (1951) no Brasil também seria causada por *A. niger*. Este autor ainda se referiu à podridão do caule de sisal na Venezuela (CIFERRI, 1951) e na ilha Anjouan, no arquipélago das Comores, na costa sudoeste da África (CRÉTENET; De RAUCOURT, 1959), com a probabilidade de serem a mesma doença no sisal, causada por *A. niger*. A nível mundial, o primeiro relato de podridão no sisal ocorreu na Tanzânia, na década de 30 do séc. XX (WALLACE, 1937), sendo esta doença posteriormente descrita por Wallace e Dieckmahns (1952).

Algumas décadas após essas observações de Machado (1951), a podridão vermelha do sisal foi descrita no Brasil como sendo causada

pelo fungo *Botryodiplodia theobromae* (LIMA *et al.*, 1998), mas Coutinho *et al.* (2006) e Abreu (2010) identificaram o *A. niger* como agente causal da podridão vermelha do sisal na Bahia, com base nas características morfológicas do fungo e os testes de patogenicidade. Entretanto, o estudo recente de Duarte *et al.* (2018), em áreas de produção de sisal no semiárido da Bahia, concluiu que *Aspergillus welwitschiae* é o agente causal da podridão vermelha do sisal.

Ambas as espécies, *A. niger* e *A. welwitschiae* são *Aspergillus* da seção *Nigri* (GAMS *et al.*, 1985), amplamente conhecidos como *Aspergillus* negros, os quais são indistinguíveis pelas características morfológicas dos esporos (VARGA *et al.*, 2011). Estes fungos também não são distinguíveis por filogenia baseada em marcadores como ITS e  $\beta$ -tubulina, por serem grupos/seções monofiléticas que compartilham características genéticas peculiares. Estudos filogenéticos e taxonômicos do gênero *Aspergillus* são baseados no gene *CaM* - calmodulina, considerado o código de barras de DNA para identificação de espécies da seção *Nigri* (HONG *et al.*, 2005; SAMSON *et al.*, 2014; SUSCA *et al.*, 2016; DUARTE *et al.*, 2018).

Portanto, com base nesses estudos sobre os *Aspergillus* negros, em especial o clado monofilético *A. niger/A. welwitschiae*, sugere-se que os trabalhos prévios sobre a podridão vermelha do sisal (MEDINA, 1954; COUTINHO *et al.*, 2006; ABREU, 2010; GAMA *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2014; BARBOSA *et al.*, 2018; CARMO *et al.*, 2018) referem-se erroneamente ao *A. niger* como agente causal desta doença, sendo estes referentes ao mesmo patossistema *A. welwitschiae* – *A. sisalana*.

O *A. welwitschiae* pertence ao Reino Fungi, filo Ascomycota, classe Eutotiomyces, ordem Eurotiales, família Aspergillaceae (MYCOBANK, 2017). Esta espécie foi identificada pela primeira vez associada às estruturas de reprodução da planta *Welwitschia mirabilis* por AF Moller no século XIX e foi classificada como *Ustilago welwitschiae* por Saccardo em 1883 e *Sterigmatomyces welwitschiae* por Hennings em 1903, e finalmente classificada por Wehmer em 1907 como *Aspergillus*

*welwitschiae* (HONG *et al.*, 2013). Este fungo pode ser encontrado no solo e seus esporos podem ser detectados no ar (WHITAKER *et al.*, 2008; BARROS *et al.*, 2018). Duarte *et al.* (2018) analisaram as sequências dos isolados de *Aspergillus* pertencentes à seção *Nigri* depositados nos bancos de dados públicos e compararam com os dados dos *Aspergillus* negros isolados de plantas de sisal e de solo, na região semiárida da Bahia. Estes autores concluíram que o *A. welwitschiae* é um fungo comum em diversos substratos e regiões geográficas, não sendo restrito à região árida da Namíbia, África, descrevendo-o como uma espécie críptica (BICKFORD *et al.*, 2007), envolvendo o clado monofilético *A. niger/A. welwitschiae* (SAMSON *et al.*, 2014).

As infecções nas plantas de sisal, causadas por *A. welwitschiae*, ocorrem pela penetração do patógeno em tecidos do hospedeiro com injúrias, por meio de cortes, estresse nutricional ou hídrico, conforme descritas para *A. niger* (COUTINHO *et al.*, 2006). *A. welwitschiae* age na destruição do parênquima das células do caule do sisal, configurando-o em um patógeno necrotrófico (DUARTE *et al.*, 2018), que destrói as células vivas, se nutre a partir destas e vive sobre os tecidos mortos (GLAZEBROOK, 2005; VLEESSCHAUWER *et al.*, 2013). Os sintomas externos da podridão vermelha no sisal são observados nas folhas, com o amarelecimento, murcha e o sintoma interno é a característica coloração vermelha ou parda dos tecidos do caule e da base das folhas (Figura 1). Com o progresso da doença, o caule apodrece e a planta morre, o que causa o seu tombamento. A podridão vermelha tem sido observada em todos os estágios de desenvolvimento da planta de sisal (ABREU, 2010; DUARTE *et al.*, 2018).



**Figura 1.** Plantas de sisal com sintomas de podridão vermelha: (A) Sintomas externos de amarelecimento e murcha nas folhas; (B) Sintomas internos com a característica coloração vermelha ou parda dos tecidos do caule e da base das folhas. As setas indicam os sintomas. Fotos: Soares, A.C.F.

## O sisal

O sisal (*Agave sisalana*) tem a sua origem nas regiões áridas e semiáridas do México (MEDINA, 1954; GARCÍA-MENDOZA, 2002; GENTRY, 2004) e foi levado pelo cônsul norte-americano Dr. Henry Perrine para o sul da Flórida nos Estados Unidos, juntamente com outras espécies de *Agave*, entre os anos de 1834 e 1836 (MEDINA, 1954). Este autor ressalta que antes da distribuição do sisal para várias partes do mundo, a partir das plantas propagadas no sul da Flórida, até o início do século XIX o México era detentor do mercado mundial de fibras de *Agave*, produzidas pelo *Agave fourcroydes*, conhecido como henequém, pois este país não produzia fibra a partir do *Agave sisalana*.

No Brasil, o sisal foi introduzido em 1903 no estado da Bahia, no município de Maragogipe, pelo industrial Horácio Urpia Junior, com plantas adquiridas de uma empresa norte-americana (MEDINA, 1954). Em 1906, o sisal foi introduzido no estado de São Paulo, pelo Instituto Agrônômico de Campinas, com plantas trazidas da França pelo Dr. Gustavo D'Ultra (MEDINA, 1954). Entretanto, a expansão da cultura do sisal na Bahia para comercialização da fibra, só ocorreu nos anos



de 1930 e 1940, pelo incentivo da Secretaria de Agricultura, devido à importância econômica da fibra nas épocas da Segunda Guerra Mundial e pós-guerra (MEDINA, 1954). Este autor fez uma compilação de dados referentes à produção mundial de fibra de sisal e reportou a produção de 9.675 toneladas no Brasil em 1947, a qual aumentou rapidamente, atingindo 70 mil toneladas em 1950, de um total de produção mundial de 351.717 toneladas. Em 1951, com a produção anual de 55.175 toneladas, o Brasil já estava entre os principais países produtores de fibra de sisal (MEDINA, 1954).

Países como o Brasil, Angola, Moçambique, Quênia, Etiópia, Madagascar, África do Sul, Tanzânia, Malawi, China, Indonésia, Tailândia, Cuba, Haiti, Venezuela, cultivam o sisal para a extração da fibra (FAO, 2020). Dados mais recentes de produção mundial de fibras de sisal e henequém, sendo em sua maioria de sisal, indicam aproximadamente 200 mil toneladas de fibra produzidas em 2018 (FAO, 2020). Desde 1961, o Brasil tem sido o principal produtor de fibra de sisal no mundo e, em 2018 a produção foi de 80.043 toneladas, correspondendo a cerca de 40% da produção mundial (FAO, 2020). Salienta-se que aproximadamente 95% da produção de sisal no Brasil está concentrada na região semiárida do estado da Bahia, sendo o restante produzido na Paraíba e Rio Grande do Norte (SINDIFIBRAS, 2020). No Brasil, o sisal é cultivado principalmente em pequenas propriedades rurais por agricultores familiares, sendo uma das poucas culturas que sobrevivem às condições extremas de déficit hídrico e elevadas temperaturas (SILVA *et al.*, 2008).

Desde a década de 30, esta cultura tem contribuído para a geração de renda de grande parte da população nessa região, minimizando o êxodo rural (SUINAGA *et al.*, 2006). A cadeia produtiva do sisal, desde as atividades de campo até a sua industrialização e comercialização, tem sido uma importante fonte de renda no semiárido baiano, sendo esta cultura descrita pelos produtores como o “ouro verde” da região e a “poupança” dos produtores rurais. A fibra de sisal é uma *commodity*,

com 80% de sua produção exportada para os Estados Unidos, Canadá e Europa (SINDIFIBRAS, 2020), principalmente pela indústria de cordoaria e o *baler twine* usado na agropecuária.

Entretanto, a produção de sisal no Brasil vem diminuindo ao longo da última década, com uma redução de mais de 50% na produção anual da fibra, o que pode ser observado na sua produção em 2016 e 2017, com 180.948 e 79.629 toneladas de fibra, respectivamente (FAO, 2020). Entre 2008 e 2011, a produção anual de fibra de sisal no Brasil variou entre 283.797 e 246.239 toneladas e, entre os anos de 2015 e 2018, a produção variou entre 183.560 e 79.629 toneladas por ano (FAO, 2020). Fatores como períodos extensos de seca, o baixo nível tecnológico empregado em toda a cadeia produtiva e a elevada incidência da podridão vermelha do sisal, além dos problemas relacionados à comercialização da fibra nas regiões produtoras e à sua exportação, vem sendo apontados como os principais problemas que tem contribuído para o declínio na produção de sisal no Brasil.

O cultivo do sisal na Bahia vem sendo conduzido com pouquíssimo investimento em pesquisa e tecnologias de manejo da cultura. Na maioria das propriedades, o sisal é colhido uma vez por ano, após o terceiro ano de sua implantação, num sistema de produção que pode ser comparado ao extrativismo, sem o manejo adequado da cultura, como, por exemplo, o uso de técnicas de conservação de solo e água, a manutenção do espaçamento entre plantas, a produção e uso de mudas com qualidade fitossanitária e nutricional, dentre outros. As recomendações para o manejo desta doença envolvem a retirada e queima das plantas doentes e o plantio de mudas sadias (SILVA, 2008; ABREU, 2010), o que não é adotado pela maioria dos produtores de sisal.

Contudo, os sintomas da podridão vermelha têm sido constatados em mudas do tipo rebento e nos rizomas de plantas de sisal nas regiões produtoras na Bahia (ABREU, 2010; DUARTE *et al.*, 2018). Os rebentos são estruturas propagativas vegetativas assexuais, formadas a partir de rizomas subterrâneos produzidos pela planta

mãe. Estes diferem dos bulbilhos que são estruturas propagativas do sisal oriundas de brotações do pedúnculo floral da planta, no final do seu ciclo de vida, e que não apresentam contaminação pelo *A. welwitschiae*. Contudo, a propagação do sisal por bulbilhos não é uma prática comum e nem aceita pelos produtores de sisal no semiárido da Bahia, por existir a “crença” de que as plantas propagadas por bulbilhos não se desenvolvem bem e não atingem o tamanho ideal para o corte das folhas, no período de aproximadamente três anos, como ocorre com as plantas oriundas de rebentos. Os rebentos utilizados como material de propagação do sisal são colhidos nas áreas de produção de sisal, sem qualquer critério de seleção ou tratamento para prevenção da doença, e são comercializados em toda a região para o replantio das áreas existentes e plantio de áreas novas, sendo uma fonte de disseminação do patógeno.

### **Pesquisa e desenvolvimento**

A UFRB, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Embrapa Algodão, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Instituto Agrônômico de Campinas (IAC) e Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) tem colaborado em ações de pesquisa, juntamente com a Associação de Desenvolvimento Solidário e Sustentável da Região Sisaleira (APAEB), a Escola Família Agrícola do Sertão e diversos produtores de sisal da Bahia, para o desenvolvimento científico, tecnológico e de inovação desta cultura no semiárido da Bahia. Os estudos têm avançado em termos de produção de mudas de sisal com qualidade fitossanitária e nutricional, na compreensão do patossistema *Agave sisalana* — *A. welwitschiae*, e no manejo do sisal no campo, com foco no manejo de solo, da água e da conservação da caatinga. A Unicamp, no laboratório de Genômica e Bioenergia, a Embrapa Algodão e a UFRB têm ampliado o banco de germoplasma do sisal e a Unicamp tem avançado nos estudos sobre a genética e fisiologia dos diferentes acessos do sisal (MARONE *et*

*al.*, 2020). A colaboração entre os Programas de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e em Ciências Agrárias da UFRB e o Laboratório de Biologia Molecular e Computacional de Fungos (LBMCF) da UFMG tem proporcionado significativos avanços no estudo da podridão vermelha do sisal, no que se refere à etiologia da doença e a interação planta-patógeno (DUARTE *et al.*, 2018; QUINTANILHA-PEIXOTO *et al.*, 2019). Os estudos em parceria com o Grupo de Tecnologias Educacionais, Robótica e Física (GTERF) do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas (CETEC) da UFRB tem permitido avanços significativos com o uso de drones para estudos de aerobiologia em plantios de sisal (BARROS *et al.*, 2019) e de monitoramento dos plantios no semiárido da Bahia (MAGALHÃES *et al.*, 2019).

Estratégias de controle da podridão vermelha são necessárias e urgentes para a sustentabilidade e expansão desta cultura que é tão importante para a população da região semiárida na Bahia. Neste sentido, o Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB, vinculado aos Programas de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e em Ciências Agrárias, tem desenvolvido trabalhos voltados para o controle biológico da podridão vermelha do sisal, em especial com *Trichoderma* spp. (BARBOSA, 2019; SOUSA, 2019). Estudos sobre o microbioma do sisal foram desenvolvidos por Santos *et al.* (2014; 2019) com bactérias diazotróficas; Candeias *et al.* (2016) e Candeias (2017), com fungos endofíticos e de solo; Damasceno (2018) e Damasceno *et al.*, (2019), com bactérias endofíticas e de solo, ampliando a coleção de culturas para a seleção de potenciais agentes de biocontrole.

## Controle biológico

Patógenos veiculados pelo solo são de difícil controle e muitos apresentam estruturas de resistência e sobrevivem em restos de cultura (ALABOUVETTE *et al.*, 2009). O *A. welwitschiae* é um fungo presente no solo e no ar, que pode ser disseminado nesses ambientes (WHITAKER

*et al.*, 2008; BARROS *et al.*, 2019), e por meio de mudas de sisal infectadas (ABREU, 2010; DUARTE *et al.*, 2018).

O controle biológico tem se apresentado como uma opção de manejo de patógenos veiculados pelo solo (ALABOUVETTE *et al.*, 2009) e tem sido estudado para o controle de *Aspergillus spp.*, a exemplo do *Aspergillus flavus* em amendoim pré e pós-colheita (ANJIAH *et al.*, 2006) e *Aspergillus niger* também em amendoim (GAJERA; VAKHARIA, 2012). O controle biológico de doenças de plantas é definido como a “redução de inóculo ou das atividades determinantes da doença, realizada por um ou mais organismos que não o homem” (COOK; BAKER, 1983), e também como a supressão da população dos patógenos ou interferência nos mecanismos de ação destes, por organismos benéficos, comumente presentes na natureza (EILENBERG; HAJEK; LOMER, 2001). As medidas de controle biológico ou biocontrole dificilmente eliminam o patógeno completamente do ambiente, mas atuam principalmente reduzindo a veemência do inóculo ou interferindo na ação do patógeno na planta em provocar a doença, por meio de interações microbianas antagônicas como competição, parasitismo, predação, antibiose e por mecanismos de indução de resistência da planta ao patógeno (ALABOUVETTE *et al.*, 2009; SANTIAGO *et al.*, 2019).

Este método de controle tem como principal estratégia, o aumento da população natural de microrganismos antagonistas ou a introdução de agentes de biocontrole selecionados (ALABOUVETTE *et al.*, 2009). Os principais componentes requeridos em um agente de biocontrole para doenças de plantas é ser geneticamente estável, efetivo em baixas concentrações, não ter exigências nutricionais complexas, conseguir sobreviver em condições adversas, apresentar eficiência contra vários patógenos em diversos hospedeiros, se desenvolver em um meio de cultura acessível, ser de fácil cultivo e armazenamento, tolerante a pesticidas, compatível com controles físicos e químicos e não ser patogênico ao homem (CARMONA-HERNANDEZ *et al.*, 2019). Algumas dessas características, quando não ocorrem, dificultam o

desenvolvimento de produtos neste segmento (LOPES, 2009; MEDEIROS *et al.*, 2018). Apesar dos esforços de pesquisadores e da conscientização pela necessidade de se buscar uma agricultura mais sustentável e segura do ponto de vista ambiental e alimentar, o desenvolvimento e o uso de produtos para o controle biológico na produção agrícola está muito além do desejado e o investimento na área é desigual, quando comparado aos defensivos químicos e, mesmo o controle biológico sendo viável, a produção comercial segue em ritmo lento (MAZZOLA; FREILICH, 2017).

Os principais microrganismos estudados no controle biológico de doenças de plantas são os fungos e bactérias benéficos para a agricultura. Dentre os fungos, destacam-se espécies do gênero *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Clonostachys*, *Penicillium* e o oomiceto *Pythium*. Entre as bactérias, estão espécies de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Streptomyces*, *Agrobacterium*, *Pasteuria* e *Enterobacter*. Dentre os microrganismos mais estudados e utilizados no Brasil destacam-se os fungos do gênero *Trichoderma* (SILVA; MELO, 2013; MEDEIROS *et al.*, 2018). As pesquisas e o desenvolvimento de produtos com *Trichoderma* spp. vêm crescendo devido aos resultados promissores no controle de fitopatógenos (HARMAN, 2006; ALABOUVETTE *et al.*, 2009) e as características de crescimento rápido, esporulação, competência rizosférica e de colonização dos tecidos internos das plantas e sobrevivência no solo (HARMAN, 2000).

Ações de pesquisa e desenvolvimento envolvendo biofertilizantes e produtos de biocontrole devem ser estratégias prioritárias para a produção agrícola sustentável e a mitigação dos estresses abióticos e bióticos que afetam consideravelmente a produção agrícola mundial, principalmente se considerarmos a atual situação global de mudanças climáticas, que deverá afetar a produtividade agrícola e a saúde do solo, com a elevada demanda populacional por alimentos (KUMA; VERMER, 2018). Estes autores discutem que um dos desafios é a seleção de microrganismos benéficos do microbioma solo-planta, que tolerem

estresses abióticos como deficit hídrico, elevadas temperaturas, salinidade e metais pesados (KUMA; VERMER, 2018).

Nesse contexto, e considerando que no Brasil, o sisal é produzido no semiárido, podemos destacar os fungos do gênero *Trichoderma*, em especial as linhagens isoladas e selecionadas de ambientes áridos e semiáridos, como potenciais agentes para o desenvolvimento de biofertilizantes e produtos de biocontrole para a cultura do sisal. Esses fungos fazem parte do microbioma de solos e plantas em diversos ambientes, e desempenham um papel importante na tolerância de plantas a condições de estresses abióticos e bióticos (MASTOURI *et al.*, 2010; BROTMAN *et al.*, 2013; CHEPSEGON *et al.*, 2016).

### ***Trichoderma* spp.**

O gênero *Trichoderma* (fase anamórfica) foi descrito em 1794 (PERSOON, 1794), e em 1865 a sua fase teleomórfica, *Hypocrea* foi descrita pelos irmãos Tulasne, sendo esta pertencente à ordem Hypocreales e à divisão Ascomycota (GAMS; BISSETT, 2002).

Este gênero inclui fungos filamentosos, de ampla ocorrência no solo, raízes e parte aérea das plantas (HARTMAN *et al.*, 2004). São fungos de vida livre, saprotróficos, considerados oportunistas, simbiontes avirulentos de plantas e parasitas de outros fungos (HARTMAN *et al.*, 2004; GAMS; BISSETT, 2002). Tem preferência por materiais herbáceos e lenhosos, onde normalmente se encontra a fase teleomórfica (GAMS; BISSETT, 2002; HARMAN *et al.*, 2004), mas a maioria das linhagens, incluindo as com ação de biocontrole e promoção de crescimento de plantas, não apresentam esta fase de reprodução sexuada (HARMAN *et al.*, 2004).

Fungos do gênero *Trichoderma* podem atuar sobre fitopatógenos, por meio de mecanismos de competição por nutrientes e espaço, antibiose, micoparasitismo e indução de resistência a diversos patógenos (BENÍTEZ *et al.*, 2004; HARMAN, *et al.*, 2004; MUKHERJEE *et al.*, 2012; HARMAN *et al.*, 2012; STROBEL, 2003; VORHOLT, 2012).

São conhecidos pela gama de substâncias antimicrobianas e os mecanismos de ação que podem exercer sobre patógenos de plantas, sendo vistos como efetivos agentes de biocontrole (HARMAN *et al.*, 2004; SHORESH; HARMAN; MASTOURY, 2010). Diversas substâncias antimicrobianas, a exemplo das  $\beta$ -glucanases, proteases, gliotoxinas, celulases, hemicelulases, sesquiterpenos, tricocinas, dentre outras, são produzidas por *Trichoderma* spp. (HERMOSA; VITERBO; CHET, 2012; MONFIL; CASA-FLORES, 2014). Enzimas produzidas por estes fungos atuam na degradação da parede celular de outros fungos, promovendo o micoparasitismo, e na degradação de detritos vegetais, promovendo o saprofitismo (HARTMAN *et al.*, 2004).

O micoparasitismo de fitopatógenos é um importante mecanismo de ação de *Trichoderma* spp. (HARMAN *et al.*, 2004). A competição estabelecida no solo, principalmente na rizosfera devido às numerosas e complexas relações entre microrganismos, nematoides e plantas, implica em interações antagônicas nas quais, uma espécie parasita diretamente a outra, caracterizando esse processo como micoparasitismo. Essas interações antagônicas são classificadas como biotróficas e necrotróficas, as quais são baseadas na agressividade do parasita em relação ao seu hospedeiro (HERRERA-ESTRELLA; CHET, 2003). O mecanismo micoparasitário do *Trichoderma* spp. é um processo complexo. São desencadeados eventos sequenciais e cooperativos, como: crescimento quimiotrófico positivo, contato direto com o fungo hospedeiro, e enrolamento em torno das hifas do hospedeiro (HERRERA-ESTRELLA; CHET, 2003; HARMAN *et al.*, 2004). Neste processo, alterações morfológicas podem ocorrer nas hifas do *Trichoderma*, com a formação de apressório e a secreção de enzimas (celulases, quitinases, glucanases) que hidrolisam as células do hospedeiro, facilitando a penetração do fungo parasita (KUBICEK, 2001; WOO; LORITO, 2007).

Linhagens de *Trichoderma* spp. podem apresentar competência rizosférica (capacidade de colonização da rizosfera), promover a indução de resistência a patógenos, a tolerância a estresses abióticos



e o crescimento de plantas (HARMAN, 2004; MASTOURI *et al.*, 2010; BROTMAN *et al.*, 2013; CHEPSEGON *et al.*, 2016; ADNAN *et al.*, 2019). O papel de metabólitos produzidos por *Trichoderma* spp. na indução de resistência de plantas às doenças, por meio de elicitores que interagem com receptores da planta hospedeira, como, por exemplo, os peptídeos bioativos (*peptaibols*), ácido jasmônico, ácido salicílico e tricocinas, também tem sido objeto de estudo (ENGELBERTH *et al.*, 2001; HARMAN *et al.*, 2004; VITERBO *et al.*, 2007; LUO *et al.*, 2010; BROTMAN *et al.*, 2013; HIDANGMAYUM, 2018).

Diversos trabalhos têm demonstrado resultados promissores sobre a ação de metabólitos produzidos por *Trichoderma* spp. contra patógenos como: *T. harzianum* x *Fusarium moliniforme* no milho (EL-HASAN *et al.*, 2008); *Trichoderma* spp. x *Phytophthora* spp. (BAE *et al.*, 2016); *T. harzianum* x *Sclerotium rolfsii* para a podridão do caule do amendoim (BISWASS *et al.*, 2000); *Trichoderma* spp. x *Sclerotinia sclerotiorum* no mofo branco em batata (OJAGHIAN, 2011); *Trichoderma* spp. x *Fusarium solani* para a podridão de raiz preta em feijão fava (BELETE; AYALEW; AHMED, 2015); *Trichoderma* spp. x *Macrophomina phaseolina* na podridão de carvão (podridão cinza) em soja (KHALILI *et al.*, 2016); *Trichoderma* spp. x *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* no controle da murcha do meloeiro (GAVA; PINTO, 2016).

A promoção de crescimento de plantas e mitigação de estresses bióticos e abióticos são efeitos benéficos de *Trichoderma* spp. (HARMAN *et al.*, 2004). Há relatos sobre o ácido harziano, um sideróforo capaz de se ligar a íons metálicos essenciais, de boa afinidade, produzido pela espécie *Trichoderma harzianum* (VINALE *et al.*, 2013). A lactona insaturada, 6-pentil pirona (6-PP), que caracteriza algumas linhagens de *Trichoderma* com aroma de coco e exerce ação antifúngica e promotora de crescimento de plantas (VINALE *et al.*, 2009). Adicionalmente, a ACC-deaminase e o ácido-indolacético (AIA) produzidos por *Trichoderma asperellum* foram descritos promovendo o crescimento de sorgo (ANAM *et al.*, 2019).

Compostos voláteis e não-voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. vêm sendo elucidados por meio de técnicas de cromatografia gasosa e espectrometria de massas e seus efeitos no controle de diversos fitopatógenos, a exemplo do controle de *Sclerotium* sp., agente causal da podridão do caule em alface (WONGLOM *et al.*, 2019). Os compostos álcool feniletílico e sesquiterpeno (epi-cubenol) foram constatados e são conhecidos como substâncias antifúngicas. Adicionalmente, foi observada a ação de  $\beta$ -1,3-glucanase, possivelmente envolvida na degradação de parede celular do patógeno, no antagonismo de *Trichoderma* sp. sobre *Sclerotium* e os autores relataram significativa redução da severidade da doença em plantas de alface (WONGLOM *et al.*, 2019).

Alguns estudos abordaram a aplicação de *Trichoderma* spp. sobre *Aspergillus niger*. Gajera *et al.* (2016) estudaram enzimas envolvidas na ação antioxidante desencadeada por *T. viride* sobre o patossistema *A. niger* — *Arachis hypogaea*. Durante a interação tripartite, enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, guaiacol peroxidase e ascorbato peroxidase aumentaram a resposta à infecção pelo patógeno nas plantas, com atividade significativamente aumentada, sugerindo a aplicação de *T. viride* no combate às reações oxidativas causada pela invasão de fitopatógenos.

### **Biocontrole da podridão**

Os trabalhos de pesquisa sobre o controle biológico da podridão vermelha no sisal referem-se ao patossistema *A. niger* — *A. sisalana* (SÁ, 2013; MAGALHÃES *et al.*, 2017; BARBOSA *et al.*, 2018; CARMO *et al.*, 2018). Entretanto, a recém classificação do patógeno (DUARTE *et al.*, 2018) indica que esses estudos conduzidos na UFRB se referem ao patossistema *Aspergillus welwitschiae* — *Agave sisalana*.

Em relação à podridão vermelha do sisal, Magalhães *et al.* (2017) testaram isolados de *Burkholderia* spp. de área de restinga da Bahia, obtendo 54 a 77% de redução na severidade da podridão vermelha

em mudas de sisal, avaliadas em duas áreas no semiárido da Bahia. Barbosa *et al.* (2018) em estudos no semiárido da Bahia relataram que as bactérias *Brevibacterium* sp., *Bacillus* sp. e *Paenibacillus* sp. reduziram a incidência da podridão vermelha do sisal em 65, 68,3 e 56,6% respectivamente, e em 75% quando usaram o consórcio das bactérias *Serratia* sp. e *Bacillus* sp. Damasceno *et al.* (2019) obtiveram 65,8% de inibição no crescimento micelial do *A. welwitschiae* *in vitro* e a redução de até 90% na severidade da podridão vermelha em mudas de sisal em casa de vegetação, em avaliações com um isolado endofítico de *Penicillium citrinum*, obtido de plantas de sisal da região semiárida da Bahia.

Sá (2013) isolou *Trichoderma* de solo em volta de raízes de sisal, em diferentes áreas de produção no semiárido da Bahia, obtendo sete distintas espécies, em um total de 52 isolados. Nesse estudo, a redução na incidência da podridão vermelha em mudas de sisal variou entre 10 e 100%, a depender do isolado de *Trichoderma* e a região semiárida onde foram realizados os testes. Barbosa (2019) também estudou isolados de *Trichoderma* spp. endofíticos de caule, folhas e raízes de sisal, e de solo próximo às raízes de plantas de sisal e, também de solo de bananeira e folhas de goiabeira, abrangendo nove espécies distintas, pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB. Este autor constatou os mecanismos de biocontrole por competição, antibiose por compostos voláteis e não-voláteis e micoparasitismo, dependendo do isolado de *Trichoderma* spp. A interação *in vitro* *Trichoderma* spp. x *A. welwitschiae* causou inibição do crescimento micelial, da esporulação e da germinação de esporos do *A. welwitschiae* e, alguns isolados apresentaram a capacidade de micoparasitismo sobre o *A. welwitschiae*. Em mudas de sisal, dependendo do isolado de *Trichoderma* spp., a redução na incidência da doença variou de 70 a 93 % e a redução da severidade de até 97%.

Souza (2019), com base nos mecanismos de ação dos isolados de *Trichoderma* analisados por Barbosa (2019), testou a hipótese de

que a combinação de isolados com diferentes mecanismos de ação pode melhorar a eficiência de controle de fitopatógenos. Entretanto, os testes de compatibilidade entre esses isolados indicaram haver antagonismo por competição e antibiose. Mesmo apresentando antagonismo entre eles, todos os isolados de *Trichoderma*, nas formas combinadas e não combinadas, demonstraram antagonismo ao *A. welwitschiae*, sendo que os mecanismos predominantes foram de competição e antibiose. Os isolados na forma isolada ou combinada causaram inibição do crescimento micelial, esporulação e germinação de esporos de *A. welwitschiae*, sem diferença significativa em relação à maioria das combinações dos isolados, comparada à forma não combinada de inóculo. Entretanto, observou-se que os metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. exerceram forte eficácia sobre a redução dos esporos de *A. welwitschiae*, sendo algumas combinações de isolados de *Trichoderma* spp. mais eficientes, causando 100% de inibição da germinação de esporos do *A. welwitschiae*. Algumas combinações causaram a redução 62.5% na incidência e 78% na severidade da doença.

*Trichoderma* spp. produzem metabólitos secundários, a exemplo de antibióticos e enzimas líticas que podem causar redução na esporulação do *A. welwitschiae*, como demonstrado no presente estudo e por outros autores com diferentes patógenos de plantas (HARMAN *et al.*, 2004; MONFIL *et al.*, 2014; RAUT *et al.*, 2014). Metabólitos de *T. harzianum* (ácido harziânico) e *T. koningiopsis* (coninginina) são conhecidos por inibir e destruir propágulos de fungos fitopatógenos, como, por exemplo *Sclerotinium rolfsii*, *Pythium middletonii*, *Corynespora asiicola* (PUJAD-RENAUD *et al.*, 2019; SAXENA *et al.*, 2015; VINALE *et al.*, 2014). *T. saturnisporum* produz enzimas, a exemplo de -endoglucanases, capazes de inibir conídios e o crescimento de fitopatógenos, como *Fusarium oxysporum* (SHARMA *et al.*, 2018). Kumari e Singh, (2017) obtiveram resultados promissores na redução da incidência da podridão do colo do amendoim causada pelo *A. niger*, quando combinaram o fungo *T.*

*harzianum* com a bactéria *Pseudomonas fluorescens*, indicando que o consórcio/combinção de agentes de biocontrole é promissor para o controle de doenças de plantas.

Ressalta-se que os testes em casa de vegetação ocorrem sob condições controladas e com irrigação, o que não representa as condições de campo, com variações e estresses ambientais frequentes, a exemplo de estresse por déficit hídrico, elevadas temperaturas, deficiências nutricionais, dentre outros. Dessa forma, sugere-se que esses testes com *Trichoderma* spp. sejam conduzidos em condições de campo, para a seleção de isolados tolerantes às condições do semiárido, o que é de se esperar, considerando que a maioria desses isolados foi obtida de amostras de solo e plantas de sisal no semiárido da Bahia.

Os estudos com *Trichoderma* spp. desenvolvidos na UFRB apontam para a diversidade destes fungos associados ao solo e plantas de sisal no semiárido da Bahia. Estes apresentam resultados promissores no controle da podridão vermelha do sisal, com o potencial de alguns isolados serem utilizados na formulação de bioprodutos. O papel destes fungos na tolerância do sisal aos estresses abióticos também deve ser objeto de estudo. O desenvolvimento de tecnologias de produção de mudas de sisal, a exemplo da produção em larga escala por micropropagação, quando acoplado ao desenvolvimento de bioprodutos, a partir de isolados selecionados de *Trichoderma* spp. e bactérias promotoras de crescimento vegetal, poderão contribuir para a sustentabilidade da produção de sisal no semiárido da Bahia e em outras regiões do Brasil e de países produtores. O cultivo *in vitro* de sisal, para a produção de mudas com alta qualidade fisiológica e fitossanitária, tem sido objeto de estudos no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, na UFRB.

Além da produção de fios e cordas, a fibra de sisal também é utilizada na produção de tapetes e artesanato por cooperativas e associações de produtores rurais, a exemplo da Associação de Desenvolvimento Sustentável e Solidário da Região Sisaleira (APAEB), localizada no município de Valente, Bahia. Tem-se também a sua

utilização na produção de biocompósitos, em substituição parcial de fibras sintéticas de polímeros e vidro (SCOPEL *et al.*, 2013). O sisal também é considerado uma planta medicinal (DEBNATH *et al.*, 2010) e o resíduo de desfibramento das folhas tem potencial de uso na alimentação animal (FARIA *et al.*, 2008), como nematicida (JESUS *et al.*, 2014; DAMASCENO *et al.*, 2015), inseticida (SOUSA *et al.*, 2014; NUNES *et al.*, 2015) e no desenvolvimento de substâncias antimicrobianas (SANTOS *et al.*, 2009). Ressaltamos também a importância do sisal e outras plantas do gênero *Agave* como potenciais fontes de energias limpas, na produção de bioetanol de primeira e segunda geração, e de biogás, diante do atual cenário de aquecimento global e o potencial produtivo desta planta em ambientes com déficit hídrico e elevadas temperaturas, em terras consideradas marginais (YANG *et al.*, 2015; DAVIS *et al.*, 2017; MARONE *et al.*, 2020).

A comunidade científica nacional e internacional destaca o potencial da cultura do sisal e outras espécies de *Agave* no semiárido brasileiro e em diversos países. Os investimentos em ciência, tecnologia e inovação, englobando o desenvolvimento de bioprodutos e biofertilizantes são peças-chave para a expansão e sustentabilidade desta cultura.

## Referências

ABREU, K. C. L. M. **Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no estado da Bahia**. 2010. 106f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2010.

ADNAN, M. *et al.* Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with *Trichoderma* in focus. **Microbial Pathogenesis**, v. 129, p. 7-18, apr., 2019. doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.042

ALABOUVETTE, C. *et al.* Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. **New Phytologist**, v. 184, n. 3, p. 529-544, nov., 2009. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03014.x

ANAM, G. B.; REDDY, M. S.; ANH, Y. Characterization of *Trichoderma asperellum* RM-28 for its sodic/saline-alkali tolerance and plant growth promoting activities to alleviate toxicity of red mud. **Science of The Total Environment**, v. 662, p. 462-469, apr., 2019. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.01.279

ANJAIHAH, V; THAKUR, R. P.; KOEDAM, N. Evaluation of bacteria and *Trichoderma* for biocontrol of pre-harvest seed infection by *Aspergillus flavus* in groundnut. **Biocontrol Science and Technology**, v. 16, n. 4, p. 431-436, jan., 2006. doi.org/10.1080/09583150500532337

BAE, S-J. *et al.* *Trichoderma* metabolites as biological control agents against phytophthora pathogens. **Biological Control**, v. 92, p. 128-138, jan., 2016. doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.10.005

BARBOSA, L. O. **Podridão vermelha do sisal: controle com *Trichoderma* spp., escala de notas e estudos histopatológicos.** 2019. 128f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2019.

BARBOSA, L. O. *et al.* Compatibility, and combination of selected bacterial antagonists in the biocontrol of sisal bole rot disease. **BioControl**, v. 63, n. 4, p. 595-605, feb., 2018.

BARROS, M. M. G. *et al.* Amostragem aerobiológica de esporos fúngicos de *Aspergillus* negros no semiárido Baiano com uso de Drone. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 51., 2019, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, v. 1. 2019. p. 443.

BELETE, E.; AYALEW, A.; AHMED, S. Evaluation of local isolates of *Trichoderma* spp. against black root rot (*Fusarium solani*) on faba bean. **Journal of Plant Pathology and Microbiology**, v 6, n. 6, p. e1000279, jan., 2015. doi: 10.4172/2157-7471.1000279

BENÍTEZ, T. *et al.* Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 249-260, 2004.

BICKFORD, D. *et al.* Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 22, n. 3, p. 148-155, mar., 2007. doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.004

BISWAS, K. K.; SEN, C. Management of stem rot of groundnut caused by *Sclerotium rolfsii* through *Trichoderma harzianum*. **Indian Phytopathology**, v. 53, n. 3, p. 290-295, 2000.

BROTMAN, Y. *et al.* *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. **PLOS Pathogens**, v. 9, n. 3, p. e1003221, mar., 2013. doi.org/10.1371/journal.ppat.1003221

CANDEIAS, E. L. **Fungos associados à cultura do sisal: potencial de biocontrole e de promoção de crescimento**. 2016. 128f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2016.

CANDEIAS, E. L. *et al.* Fungos endofíticos de raízes de sisal antagonistas ao *Aspergillus niger*. **Agrotrópica**, v. 28, p. 29-36, 2016.

CARMO, C. O. *et al.* Fatores que afetam a sobrevivência de *Aspergillus niger* e sua relação com a podridão vermelha do caule do sisal. **Magistra**, v. 29, p. 144-153, 2018.

CARMONA-HERNANDEZ, S. *et al.* Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: A Review. **Agronomy**, v. 9, n. 3, p. 121, mar., 2019. doi:10.3390/agronomy9030121

CHEPSEYER, J.; MWAMBURI, L. A.; KIPROP, K. E. Ability of *Trichoderma harzianum* from semi-arid soils to enhance antioxidant defense of maize seedlings under water stress. **British Microbiology Research Journal**, v. 17, n. 3, p. 1-9, oct., 2016. <https://doi.org/10.9734/BMRJ/2016/26015>

CIFERRI, R. Red rot of sisal in Venezuela. **Phytopathology**, v. 41, p. 766-767, 1951.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: APS, 1983.

COUTINHO, W. M. *et al.* Bole rot of sisal caused by *Aspergillus niger* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 6, p. 605, 2006.



CRÉTENET, S.; DE RAUCOURT, B. La Sécheresse dans la Vallée du Mandrare au Cours des Années 1957 à 1959. **Mandrare l'Institut de Recherches du Coton et des Textiles Exotiques- IRCT**, 1959.

DAMASCENO, C. L. **Diversidade de bactérias associadas ao sisal e aplicação no controle biológico de *Aspergillus welwitschiae* e *Colletotrichum musae***. 2018. 156f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2018.

DAMASCENO, C. L. *et al.* *Penicillium citrinum* as a potential biocontrol agent for sisal bole rot disease. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n. 10, p. 206-216, jul., 2019. doi: 10.5539/jas.v11n10p206

DAMASCENO, J. C. A. *et al.* Sisal leaf decortication liquid residue for controlling *Meloidogyne javanica* in tomato plants. **Horticultura Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 155-162, apr./jul., 2015. doi.org/10.1590/S0102-053620150000200004

DAVIS, S. C. *et al.* Productivity and water use efficiency of *Agave americana* in the first field trial as bioenergy feedstock on arid lands. **Global Change Biology Bioenergy**, v. 9, n. 2, p. 314-325, dec., 2017. doi.org/10.1111/gcbb.12324

DEBNATH, M. *et al.* Biotechnological intervention of *Agave sisalana*: a unique fiber yielding plant with medicinal property. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 3, p. 177-187, feb., 2010.

DUARTE, E. A. A. *et al.* Putting the mess in order: *Aspergillus welwitschiae* (and not *A. niger*) is the etiological agent of sisal bole rot disease in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n.1, p. e.1227, jun., 2018. doi: 10.3389/fmicb.2018.01227

EILENBERG, J.; HAJEK, A.; LOMER, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. **BioControl**, v. 46, p. 387-400, 2001.

EL-HASAN, A.; WALKER, F.; BUCHENAUER, H. *Trichoderma harzianum* and its metabolite 6-pentyl-alpha-pyrone suppress fusaric acid produced

by *Fusarium moniliforme*. **Journal of Phytopathology**, v. 156, n. 2, p. 79-87, feb., 2008. doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01330.x

ENGELBERTH, J. *et al.* Ion channel-forming alamethicin is a potent elicitor of volatile biosynthesis and tendrils coiling. Cross talk between jasmonate and salicylate signaling in lima bean. **Plant Physiology**, v. 125, n. 1, p. 369-377, jan., 2001. doi: 10.1104/pp.125.1.369

FAO. **Food Agriculture Organization**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: 14 jul. 2020.

FARIA, M. M. S. *et al.* Composição bromatológica do coproduto do desfibramento do sisal tratado com ureia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 3, p. 377-382, 2008. doi.org/10.1590/S1516-35982008000300001

GAJERA, H. P.; VAKHARIA, D. N. Production of lytic enzymes by *Trichoderma* isolates during *in vitro* antagonism with *Aspergillus niger*, the causal agent of collar rot of peanut. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 43-52, jan./mar., 2012. doi.org/10.1590/S1517-83822012000100005

GAJERA, H. P. *et al.* Antioxidant defense response induced by *Trichoderma viride* against *Aspergillus niger* Van Tieghem causing collar rot in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Microbial Pathogenesis**, v. 91, p. 26-34, feb., 2016. doi.org/10.1016/j.micpath.2015.11.010

GAMS, W.; BISSET, J. Morphology and Identification of *Trichoderma*. *In: Trichoderma & Gliocladium. Basic biology, taxonomy, and genetics*. Kubicek, C. P.; Harman, G. E. (Eds). Taylor & Francis Press, v. 1, p. 1-31, 2002.

GAMS, W. *et al.* Infrageneric taxa of *Aspergillus*. *In: Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics*. Samson, R. A.; Pitt, J. I. (eds). New York: Plenum Press, p. 55-62, 1985.

GAVA, C. A. T.; PINTO, J. M. Biocontrol of melon wilt caused by *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *melonis* using seed treatment with *Trichoderma* spp. and liquid compost. **Biological Control**, v. 97, p. 13-20, jun., 2016. doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.02.010

GENTRY, H. S. **Agaves of Continental North America**. Tucson, AZ, E.U.: University of Arizona Press, 2004, 670p.

GAMA, E. V. S. *et al.* Homeopathic drugs to control red rot disease in sisal plants. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, n. 2, p. 649-656, oct., 2015.

GARCÍA-MENDOZA, A. J. Distribution of *Agave* (Agavaceae) in Mexico. **Cactus and Succulent Journal**, v. 74, n. 4, p. 177-188, 2002.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, n. 1, p. 205-227, mar., 2005. doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923

HARMAN, G. E. *et al.* Special issue: *Trichoderma* — from basic biology to biotechnology. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 1-2, jan., 2012. doi: 10.1099/mic.0.056424-0

HARMAN, G. E. *et al.* *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43-56, feb., 2004. doi: 10.1038/nrmicro797

HERMOSA, R. *et al.* Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 17-25, jan., 2012. doi.org/10.1099/mic.0.052274-0

HERRERA-ESTRELLA, A.; CHET, I. The biological control agent *Trichoderma*: from fundamentals to applications. In: Arora, D. K. et al. (Eds.), **Handbook of Fungal Biotechnology**, Marcel Dekker, Inc., p. 1000-1020, 2003.

HIDANGMAYUM, A.; DWIVEDI, P. Plant Responses to *Trichoderma* spp. and their tolerance to abiotic stresses: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 1, p. 758-766, 2018.

HONG, S. B.; LEE, M. A.; KIM, D. H. *Aspergillus luchuensis*, an industrially important black *Aspergillus* in East Asia. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e63769, may., 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0063769

HONG, S. B. *et al.* Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. **Mycologia**, v. 97, n. 6, p. 1316-1329, nov./dec., 2005. doi: 10.3852/mycologia.97.6.1316

JESUS, F. N. *et al.* Control of the banana burrowing nematode using sisal extract. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, p. 783-791, dec., 2014.

KHALILI, E. *et al.* Evaluation of *Trichoderma* isolates as potential biological control agent against soybean charcoal rot disease caused by *Macrophomina phaseolina*. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 30, n. 3, p. 479-488, feb., 2016. doi.org/10.1080/13102818.2016.1147334

KUBICEK, C. P. *et al.* Trichoderma: from genes to biocontrol. **Journal of Plant Pathology**, v. 83, n. 2, p. 11-23, 2001.

KUMARI, M.; SINGH, M. Management of collar rot disease of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) caused by *Aspergillus niger* through bio-agents. **International Journal of Chemical Studies**, v. 5, n. 4, p. 73-76, 2017.

KUMAR, A.; VERMA, J. P. Does plant-microbe interaction confer stress tolerance in plants? A review. **Microbiological Research**, v. 207, p. 41-52, mar., 2018. doi: 10.1016/j.micres.2017.11.004

LIMA, E. F. *et al.* Podridão vermelha do tronco do sisal (*Agave sisalana* Perr.) causada por *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 2, n. 2, p. 109-112, 1998.

LOPES, R. B. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microrganismos no Brasil. *In*: Bettiol, W.; Morandi, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. 1 ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v. 1, p. 15-28, 2009.

LUO, Y. *et al.* Antimicrobial peptaibols induce defense responses and systemic resistance in tobacco against tobacco mosaic virus. **FEMS Microbiology Letters**, v. 313, n. 2, p. 120-126, dec., 2010. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02135.x

MACHADO, A. A. Sobre a ocorrência de uma nova moléstia do agave na Paraíba. **Relatório de uma viagem realizada no município de Campina Grande**, em 19 de setembro de 1951.

MAGALHÃES, J. R. G. *et al.* Imageamento multiespectral com drone na avaliação de plantas doentes e sadias de sisal (*Agave sisalana* Perr.) no semiárido da Bahia. *In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia*, 51, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, v. 1. p. 650, 2019.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Mercado de biodefensivos cresce mais de 70% no Brasil em um ano. MAPA, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/feffmercado-de-biodefensivos-cresce-em-mais-de-50-no-brasil>. Acesso em: 26 de jun. 2020.

MARONE, M. P. *et al.* Sisal: de um passado rústico para um futuro brilhante. *In: Santos, C. C. (Org.). O semiárido brasileiro e suas especificidades 2*. Ponta Grossa: Atena, p. 40-57, 2020.

MASTOURI, F.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G. E. Seed Treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. **Phytopathology**, v. 100, n. 11, p. 1213-21, nov., 2010. doi: 10.1094/PHYTO-03-10-0091

MAZZOLA, M.; FREILICH, S. Prospects for biological soilborne disease control: application of indigenous versus synthetic microbiomes. **Phytopathology**, v. 107, n. 3, p. 256-263, mar., 2017. doi.org/10.1094/PHYTO-09-16-0330-RVW

MYCOBANK: **Fungal database, nomenclatures, and species banks**. 2017. Disponível em: <http://www.mycobank.org/>. Acesso em: set. 2017.

MEDEIROS, F. H. V.; SILVA, J. C. P.; PASCHOLATI, S. F. Controle biológico de doenças de plantas. *In: Amorim, L.; Resende, J. A. M.; Bergamin Filho, A. (Eds.). Manual de fitopatologia*. 5. ed., Piracicaba: Agronômica Ceres, v.1, p. 261- 272, 2018.

MEDINA, J. C. **O sisal**. São Paulo: Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, 1954.

MONFIL V. O.; CASAS-FLORES, S. Molecular Mechanisms of Biocontrol in *Trichoderma* spp. and their applications in agriculture. In: Gupta, V. K. et al. (Eds). **Biocontrol and Plant Growth Promotion**. México: Elsevier, p. 429-452, 2014.

MUKHERJEE, M. et al. *Trichoderma* – Plant –Pathogen Interactions: advances in genetics of biological control. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 522-529, dec., 2012. doi: 10.1007/s12088-012-0308-5

NUNES, F. C. et al. The larvicidal activity of *Agave sisalana* against L4 larvae of *Aedes aegypti* is mediated by internal necrosis and inhibition of nitric oxide production. **Parasitology Research**, v. 114, n. 2, p.543-549, feb., 2015. doi: 10.1007/s00436-014-4216-y

OJAGHIAN, M. R. Potential of *Trichoderma* spp. and *Talaromyces flavus* for biological control of potato stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytoparasitica**, v. 39, n. 2, p. 185-193, oct., 2011. doi: 10.1007/s12600-011-0153-9

PERSOON, C. H. Disposita methodica fungorum. **Römer'sNeues Mag Bot**, v. 1794, n. 1, p. 81-128, 1794.

PUJADE-RENAUD, V. et al. Endophytes from wild rubber trees as antagonists of the pathogen *Corynespora cassicola*. **Phytopathology**, v. 109, n. 11, p. 1888-1899, sep., 2019. doi.org/10.1094/PHYTO-03-19-0093-R

QUINTANILHA-PEIXOTO, G. et al. Calm Before the Storm: A glimpse into the secondary metabolism of *Aspergillus welwitschiae*, the etiologic agent of the sisal bole rot. **Toxins**, v. 11, n. 11, p. 631, 2019. doi: 10.3390/toxins11110631

RAUT, I. et al. Effect of volatile and non-volatile metabolites from *Trichoderma* spp. against important phytopathogens. **Revista de Chimie**, v. 65, n. 11, p. 1285-1288, 2014.

SÁ, J. O. **Controle biológico da podridão vermelha do sisal (*Agave sisalana* Perrine) com *Trichoderma* spp. e actinobactérias**. 2013. 155f.

Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2013.

SANTIAGO, M. F. *et al.* Manejo integrado da fusariose da palma forrageira em Pernambuco. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 16, n. 2, p. 51-64, 2019.

SANTOS, J. D. G. *et al.* Antimicrobial activity of *Agave sisalana*. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 22, p. 6181-6184, 2009. doi: 10.5897/AJB09.862

SANTOS, A. F. J. *et al.* Diazotrophic bacteria associated with sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm): potential for plant growth promotion. **Plant and Soil**, v. 385, p. 37-48, aug., 2014.

SANTOS, A. F. J. *et al.* Culturable diazotrophic bacterial community associated with *Agave sisalana* plants from semi-arid regions in Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 14, p. 1-10, 2019.

SAMSON, R. A. *et al.* Phylogeny, identification, and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 141-173, jun., 2014. doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004

SANTOS, P. O. D. *et al.* Additional species of *Aspergillus* causing bole rot disease in *Agave sisalana*. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 4, p. 331-334, jul./aug., 2014. doi.org/10.1590/S1982-56762014000400008

SAXENA, A.; RAGHUWANSHI R.; SINGH, H. B. Trichoderma species mediated differential tolerance against biotic stress of phytopathogens in *Cicer arietinum* L. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 195-206, feb., 2015. doi: 10.1002/jobm.201400317

SCOPEL, F.; GREGOLIN, J. A. R.; FARIA, L. D. Tendências tecnológicas do uso do sisal em compósitos a partir da prospecção em documentos de patentes. **Polímeros**, v. 23, n. 4, p 514-520, aug., 2013. doi.org/10.4322/polimeros.2013.044

SHARMA, V.; SALWAN, R.; SHANMUGAM. Molecular characterization of -endoglucanase from antagonistic *Trichoderma saturnisporum* isolate

GITX – Panog (C) induced under mycoparasitic conditions. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 149, p. 73-80, jul., 2018. doi: 10.1016/j.pestbp.2018.06.001

SILVA, O. R. R. F. *et al.* Cultivo do Sisal no Nordeste Brasileiro. **Circular Técnica**, v. 123, p. 1-24, 2008.

SILVA, E. K. C.; MELO, L. G. L. Manejo de doenças de plantas: um enfoque agroecológico. **Revista EDUCAmazônia - Educação Sociedade e Meio Ambiente**, v. 10, n. 1, p. 143-157, 2013.

SINDIFIBRAS. **Notas de referência sobre a cadeia produtiva do sisal na Bahia**. Disponível em: [http://arquivos.sindicatodaindustria.com.br/app/cni\\_sindicatos/2011/01/10/123/20200804145826548397i.pdf](http://arquivos.sindicatodaindustria.com.br/app/cni_sindicatos/2011/01/10/123/20200804145826548397i.pdf). Acesso em: 16 de ago. 2020.

SHORESH, M.; HARMAN, G. E.; MASTOURY, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, p. 21-43, 2010. doi: 10.1146/annurev-phyto-073009-114450

SOUSA, R. A. **Combinação de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle da podridão vermelha do sisal**. 2019. 61f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2019.

SOUSA, P. A. P. *et al.* Efeitos do resíduo líquido da *Agave sisalana* sobre pupas do mosquito *Aedes aegypti*. **Revista Saúde Ciência**, v. 3, p. 275-278, 2014.

SUINAGA, F. A.; SILVA, O. R. R. F.; COUTINHO, W. M. *In*: Andrade, W. (Ed.). **O Sisal do Brasil**. 1. ed, Salvador, 2006.

SUSCA, A. *et al.* Variation in fumonisin and ochratoxin production associated with differences in biosynthetic gene content in *Aspergillus niger* and *A. welwitschiae* isolates from multiple crop and geographic origins. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. e1412, sep., 2016. doi: 10.3389/fmicb.2016.01412



STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, n. 4, p. 491-502, dec., 2003. doi: 10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003

VARGA, J. *et al.* New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, v. 69, n. 1, p. 1-17, jun., 2011. doi: 10.3114/sim.2011.69.01

VINALE, F. *et al.* Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 705-711, jun., 2009. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02599.x

VINALE, F. *et al.* 2013. Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 347, p. 123-129, oct., 2013. doi.org/10.1111/1574-6968.12231

VINALE, F. *et al.* *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. **The Open Mycology Journal**, v. 8, p. 127-139, jul., 2014. doi: 10.2174/1874437001408010127

VITERBO, A. *et al.* The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defense responses. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 6, p. 737-746, nov., 2007. doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00430.x

VORHOLT, J. A. Microbial life in the phyllosphere. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 10, n. 12, p. 828-40, nov., 2012.

WALLACE, G. B. Tanganyika Territory Department of Agriculture, Plant Pathology Laboratory: Memorandum of Sisal Diseases. Dar es Salaam, 1937.

WALLACE, G. B.; DIECKMAHNS, E. C. Bole rot in sisal. **East African Agricultural Journal**, v. 18, n.1, p. 24-29, 1952.

WHITAKER, C.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Infection of the cone sand seeds of *Welwitschia mirabilis* by *Aspergillus niger* var. *phoenicis* in the

Namib-Naukluft Park. **South African Journal of Botany**, v. 74, n. 1, p. 41-50, jan., 2008. doi.org/10.1016/j.sajb.2007.08.008

WONGLOM, P. *et al.* Biological control of sclerotium fruit rot of snake fruit and stem rot of lettuce by *Trichoderma* sp. T76-12/2 and the mechanisms involved. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 107, p. 1-7, aug., 2019. doi.org/10.1016/j.pmpp.2019.04.007

WOO, S. L.; LORITO, M. Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens, and the plant for biocontrol. *In*: Vurro, M.; Gressel, J. (eds.). **Novel biotechnologies for biocontrol agent enhancement and management**. Springer, p.107-130, 2007.

YANG, X. *et al.* A roadmap for research on crassulacean acid metabolism (CAM) to enhance sustainable food and bioenergy production in a hotter, drier world. **New Phytologist**, v. 207, n. 3, p. 491-504, aug., 2015. doi: 10.1111/nph.13393

# Diversidade Taxonômica e Identificação de *Trichoderma*

Lucas Souza Sales  
Valter Cruz-Magalhães  
Djalma Santana Neto  
Jackeline Pereira Andrade  
Cristiane Nascimento Figueiredo  
Harisson Guimarães de Souza  
Jorge Teodoro de Souza  
Phellippe Arthur Santos Marbach

## Importância do gênero *Trichoderma*

*Trichoderma* (Hypocreales, Ascomycota) é um gênero que abriga mais de 300 espécies (<http://www.mycobank.org/>). Os membros desse gênero apresentam alta capacidade adaptativa, que favorece a sua presença nos ambientes mais distintos na natureza, sob diferentes condições climáticas (HARMAN *et al.*, 2004; CHAVERRI; GAZIS; SAMUELS, 2011; LÓPEZ-QUINTERO *et al.*, 2013). A notória versatilidade na aquisição de nutrientes apresentada pelas espécies desse gênero é reflexo das diferentes formas pelas quais elas podem adquirir nutrientes: saprotrofia, micotrofia e absorção de açúcares oriundos de plantas (interações biotróficas) (LÓPEZ-BUCIO; PELAGIO-FLORES; HERRERA-ESTRELLA, 2015). Esses microrganismos são encontrados na matéria orgânica vegetal em decomposição, no solo, no ambiente rizosférico, em ambientes marinhos e colonizando tecidos internos das plantas (CHAVERRI; GAZIS; SAMUELS, 2011; LÓPEZ-QUINTERO *et al.*, 2013; MUKHERJEE *et al.*, 2013; RUIZ *et al.*, 2013).

O gênero *Trichoderma* se destaca pela sua importância ecológica e biotecnológica, incluindo espécies que degradam matéria orgânica vegetal, micoparasitas, endofíticas e que estão envolvidas na proteção de plantas por meio da supressão de doenças e/ou promoção de crescimento

(MUKHERJEE *et al.*, 2013). A capacidade de biodegradação de *Trichoderma* é explorada na biorremediação de resíduos poluentes no meio ambiente, por meio da remediação de metais pesados, toxinas (ex.: cianeto) e substâncias xenobióticas (HARMAN, 2006; SCHUSTER e SCHMOLL, 2010). *Trichoderma* produz enzimas de interesse industrial como quitinases (endoquitinases, exoquitinases e  $\beta$ -1,4-N-acetilglucosaminidases), celulases (Celobiohidrolase I e II e endoglucanase) e proteases (DE MARCO *et al.*, 2000). Em condições naturais essas enzimas são produzidas por *Trichoderma* durante o processo de micoparasitismo, degradação da matéria orgânica vegetal ou quando atuam como endofíticos (LORITO *et al.*, 2004; TROIAN *et al.*, 2014).

*Trichoderma reesei* está entre as espécies mais estudadas para fins de produção de enzimas, sendo uma importante fonte industrial de celulases e hemicelulases (KUBICEK *et al.*, 2019). Por ser considerada uma “fábrica celular” de produção de compostos químicos valiosos, essa espécie foi engenheirada ao longo de anos, visando à otimização da produção de enzimas (SEIBOTH *et al.*, 2011). Além disso, *T. reesei* tem sido utilizado como sistema heterólogo para a produção de proteínas de outros organismos (QIN *et al.*, 2012). Todas essas características tornaram essa espécie o modelo preferencial de estudos voltados para a produção de enzimas destinadas à degradação de resíduos vegetais para a produção de biocombustível (GORSCHE *et al.*, 2013).

Espécies de *Trichoderma* são usadas na agricultura como: (i) agentes de controle biológico de doenças de plantas (EL-KOMY *et al.*, 2015; LOGUERCIO *et al.*, 2009; SAHEBANI; HADAVI, 2008); (ii) promotoras de crescimento de plantas (SALAS-MARINA *et al.*, 2011); (iii) responsáveis por aliviar diferentes condições de estresses abióticos em plantas (WOO *et al.*, 2014); (iv) capazes de contribuir com a disponibilização e uso de nutrientes nos ecossistemas agrícolas e, em muitos casos (v) induzem mecanismos de defesa vegetal contra fitopatógenos (HARMAN *et al.*, 2004; SALAS-MARINA *et al.*, 2011). Essa versatilidade do uso de *Trichoderma* na agricultura decorre da sua capacidade de

competição, antibiose, hiperparasitismo, indução de resistência sistêmica de plantas a patógenos, promoção de crescimento de plantas e micoparasitismo (HARMAN, 2006).

O bom desempenho apresentado por esses microrganismos nos ambientes agrícolas faz com que existam diversos produtos comerciais à base de *Trichoderma* disponíveis no mercado (WOO *et al.*, 2014). Esses produtos incluem biofungicidas, biopesticidas e biofertilizantes (WOO *et al.*, 2014; GUPTA *et al.*, 2016). No controle biológico de fitopatógenos, *T. stromaticum* pode controlar *Moniliophthora perniciosa*, causador da vassoura-de-bruxa que infecta o cacau (LOGUERCIO *et al.*, 2009). *Trichoderma rossicum* é indicado para o solo, com ótimos resultados como condicionador de solos de pastagens (ZHANG *et al.*, 2018). As espécies *T. viride* e *T. harzianum* são produtos registrados indicados como biopesticidas (GUPTA *et al.*, 2010).

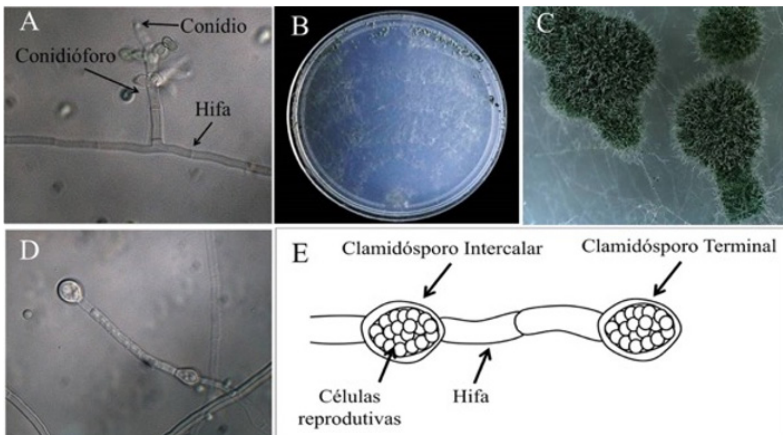
A maior parte das aplicações relatadas para o gênero *Trichoderma* é voltada para a agricultura e indústria enzimática. No entanto, diversos estudos vêm mostrando o potencial desse gênero para a produção de compostos voltados ao uso farmacêutico (RUIZ *et al.*, 2013; KHAMTHONG *et al.*, 2012). Espécies de *Trichoderma* também são importantes fontes de metabólitos com atividade antibiótica (antraquinona, harzianodiona, gliotoxina), antifúngica (compostos fenólicos, harzianopiridona, viridofungina e trichodermamides) e drogas anticâncer como o viridiol; (SIVASITHAMPARAM; GHISALBERTI, 1998; MUKHERJEE *et al.*, 2013). Vários dos compostos de *Trichoderma* spp. que apresentam algum potencial farmacológico são oriundos de isolados endofíticos e marinhos (LI *et al.*, 2010; RUIZ *et al.*, 2013).

Além das atividades antimicrobianas e antifúngicas já conhecidas, metabólitos produzidos por *Trichoderma* spp. vem apresentando atividades bioativas diversas como: antiparasitária, anticâncer entre outras (ABDEL-LATEFF; FISCH; WRIGHT, 2009; SHI *et al.*, 2010). Estes resultados mostram que o gênero *Trichoderma* também é um reservatório de novas moléculas com potencial para aplicações na indústria farmacêutica a ser explorado nas próximas décadas.

## Morfologia e reprodução

As espécies do gênero *Trichoderma* são típicos fungos filamentosos, ou seja, são constituídas por elementos multicelulares em forma de tubos denominados hifas (Figura 1A), cujo conjunto forma o micélio (Figura 1B). As hifas são septadas, uma característica comum às espécies do Filo *Ascomycota*, ao qual esse gênero pertence. A partir das hifas são formados os conidióforos e clamidósporos, estruturas envolvidas na reprodução assexuada e resistência a condições adversas, respectivamente. Os conidióforos formam esporos assexuais denominados conídios (Figura 1A). Já o clamidósporo é uma estrutura vegetativa multicelular com paredes espessas e lisas, apresentam função de resistência, possui disposição intercalar, quando está entre duas células da hifa, ou terminal, quando se localiza nas extremidades das hifas (Figura 1D-E). Os clamidósporos possuem forma globosa ou elipsoide, coloração incolor ou amarelada e não são encontrados em todas as espécies do gênero *Trichoderma*, contudo, quando presentes, podem ser abundantes ou infrequentes (KUBICEK; HARMAN, 1998).

**Figura 1.** Representação de estruturas morfológicas de espécies de *Trichoderma*, A) Hifa e conidióforo; B) Micélio; C) Pústulas; D) Micrografia de um clamidósporo real; E) Esquema de um clamidósporo esquemático.



Fonte: Lucas Sales.

Uma característica comum nas espécies do gênero *Trichoderma* é a formação de agregados compactados de hifas, conidióforos e conídios formando estruturas que se assemelham a tufos denominados de pústulas, cuja coloração varia do verde-escuro ao amarelo (Figura 1C). As pústulas se formam durante a produção em grande escala de conídios que se agregam e se compactam levando ao entrelaçamento com o micélio e os conidióforos (MELO; FAULL, 2004).

Em geral, espécies de *Trichoderma* possuem rápido crescimento micelial em diferentes meios de cultura, cobrindo toda a superfície do meio de cultura em menos de uma semana. Além disso, são capazes de crescer em uma ampla faixa de temperatura e em diferentes condições de luminosidade. Quando em cultura, inicialmente formam um micélio aéreo ou sob o meio de cultura (Figura 1B), com coloração hialina e textura flocosa, lanosa ou delgada. Após o início do processo de conidiação (produção de conídios), o micélio tende a adquirir coloração que pode variar do verde-escuro ao amarelo. Muitas espécies produzem odores característicos, por exemplo, *T. ingratum*, *T. polypori* e *T. harzianum* cuja cultura possui cheiro de coco (CHEN; ZHUANG, 2017; KUBICEK; HARMAN, 1998).

A conformação dos conidióforos das espécies do gênero *Trichoderma* pode variar de estruturas bastante ramificadas com muitas fiálides, pouco ramificadas com muitas ou poucas fiálides e pouco ramificadas contendo fiálides na sua base e com estruturas longas e frequentemente férteis em seu ápice (Figura 2). Os tipos mais frequentes são identificados como: *Trichoderma*-like, *Pachybasium*-like, *Verticillium*-like e *Gliocladium*-like (CHAVERRI; SAMUELS, 2003) (Figura 2). Os conidióforos *Trichoderma*-like são longos, espaçados e possuem eixos principais com ramificações regulares ou em intervalos dando origem a diferentes níveis dentro do conidióforo, criando um sistema de ramificações primárias e secundárias. Estes ramos podem se apresentar de maneira divergente, solitárias, pareadas ou em vértices, dando origem a estruturas piramidais ou em formato de "árvore". Conidióforos

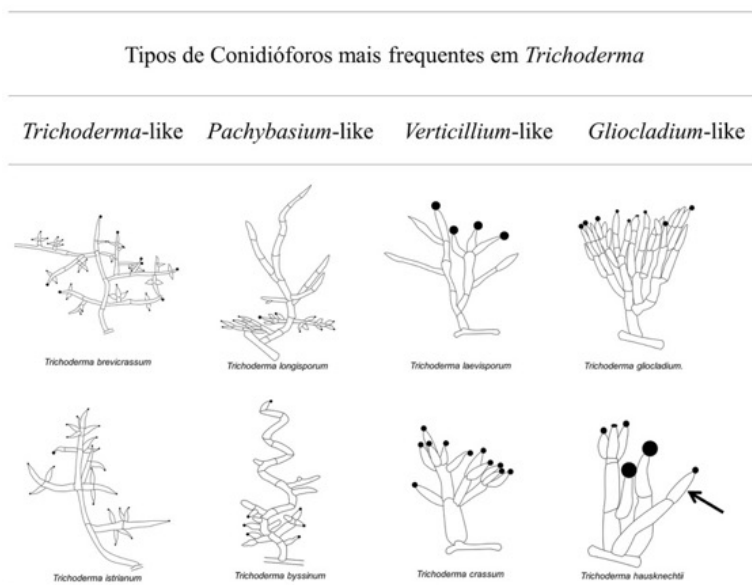
*Pachybasium*-like possuem conformação ampla, com pequenos ramos com fiálides surgindo da base de maneira variável que se repetem de maneira indefinida (Figura 2). Ao longo do eixo do conidióforo podem surgir ramos frequentemente férteis, além disso, apresentam quase que regular de ramos longos visíveis e frequentemente estéreis no eixo principal do conidióforo (BISSETT, 1991b). Conidióforos *Verticillium*-like, são ramos curtos e simples com um único eixo principal, de onde surgem ramos primários e secundários com ângulos curvados ao eixo principal e que podem possuir em seus terminais uma ou três fiálides (Figura 2) (CHAVERRI; SAMUELS, 2003). Os conidióforos *Gliocladium*-like possuem ramos estreitos que não variam em comprimento e que se curvam em direção ao ápice com as fiálides, dando origem a uma estrutura quase simétrica (CHAVERRI; SAMUELS, 2003) (Figura 2).

Células conidiogênicas ou fiálides fazem parte do conidióforo e produzem os conídios por mitose. Estas células variam quanto ao tamanho e forma sendo um importante caracter taxonômico útil na identificação das espécies de *Trichoderma*. Elas estão normalmente presentes nas regiões terminais dos conidióforos e abaixo do septo nas ramificações. Suas formas mais comuns são ampuliformes, langeniformes ou subulato (Figura 3).

Os conídios das espécies de *Trichoderma* também variam quanto ao tamanho e forma o que lhes confere importância taxonômica e são comumente identificados como: globoso, subgloboso, apiculado, oblongo, estreitamente oblongo, elipsoide, obovoide e ovoide, com textura lisa ou rugosa. Eles podem apresentar projeções específicas em sua forma e variam na sua coloração, que pode ser hialina, amarelada, verde, acinzentada ou marrom (Figura 4).

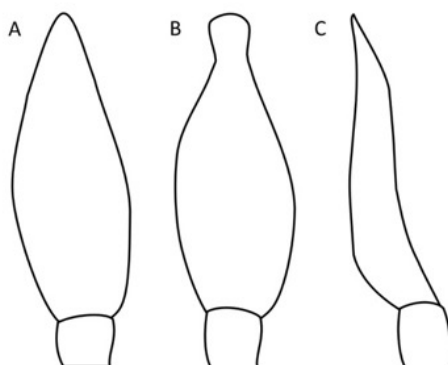


**Figura 2.** Conformações mais frequentes de conidióforos encontrados nas espécies de *Trichoderma*. A seta indica as células conidiogênicas ou fiáldes e os círculos de cor preta representam os conídios



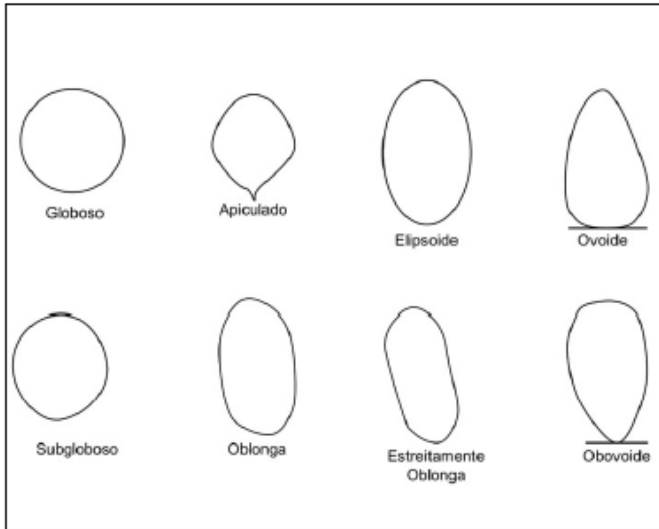
Fonte: Lucas Sales.

**Figura 3.** Tipos de fiáldes mais frequentes em *Trichoderma*. (A) Fiáldes Langeniforme; (B) Ampuliforme; (C) Subulato.



Fonte: Lucas Sales.

**Figura 4.** Formas de conídios mais comuns das espécies do gênero *Trichoderma*.



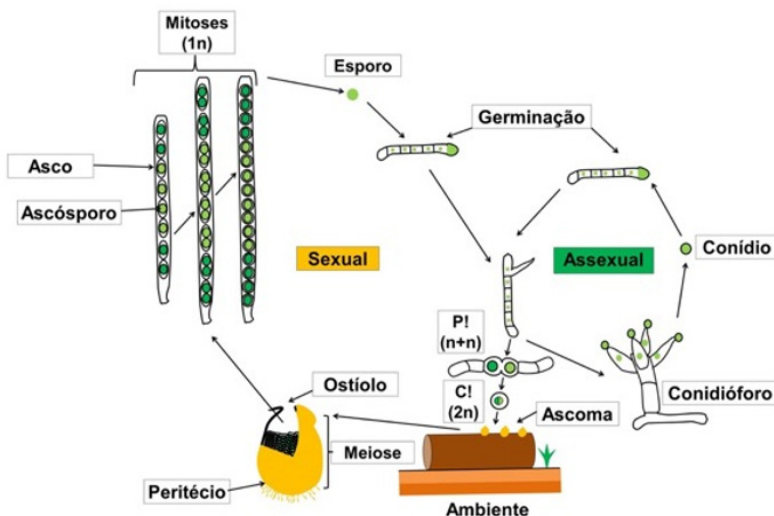
Fonte: Lucas Sales.

As características morfológicas apresentadas acima são úteis para a taxonomia de *Trichoderma*, pois algumas delas podem ser usadas para distinguir seções/clados ou mesmo espécies do gênero. Além disso, fazem parte das características que são usadas para a descrição de novas espécies do gênero.

Os fungos em sua totalidade possuem um ciclo de vida composto por duas fases, uma sexuada e outra assexuada, compreendendo às duas formas de reprodução celular, mitose e meiose. Devido a essa alternância na reprodução e na morfologia os fungos são considerados espécies pleomórficas, ou seja, possuem uma morfologia distinta em cada fase do seu ciclo de vida. Em função dessa alternância morfológica foi criado uma denominação para cada fase morfosexual dos fungos, que são: Anamorfo, Teleomorfo e Holomorfo (REYNOLDS, 1987). Teleomorfo é a designação dada à forma sexuada de um fungo, anamorfo refere-se à sua forma assexuada e holomorfo é a designação que inclui tanto a fase sexuada como a assexuada do fungo.

As condições necessárias para a reprodução sexual de *Trichoderma* estão atreladas a fatores genéticos pré-existentes associados a genes de reprodução do tipo *MAT1* (SEIDL *et al.*, 2009). Quando um fungo com o gene *MAT1-1*, se encontra com o outro fungo portador do gene *MAT1-2*, ocorre a fusão do protoplasma das hifas apicais, em um processo denominado plasmogamia. Após a fusão das hifas ocorre a doação de núcleos pelo anterídio (gametângio masculino) para o ascogônio (gametângio feminino) por tricógenos que são extensões filamentosas projetadas pelo ascogônio, dando origem a hifas dicarióticas e futuramente ao corpo de frutificação (KENDRICK, 2001). Dentro do asco, ocorre a meiose seguida de duas mitoses dando origem a 16 núcleos haplóides que são envolvidos por porções citoplasmáticas formando os ascósporos localizados dentro uma estrutura denominada asco (KENDRICK, 2001). Após a maturação o asco se rompe lançando os ascósporos no ambiente, onde germinarão e darão continuidade ao ciclo de vida desse organismo (Figura 5).

**Figura 5.** Representação do ciclo de vida sexual e assexuado de espécies de *Trichoderma*, (P!) Plasmogamia; (C!) Cariogamia.



Fonte: Lucas Sales.

## Histórico da taxonomia

O gênero *Trichoderma* pertencente ao Filo *Ascomycota*, Classe *Sordariomycetes*, subclasse *Hypocreomycetidae*, Ordem *Hypocreales* e Família *Hypocreaceae*. Este gênero foi descrito por Christiaan Hendrik Persoon (*Pers.*) em 1794 em seu manuscrito *Neuer Versuch einer systematischen Eintheilung der Schwämme*. As primeiras espécies descritas por Persoon nessa época foram, *T. viride*, *T. aureum*, *T. nigrescens*, *T. roseum* todos isolados a partir de materiais coletados na Alemanha. Atualmente apenas *T. viride* permanece no gênero, as demais foram realocadas para outros gêneros.

Em 1825, Ellias Freis (*Fr.*) descreveu o gênero *Hypocrea* baseado na amostra de *Sphaeria rufa Pers.* que, por sua vez, foi renomeada para *Hypocrea rufa* (*Pers.*) *Fr.* Contudo, nessa época ambos os gêneros não estavam relacionados entre si, mesmo representando fases de vida diferentes de um único gênero. Somente em 1865, os irmãos Ludovicus-Renatus Tulasne e Carolus Tulasne, relatam que *T. viride* era anamorfo de *H. rufa*. Essa descoberta fez com que Bisby, em 1939, propusesse reduzir todas as espécies do gênero a *T. viride* devido à dificuldade de diferenciação entre elas, por falta de caracteres confiáveis para distingui-las. Segundo Bisby, não era possível distinguir culturas de *H. rufa* e *H. gelatinosa* e os isolados que se desenvolvia do estroma de *H. rufa* eram variáveis morfologicamente, levando a concluir que *Trichoderma* era um gênero monotipo e que *H. gelatinosa* era uma forma de crescimento diferente ou madura de *H. rufa*.

Em 1969, Mien A. Rifai revisou o gênero *Trichoderma*, e mostrou que características como disposição das ramificações dos conidióforos, disposição das fiálides e características dos conídios poderiam ser utilizadas para a diferenciação dos isolados de *Trichoderma*. Por exemplo, ele demonstrou que *T. viride* era a única espécie com conídios verrugosos e globosos, dentre as espécies analisadas. Rifai agrupou as espécies de *Trichoderma* em nove "agregados de espécies": *T. aureoviride* Rifai, *T. hamatum* (Bonord.) Bain., *T. harzianum* Rifai, *T. koningii* Oudem.,

*T. longibrachiatum* Rifai, *T. piluliferum* Rifai, *T. polysporum* (Link: Fr.) Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai, e *T. viride*. Posteriormente, Bissett (1984, 1991a, 1991b, 1991c) revisou de maneira sistemática os agregados de espécies proposto por Rifai utilizando a mesma metodologia. Além disso, Bisset analisou caracteres microscópicos e fisiológicos adicionais, por exemplo, comprimento e largura dos ápices das fiálides, comprimento e largura da base da fiálide, largura das células que antecedem as fiálides, taxa de crescimento após três dias de crescimento e tipo de pigmento solúvel. Como resultado ele reagrupou os agregados de Rifai em cinco seções: *Longibrachiatum*, *Pachybasium*, *Trichoderma*, *Saturnisporum*, *Hypocreanum* e algumas linhagens solitárias, defendendo a existência de 27 espécies morfológicas.

A inclusão de ferramentas moleculares nos estudos de diversidade de *Trichoderma* mudou mais uma vez o cenário da taxonomia do gênero. As conclusões de alguns estudos de diversidade genética usando marcadores moleculares eram incongruentes com a taxonomia vigente do gênero. Por exemplo, os resultados obtidos por Fujimori e Okuda (1994) usando RAPD (Amplificação aleatória de DNA polimórfico) indicaram que *T. harzianum* era um táxon polifilético. Mais tarde, verificou-se que esse táxon era um complexo de espécie (DRUZHININA *et al.*, 2010). *Trichoderma reesei* foi classificado como *T. longibrachiatum* nos esquemas taxonômico propostos por Rifai (1969) e Bisset (1984). Contudo, Mayer *et al.* (1992) mostraram, com base em análises com o marcador molecular RFLP (polimorfismo de fragmentos de restrição), que *T. reesei* não era sinônimo de *T. longibrachiatum*. Esse reposicionamento taxonômico de *T. reesei* teve importância aplicada, pois a maior parte das pesquisas sobre celulasas fúngicas foi realizada com isolados dessa espécie, que também é amplamente usada na produção industrial dessa enzima.

O esquema taxonômico proposto por Bisset entre 1984 e 1991 foi revisto pouco tempo depois da sua implementação, quando análises filogenéticas utilizando sequências de nucleotídeos foram

incorporadas nos estudos de taxonomia e diversidade de *Trichoderma*. As primeiras filogenias moleculares do gênero *Trichoderma* foram realizadas com sequências nucleotídicas da região espaçadora interna transcrita 1 e 2 (ITS1 e ITS2) do *operon* dos RNAs ribossomais e o gene que codifica o RNA ribossomal 5.8S. Estes estudos mostraram que *Hypocrea jecorina* era o teleomorfo de *T. reesei* (KUHLS *et al.*, 1996). Essa descoberta possibilitou explorar o uso de recombinantes genéticos da espécie na otimização da produção industrial de enzimas celulolíticas. Filogenias moleculares com o ITS1 e ITS2 não deram suporte à separação das seções *Longibrachiatum* e *Saturnisporum*, indicando que elas deveriam ser fusionadas (KUHLS *et al.*, 1997) e também mostraram que a seção *Pachybasium* não era monofilética (KINDERMANN *et al.* 1998). De fato, *Longibrachiatum* e *Trichoderma* foram a únicas seções do esquema taxonômico de Bisset que tiveram suporte nas filogenias com os ITS1 e ITS2 ou outros genes (KUHLS *et al.*, 1997; KULLNIG-GRADINGER *et al.*, 2002). Estes resultados mostraram que a taxonomia de *Trichoderma* ainda era uma questão pouco resolvida.

Apesar das filogenias com os ITS1 e ITS2 terem trazido avanços na compreensão da diversidade e taxonomia de *Trichoderma*, estes marcadores não tinham sinal filogenético suficiente para resolver as novas questões taxonômicas do gênero. A solução foi acrescentar outras regiões genômicas nas análises para obter sinal filogenético suficiente para discriminar a diversidade interespecífica, possibilitando maior precisão na definição e identificação das espécies do gênero e de taxas superiores. Usando essa abordagem Kullnig-Gradinger *et al.* (2002) fizeram uma filogenia molecular combinada com os ITS1 e ITS2, com as regiões D1 e D2 do gene que codifica o rRNA 28S, com o gene que codifica a subunidade menor do rRNA mitocondrial, com um fragmento do fator de alongamento de tradução 1-alfa (*teF1*) e com um fragmento do gene que codifica a endoquitinase 42 (*ech42*) para inferir sobre as relações filogenéticas das espécies de *Trichoderma*. A análise filogenética confirmou a monofilia do gênero *Trichoderma* e das seções

*Longibrachiatum* e *Trichoderma* e forneceu a primeira base filogenética para a subdivisão das seções *Hypocreanum* e *Pachybasium*. Mais tarde, com a inclusão de novas espécies, estes subclados foram identificados, como subclado *Harzianum*, clado *Spirale*, clado *Polysporum* entre outros (DRUZHININA *et al.*, 2010; JAKLITSCH, 2011; CHEN; ZHUANG, 2017).

Druzhinina *et al.* (2005), propuseram o uso do ITS1 e ITS2 como *barcode* do gênero *Trichoderma* e criaram uma plataforma *online* (*TrichOKey*) com a finalidade de fornecer uma ferramenta digital para identificar isolados de *Trichoderma* ao nível de *espécie*. Contudo, com o crescente número de espécies descritas a região ITS1 e ITS2 se mostrou pouco informativa para separar espécies filogeneticamente mais próximas. Assim, outras regiões genômicas passaram a ser usadas para auxiliar a resolver as relações filogenéticas entre as espécies de *Trichoderma* (KULLNIG-GRADINGER *et al.*, 2002; CHAVERRI *et al.*, 2003; KUBICEK *et al.*, 2008; JAKLITSCH, 2009; 2011; 2015; CHAVERRI *et al.*, 2015; JACKLISTCH; VOGLMAYR, 2015; KUBICEK *et al.*, 2008). Este assunto será discutido mais a frente neste capítulo.

O uso da filogenia molecular na distinção de espécies foi particularmente importante no gênero *Trichoderma*, pois existem grandes complexos de espécies crípticas, ou seja, impossíveis de serem distinguidas morfológicamente KUBICEK *et al.*, 2008; DRUZHININA *et al.*, 2010; SAMUELS *et al.*, 2010; CHAVERRI *et al.*, 2015). Atualmente, a abordagem empregada para resolver as posições filogenéticas de *Trichoderma*, é a *Genealogical Concordance for Phylogenetic Species Recognition* (GCPSR). Este método utiliza a concordância filogenética de diferentes genes não relacionados, visando identificar a ausência de troca genética e a independência evolutiva das linhagens ao longo do tempo (TAYLOR *et al.*, 2000). Ou seja, se dois isolados pertencem a espécies distintas, a topologia de árvores filogenéticas de genes não ligados deverá ser congruente em representar esses isolados como linhagens filogenéticas distintas, com suporte estatístico. Esse método

vem sendo empregado para elucidar as relações evolutivas na seções/clados de *Trichoderma* (KUBICEK *et al.*, 2008).

O *International Nomenclature Code* (ICN) revisado para algas, fungos e plantas estipulou que espécies individuais de fungos pleomórficos, como *Trichoderma/Hypocrea*, deveriam ter apenas um nome (BARRIE *et al.*, 2012). Em 2015 o gênero *Trichoderma/Hypocrea*, passou por uma revisão na sua nomenclatura (BISSETT *et al.* 2015). O nome *Trichoderma* foi atribuído primeiro e teve prioridade sobre *Hypocrea*, dessa forma, todas as espécies antes conhecidas como pertencente ao gênero *Hypocrea* foram renomeadas para *Trichoderma*. A lista com os nomes de *Trichoderma* unificados, conforme as diretrizes do ICN para algas, fungos e plantas (Código de Melbourne, Art. 14.13), foi publicada em 2015 com 254 nomes de espécies de *Trichoderma* (BISSETT *et al.* 2015). Atualmente, são reconhecidas mais de 350 espécies de *Trichoderma* e, recentemente, HU *et al.* (2019) sugeriram que ainda existem aproximadamente 300 espécies ainda não descritas do gênero.

Atualmente existe um esforço para reduzir as seções de *Trichoderma* em clados, porém, por motivos históricos, alguns autores permanecem utilizando essa nomenclatura (JACKLISTCH; VOGLMAYR, 2015). Conforme esquemas taxonômicos propostos por Jacklistch e Voglmayr (2015) e Chen e Zhuang (2017), o gênero *Trichoderma* possui 10 seções/clados, que estão subdivididas em 24 subclados e 13 linhagens solitárias (Tabela 1). As características e eventuais padrões morfológicos e fisiológicos das seções/clados de *Trichoderma* são apresentadas a seguir.

#### *Viride* (Anteriormente seção *Trichoderma*)

A seção *Viride* pode ser distinguida das demais pelo conidióforo estreito e flexível, podendo se ramificar em duas ou três fiálides (CHAVERRI; SAMUELS, 2003). As fiálides em sua totalidade são lageniformes, os conídios são lisos. Jacklistch e Voglmayr, (2015),



revelam que os telomorfos possuem pontos ostiolares discretos nos ascósporos hialinos, e os seus anamorfos apresentam conídios verdes com rugosidade em alguns subclados, como *Koningii* e *Viride*. Jacklistch (2011) mostrou que os conidióforos das espécies dessa seção possuem uma grande variedade de formas, dificultando assim sua classificação.

### *Green-Spored Clade*

*Green-Spored Clade* foi proposto por Jacklistch e Voglmayr (2015) com o intuito de incluir espécies que possuem ascósporos verdes. Contudo, esse clado possui baixo suporte estatístico em análises filogenéticas, fazendo com que não fosse bem aceito na comunidade científica. Essa seção/clado é composta por dois grupos filogenéticos, um sendo o grande subclado *Harzianum* e o outro um grupo parafilético contendo vários subclados menores.

### *Polysporum*

Clado proposto por Jacklistch e Voglmayr (2015) e inclui as espécies da seção *Pachybasium* (Bissett 1991b). O nome dessa seção é uma referência à espécie *T. polysporum* descrita por LU *et al.* (2004) e incluída na seção *Pachybasium*. Seu teleomorfo foi anteriormente descrito como *Hypocrea pachybasioides*. As espécies dessa seção têm como características fiálides curtas em sua maioria que podem estar agrupadas ou com ampla distribuição. Seus conidióforos possuem ramos largos, onde alguns alongamentos podem ser estéreis ou férteis. Conforme Bissett (1991<sup>b</sup>) esse grupo abriga espécies que produzem conídios verdes, brancos e até amarelos.

**Tabela 1.** Esquema taxonômico atual do gênero *Trichoderma* conforme proposto por Chen e Zhuang (2017) e Jacklistch e Voglmayr (2015).

Seções/Clados	Subclados	Algumas espécies representativas	
Viride (Anteriormente <i>Trichoderma</i> )	Viride	<i>T. viride</i> , <i>T. maritale</i> , <i>T. scalesae</i>	
	Viridescens	<i>T. compositicola</i> , <i>T. nothescens</i> , <i>T. serperiferentis</i> , <i>T. olivascens</i> , <i>T. appalachiensis</i> , <i>T. neosinense</i> , <i>T. viridarium</i> , <i>T. viridescens</i> , <i>T. trixiae</i> , <i>T. viridialbum</i> , <i>T. paraviridescens</i> , <i>T. virilente</i>	
	Rogersonii	<i>T. austroroningii</i> , <i>T. rogersonii</i> , <i>T. pararogersonii</i> , <i>T. subeffusum</i>	
	Asperillum/Hamatum	<i>T. hamatum</i> , <i>T. pubescens</i> , <i>T. flaviconidium</i> , <i>T. ewanisi</i> , <i>T. eiliji</i> , <i>T. pezizoides</i> , <i>T. paucisporum</i> , <i>T. theobromicola</i> , <i>T. asperillum</i> , <i>T. yunnanense</i> , <i>T. matsushimae</i> , <i>T. asperelloides</i> , <i>T. aereoquaticum</i> , <i>T. lieckfeldiae</i>	
	Neorufum	<i>T. neorufoides</i> , <i>T. neorufum</i>	
	Koningii	<i>T. peteronii</i> , <i>T. isrianum</i> , <i>T. caribbaeum</i> , <i>T. dorothaea</i> , <i>T. dingleyae</i> , <i>T. taiwanense</i> , <i>T. albotufum</i> , <i>T. ochroleucum</i> , <i>T. intricatum</i> , <i>T. Koningii</i> , <i>T. koninglopsi</i> , <i>T. ovalisporum</i>	
	Ceramicum	<i>T. ceramicum</i> , <i>T. estonicum</i> , <i>T. parestonicum</i>	
	Chlorosporum	<i>T. orientoides</i> , <i>T. creneauum</i> , <i>T. chlorosporum</i> , <i>T. smuosum</i> , <i>T. surroctundum</i> , <i>T. thelephoricola</i>	
	Green-spored Clade	Harzianum	<i>T. aggressivum</i> , <i>T. alni</i> , <i>T. amazonicum</i> , <i>T. atrobrunneum</i> , <i>T. brunneoviride</i> , <i>T. catoptron</i> , <i>T. ceraceum</i> , <i>T. cernuum</i> , <i>T. christiani</i> , <i>T. cinnamomeum</i> , <i>T. compactum</i> , <i>T. corneum</i> , <i>T. decarymycellum</i> , <i>T. epimyces</i> , <i>T. quizzhouense</i> , <i>T. harzianum</i> , <i>T. hausknechti</i> , <i>T. helicolixii</i> , <i>T. inharatum</i> , <i>T. italicum</i> , <i>T. lixii</i> , <i>T. peregrinomyces</i> , <i>T. pleuroti</i> , <i>T. pleurotocola</i> , <i>T. priscillae</i> , <i>T. pseudogelatinosum</i> , <i>T. pyramdale</i> , <i>T. simmonsii</i> , <i>T. stramineum</i> , <i>T. taewa</i> , <i>T. tomentosum</i> , <i>T. velutinum</i>
		Helicum	<i>T. helicum</i> , <i>T. pseudonigrovirens</i> , <i>T. silvae-virgineae</i>
Spinulosum	Strictipile	<i>T. longipile</i> , <i>T. camelosporum</i>	
	Spinulosum	<i>T. aeruginum</i> , <i>T. britannicum</i> , <i>T. danicum</i> , <i>T. spinulosum</i>	

		<i>T. fertile</i> , <i>T. fomiticola</i> , <i>T. hunua</i> , <i>T. mienum</i> , <i>T. moravicum</i> , <i>T. oblongisporum</i> , <i>T. sentorbis</i>
	Seniorbis	<i>T. floccosum</i> , <i>T. ivoriense</i> , <i>T. lanuginosum</i> , <i>T. medusea</i> , <i>T. rossicum</i> , <i>T. stromaticum</i> , <i>T. vermpilum</i>
	Stromaticum	<i>T. alutacum</i> , <i>T. atlanticum</i> , <i>T. bavarium</i> , <i>T. croceum</i> , <i>T. europaeum</i> , <i>T. foliicola</i> , <i>T. lacuombatense</i> , <i>T. leucopus</i> , <i>T. luteifusum</i> , <i>T. mediterraneum</i> , <i>T. mediterraneum</i> , <i>T. minutisporum</i> , <i>T. nybergianum</i> , <i>T. pachypalidum</i> , <i>T. piluliterum</i> , <i>T. placentula</i> , <i>T. polysporum</i> , <i>T. seppi</i> , <i>T. stellatum</i>
	Polysporum	<i>T. aethiopicum</i> , <i>T. andinense</i> , <i>T. britanicae</i> , <i>T. capillare</i> , <i>T. citrinoviride</i> , <i>T. effusum</i> , <i>T. euskadense</i> , <i>T. flagellatum</i> , <i>T. flavipes</i> (= <i>H. crne eoflava</i> ), <i>T. ghanense</i> , <i>T. gillessi</i> , <i>T. gracile</i> , <i>T. konilangbra</i> , <i>T. leguminosum</i> , <i>T. longibrachiatum</i> , <i>T. novae-zelandiae</i> , <i>T. orientale</i> , <i>T. parareesei</i> , <i>T. patella</i> , <i>T. pinnatum</i> , <i>T. pseudokoningii</i> , <i>T. reesei</i> , <i>T. sambuci</i> , <i>T. saturnisporopsis</i> , <i>T. saturnisporum</i> , <i>T. srense</i> , <i>T. solani</i> , <i>T. subalpinum</i> , <i>T. tremelloides</i> , <i>T. balearicum</i> , <i>T. calamagrostidis</i> , <i>T. crystallinum</i> , <i>T. megalocitrium</i> , <i>T. psychrophilum</i> , <i>T. rhododendri</i>
	Psychrophilum	<i>T. turrialbense</i> , <i>T. arundinaceum</i> , <i>T. aurantifusum</i> , <i>T. brevicompactum</i> , <i>T. margaretense</i> , <i>T. profrudens</i>
	Brevicompactum	<i>T. americanum</i> , <i>T. austriacum</i> , <i>T. citrinum</i> , <i>T. decipiens</i> , <i>T. eucorticoides</i> , <i>T. microcitrium</i> , <i>T. phellinicola</i> , <i>T. protopulvinatum</i> , <i>T. pseudostamineum</i> , <i>T. pulvinatum</i> , <i>T. stercoarium</i> , <i>T. subsulphureum</i> , <i>T. sulphureum</i> , <i>T. victoriense</i>
	Hypocreaeum	<i>T. spirale</i> , <i>T. humanense</i> , <i>T. longisporum</i>
	Spirale	<i>T. deliquescens</i> (sin. <i>Hypocrea lutea</i> )
	Deliquescens	<i>T. albolutescens</i> , <i>T. alcaifuscescens</i> , <i>T. avellaneum</i> , <i>T. delcattulum</i> , <i>T. flavipes</i> , <i>T. parmasto</i> , <i>T. pellatum</i> , <i>T. subalpinum</i> , <i>T. taxi</i> , <i>T. tremelloides</i> , <i>T. ceciliae</i> , <i>T. leguminosarum</i> , <i>T. rubi</i>
	Lone Lineas	
	Lone Lineas	
	Deliquescens (Anteirriomente Lutea)	
	Lone Lineas	
	Brevicompactum	
	Hypocreaeum	
	Spirale	
	Deliquescens (Anteirriomente Lutea)	
	Lone Lineas	

### *Longibrachiatum*

As espécies da seção/clado *Longibrachiatum* possuem conídios com textura frequentemente rugosa e raramente lisa, com formato que varia do elipsoidal a oblongo. Essas espécies produzem em sua maior parte estromas marrons durante a reprodução sexuada (DRUZHININA *et al.*, 2012). As espécies dessa seção possuem conidióforos com ramos laterais relativamente longos, podendo se reorganizar em diferentes ramos curvados ou sinuosos (BISSETT, 1984). Esse grupo abriga algumas espécies de *Trichoderma* que podem ser patógenos oportunistas de humanos imunocomprometidos: *T. longibrachiatum* e *H. orientalis*, *T. citrinoviride* (KUHLS *et al.*, 1999). Contudo, também abriga *T. reesei*, utilizado na produção industrial de celulase (RECZEY *et al.*, 1996). A seção *Longibrachiatum* foi umas das primeiras a serem avaliadas utilizando métodos moleculares (SAMUELS *et al.*, 1998). Espécies dessa seção são termotolerantes podendo sobreviver e se desenvolver em temperaturas de 37 a 40 °C. Atualmente essa seção possui diferentes subclados não nomeados e que são estudados para melhor resolução taxonômica do gênero (DRUZHININA *et al.*, 2012).

### *Psychrophilum*

Este clado, antes conhecido como clado *Megalocitrina*, (CHAVERRI; SAMUELS, 2003), foi renomeado e aumentado por Jacklistch (2009; 2011) As espécies deste táxon são caracterizadas por possuírem estromas claros ou brilhantes na sua fase sexuada e conídios hialinos e conidióforos do tipo *Gliocladium-like* na sua fase assexuada (JACKLISTCH; VOGLMAYR, 2015).

### *Brevicompectum*

Proposto por Degenkolb *et al.* (2008), é o clado mais próximo de *Deliquescens* (=Lutea), e segundo Degenkolbet *al.* (2008), todas as espécies desse clado com exceção de *T. rodmanii*, produzem

toxinas do tipo tricoteceno harzianum A ou Tricodermina, além de produzirem peptaibióticos como a alameticinas. Degenkolb *et al.* (2008) encontraram duas apomorfias que definem esse clado, conídios subglobosos e a formação de longos conidióforos às vezes estéreis e que possuem poucas ou nenhuma ramificação e podem se projetar na superfície das pústulas de forma visível.

### *Hypocreanum*

Essa seção foi criada por Bissett (1991a) e revisada por Overton *et al.* (2006a; 2006b), utilizando métodos moleculares. Contudo, as características morfológicas dessa seção foram bem definidas por Jacklistch (2011). As espécies possuem conidióforos primitivos, com ramificações espessas variando entre o tipo acremonium e o tipo verticilium. Os conídios são hialinos e podem ter diferentes formas. A fase sexuada possui estromas grandes, amplamente efundidos ou subpulvinados.

### *Spirale*

*Trichoderma spirale* foi descrito por Bissett em 1991 em uma revisão da seção *Pachybasium*. O tipo da espécie foi isolado do solo da Tailândia e sua característica morfológica mais marcante dessa espécie é seu principal eixo de conidióforos em espiral com seu alongamento apical estéril sem ramos férteis perto do ápice. Devido a essa característica Bissett cunhou o epíteto dessa espécie de *spirale*. Mais tarde Chaverri *et al.* (2003) e Chaverri e Samuels (2003) redescreveram essa espécie utilizando dados morfológicos, moleculares e fisiológicos. Chen e Zhuang (2017) descreveram duas espécies, *T. hunanense* e *T. longisporum*, filogeneticamente relacionada com *T. spirale* e denominaram o grupo filogenético formado por elas de clado *Spirale*. Esse clado é basal na filogenia molecular combinada de *RPB2* e *teF1* dos *Trichoderma* verdes indicando que ele é uma linhagem primitiva dentro deste grupo de espécies (CHEN; ZHUANG, 2017). As características

compartilhadas pelas espécies desse clado e que as distinguem das demais espécies de *Trichoderma* verdes são a presença de pústulas com prolongações de hifas e conidióforos sinuosas estéreis, simples ou poucas vezes ramificadas, presença de conídios elipsoidais e produção de pigmento amarelo no meio de cultura (CHEN; ZHUANG, 2017).

### *Deliquescens*

Anteriormente denominado Clado *Lutea* (JACKLISTCH, 2011), foi renomeado por Jacklistch e Voglmayr (2015) devido à descrição de *T. deliquescens*, o anamorfo da antiga *Hypocrea lutea*. *Trichoderma deliquescens*, *T. melanomagnum* e *T. luteocrystallinum* são alguns representantes desse clado. Seus representantes possuem como características como conidióforos peniciliados ou mononematosos, conídios verdes que são incorporados em exsudatos e algumas espécies que podem produzir ascósporos verdes ou hialinos (JACKLISTCH, 2011).

### *Lone Lineas*

Lone Lineas ou Linhagens solitárias são espécies que não possuem nenhuma relação direta com nenhum outro grupo já descrito. Algumas dessas espécies são filogeneticamente relacionadas com algumas seções/clados conhecidas, já outras não possuem uma posição filogenética definida (JACKLISTCH; VOGLMAYR, 2015).

## **Identificação de *Trichoderma***

Atualmente, a identificação polifásica se tornou padrão para descrição de novas espécies de fungos, esse método tende a realizar uma abordagem integrada dos caracteres morfológicos, fisiológicos, ecológicos e genéticos de uma dada espécie (GILLIS *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2011). A morfologia das espécies é analisada em diferentes meios de cultura, temperatura, luminosidade e pH de uma forma conjunta. Os caracteres fisiológicos também são analisados seguindo os critérios utilizados para a morfologia, de modo a averiguar a produção de

enzimas ou metabólicos secundários característicos do táxon. As análises morfológicas devem ser feitas com pelo menos três repetições no tempo e com utilização de duplicata para cada isolado. Os meios mais utilizados para caracterização morfológica são ágar farinha de milho (*Corn Meal Dextrose Agar* - CMD), ágar nutriente sintético (*synthetic nutrient agar* - SNA) e ágar batata dextrose (*potato dextrose agar* - PDA) (Tabela 2). As culturas são incubadas a 20 ou 25 °C dependendo da seção, ou subclado em que a espécie estudada pertence. O tempo de cultivo ou incubação dos isolados para confecção de lâminas podem variar de 7 a 14 dias, podendo se prolongar para 20 dias ou mais, dependendo do tempo de conidiação da espécie em questão. São utilizadas placas de Petri de plástico ou de vidro com 20 ml de meios de cultura, sendo recomendável a transferência de 3,0 µL da suspensão de esporo em ágar-água. Durante o período de incubação são analisadas características macroscópicas como início da conidiação e da produção de pústulas e após esse período são avaliadas a cor da colônia, a formação do micélio aéreo, o tipo de crescimento, a produção de exsudatos e de pigmentos solúveis. O tamanho das colônias é avaliado após 72 h.

**Tabela 2.** Meios de cultura mais utilizados na caracterização macroscópica e microscópica de *Trichoderma*, seguindo Nirenberg, (1976), Chaverri e Samuels, (2003), Chen e Zhuang (2017) e Jacklistch e Voglmayr (2015).

Ágar Nutriente Sintético SNA		Ágar farinha de milho CMD		Ágar Batata dextrose BDA	
Fosfato monopotásio	1,2g	Fubá de milho	20g	Batata	200g
Nitrato de potássio	1,2g				
Sulfato de Magnésio	0,5g	Dextrose	20g	Dextrose	20g
Cloreto de Potássio	0,5g	Ágar	15-20g	Ágar	15-20g
Ágar	15-20g				
Sacarose	0,2g				
Glicose	0,2g				
Água destilada	1L	Água destilada	1L	Água destilada	1L
pH Final= 6,8 ± 0,1 a 25°C		pH Final= 6,8 ± 0,1 a 25°C		pH Final= 5,6 ± 0,1 a 25°C	

A taxa de crescimento é eventualmente considerada na caracterização morfofisiológica de *Trichoderma* e pode ser usada na distinção de isolados da mesma espécie ou de espécies diferentes. O crescimento do isolado é avaliado em diferentes meios de cultura e temperaturas. Os meios de cultivo mais utilizados para essa caracterização é o PDA e o SNA (Tabela 2) e as temperaturas mais utilizadas são de 15, 20, 25, 30 e 35°C por 72 h, podendo utilizar ou não fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro, dependendo da espécie em questão (SAMUELS *et al.*, 2002; CHAVERRI, 2003).

A caracterização microscópica é feita utilizando a técnica de microcultivo em placas de Petri. Em geral, as lâminas são preparadas após o período de conidiação e são confeccionadas com ácido láctico 60% ou KOH 3%. As características microscópicas analisadas são comprimento e largura do ponto mais largo das fiálides, largura da base da fiálide, comprimento e largura da célula que surgem fiálides, comprimento e largura dos conídios, comprimento e largura dos clamidósporos (quando presentes) e, comprimento e largura das pústulas.

Os aspectos ecológicos também são úteis e integram a abordagem polifásica, pois espécies de *Trichoderma* podem estar associadas a diferentes nichos e modos de vida. Por exemplo, Hu *et al.* (2019), demonstraram que o clado *viride* é um grupo dominante na costa e nas florestas da China, e que *T. afroharzianum* é uma espécie dominante em ecossistemas lacustres, contudo, representam menos de 2% nas florestas. Estes resultados sustentam a hipótese de que alguns clados ou espécies de *Trichoderma* possuem preferência geográfica.

Marcadores moleculares são úteis para discriminar isolados de espécies diferentes no gênero *Trichoderma* e em alguns casos podem ter polimorfismo suficiente para distinguir isolados da mesma espécie (MUTHUMEENAKSHI *et al.*, 1994). Os marcadores moleculares mais utilizados são o RFLP, o RAPD e, mais recentemente, o ERIC, REP e o BOX-PCR. Em geral, esses marcadores produzem perfis genéticos



distintos de modo que isolados pertencentes a espécies diferentes são facilmente distinguidos.

A abordagem polifásica para identificar ou descrever novas espécies em *Trichoderma* inclui o método da concordância filogenética (GCPSR) discutido no tópico sobre taxonomia deste capítulo. As regiões genômicas usadas para avaliar a concordância filogenética são os ITS1 e ITS2 e os genes que codificam o Fator de Elongação da Tradução 1 $\alpha$  (*teF1*), a segunda subunidade maior da RNA polimerase II (*RPB2*) e a Calmodulina (*CaM*), (Veja no capítulo sobre diversidade taxonômica de *Aspergillus* a estrutura dos genes *CaM*, *RPB2* e os *primers* usados para amplificar diferentes regiões deles.

O ITS1 e ITS2 tem pouca resolução filogenética para discriminar isolados de espécies evolutivamente próximas, de modo que seu uso não é indicado para distinguir espécies desse gênero. Os genes mais informativos nesse sentido são o *teF1*, *CaM* e *RPB2*, nessa ordem. Por ser mais informativo do ponto de vista filogenético o *teF1* é considerado o *barcode* do gênero em estudos que usam a GCPSR (Figura 6). O fragmento do *teF1* amplificado com os *primers* EF1-728F e TEF1-LLerev (~1200pb) (Figura 6; Tabela 3) tem sido preferencialmente usado nas análises filogenéticas para identificar e descrever novas espécies de *Trichoderma*. Ele contém o quarto *intron*, que é a região mais variável do gene. O segundo gene mais utilizado nas filogenias *multilocus* para o método de GCPSR é o *RPB2*, apesar do *CaM* ser mais informativo para essa finalidade. Veja no capítulo sobre diversidade e taxonomia de *Aspergillus* para mais detalhes sobre os procedimentos para realizar análises filogenéticas.

**Figura 6.** Esquema do gene *teF1* de *Trichoderma* e as posições dos *primers* em seu sentido de amplificação.



**Tabela 3.** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação e sequenciamento de regiões gênicas e intergênicas do *tef1* em *Trichoderma*.

Locus	Nome do primer	Sentido	Sequência do primer (5'-3')
<i>TEF1</i>	EF 1	Forward	ATGGGTAAGGARGACAAGAC
	TEF1-728 F	Forward	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG
	TEF1-986 R	Reverse	TACTTGAAGGAACCCTTACC
	<i>tef1</i> fw	Forward	GTGAGCGTGGTATCACCATCG
	TEF1-LLErev	Reverse	AACTTGCAGGCA ATGTGG
	EF1-983F	Forward	GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT

O gênero *Trichoderma* evoluiu aproximadamente a 66 milhões de anos atrás, no período Cretáceo (Kubicek *et al.*, 2019). Análises de genômica comparativa indicam que esse gênero evoluiu inicialmente como micoparasita e mais tarde diversificou quanto ao seu papel ecológico. Avanços na compreensão da biologia do gênero *Trichoderma* se estendem também a taxonomia. Nos últimos cinco anos o número de espécies descritas de *Trichoderma* saiu de aproximadamente 250 para quase 400 espécies e HU *et al.* (2019) sugeriram com bases em resultados de um amplo estudo de diversidade de *Trichoderma* na China que ainda existe aproximadamente 300 espécies não descritas desse gênero. Esse cenário aponta para a necessidade de uma ampla revisão do gênero em um futuro próximo.

## Referências

ABDEL-LATEFF, A.; FISCH, K.; WRIGHT, A. D. Trichopyrone and other constituents from the marine sponge-derived fungus *Trichoderma* sp. **Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences**, v. 64, n. 3-4, p. 186-192, 2009.

BAILEY, B. A. *et al.* Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. **Biological control**, v. 46, n. 1, p. 24-35, 2008.

BARRIE, F. R. *et al.* **International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants (Melbourne Code)**. Königstein: Koeltz Scientific Books, 2012.

BISBY, G. R. *Trichoderma viride* Pers. ex Fries, and notes on *Hypocrea*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 23, n. 2, p. 149-168, 1939.

BISSETT, J. *et al.* Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. **IMA fungus**, v. 6, n. 2, p. 263-295, 2015.

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. **Canadian journal of botany**, v. 62, n. 5, p. 924-931, 1984.

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. **Canadian journal of botany**, v. 69, n. 11, p. 2357-2372, 1991.<sup>a</sup>

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. **Canadian journal of botany**, v. 69, n. 11, p. 2373-2417, 1991b.

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, n. 11, p. 2418-2420, 1991c.

CHAVERRI, P. *et al.* *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. **Mycologia**, v. 95, n. 6, p. 1100-1140, 2003.

CHAVERRI, P. *et al.* Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. **Mycologia**, v. 107, n. 3, p. 558-590, 2015.

CHAVERRI, P.; SAMUELS, G. J. ***Hypocrea/Trichoderma*(Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores**. Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2003.

CHAVERRI, P.; GAZIS, R. O.; SAMUELS, G. J. *Trichoderma amazonicum*, a new endophytic species on *Hevea brasiliensis* and *H. guianensis* from the Amazon basin. **Mycologia**, v. 103, n. 1, p. 139-151, 2011.

CHEN, K.; ZHUANG, W. Y. Discovery from a large-scaled survey of *Trichoderma* in soil of China. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-37, 2017.

DE MARCO, J. L. *et al.* A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 383-386, 2000.

DEGENKOLB, T. *et al.* The *Trichoderma brevicompactum* clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins. **Mycological Progress**, v. 7, n. 3, p. 177-219, 2008.

DRUZHININA, I. S. *et al.* An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 10, p. 813-828, 2005.

DRUZHININA, I. S. *et al.* Molecular phylogeny and species delimitation in the section *Longibrachiatum* of *Trichoderma*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 5, p. 358-368, 2012.

DRUZHININA, I. S. *et al.* The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2010.

EL KOMY, M. H. *et al.* Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato Fusarium wilt. **The Plant Pathology Journal**, v. 31, n. 1, p. 50, 2015.

FRIES, E. **Systema orbis vegetabilis**. Typographia academica, 1825.

FUJIMORI, F.; OKUDA, T. Application of the random amplified polymorphic DNA using the polymerase chain reaction for efficient elimination of duplicate strains in microbial screening. **The Journal of antibiotics**, v. 47, n. 2, p. 173-182, 1994.

GUPTA, S.; DIKSHIT, A. K. Biopesticides: An ecofriendly approach for pest control. **Journal of Biopesticides**, v. 3, n. Special Issue, p. 186, 2010.

HARMAN, G. E. *et al.* *Trichoderma species* - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature reviews microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43-56, 2004.

HARMAN, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 190-194, 2006.

HU, J. *et al.* Large-scale *Trichoderma* diversity was associated with ecosystem, climate and geographic location. **Environmental Microbiology**, 2020.

JAKLITSCH, W. M.; VOGLMAYR, H. Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. **Studies in mycology**, v. 80, p. 1-87, 2015.

JAKLITSCH, W. M. European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. **Studies in mycology**, v. 63, p. 1-91, 2009.

JAKLITSCH, W. M. European species of *Hypocrea* part II: species with hyaline ascospores. **Fungal diversity**, v. 48, n. 1, p. 1-250, 2011.

JANG, S. *et al.* Five New Records of Soil-Derived *Trichoderma* in Korea: *T. albolutescens*, *T. asperelloides*, *T. orientale*, *T. spirale*, and *T. tomentosum*. **Mycobiology**, v. 45, n. 1, p. 1-8, 2017.

KENDRICK, Bryce. Fungi and the history of mycology. **LS**, 2001.

KHAMTHONG, N. *et al.* Tetrahydroanthraquinone and xanthone derivatives from the marine-derived fungus *Trichoderma aureoviride* PSU-F95. **Archives of pharmacal research**, v. 35, n. 3, p. 461-468, 2012.

KINDERMANN, J. *et al.* Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the rDNA cluster. **Academic Press Inc**, v. 24, p. 298-309, 1998.

KUBICEK, C. P. *et al.* Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species. **BMC genomics**, v. 20, n. 1, p. 485, 2019.

KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. ***Trichoderma and Gliocladium. Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics.*** Taylor and Francis Ltd, 1998.

KUBICEK, C. P.; KOMON-ZELAZOWSKA, M.; DRUZHININA, I. S. Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 9, n. 10, p. 753, 2008.

KUHLS, K. *et al.* Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 15, p. 7755-7760, 1996.

KUHLS, K. *et al.* Molecular reidentification of human pathogenic *Trichoderma* isolates as *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma citrinoviride*. **Medical mycology**, v. 37, n. 1, p. 25-33, 1999.

KUHLS, K. *et al.* Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. **Mycologia**, v. 89, n. 3, p. 442-460, 1997.

LI, G. H. *et al.* The Chemical Constituents of Endophytic Fungus *Trichoderma* sp. MFF 1. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, n. 7, p. 1790-1795, 2010.

LOGUERCIO, L. L. *et al.* Selection of *Trichoderma stromaticum* isolates for efficient biological control of witches' broom disease in cacao. **Biological Control**, v. 51, n. 1, p. 130-139, 2009.

LÓPEZ-BUCIO, J.; PELAGIO-FLORES, R.; HERRERA-ESTRELLA, A. *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. **Scientia horticultrae**, v. 196, p. 109-123, 2015.

LÓPEZ-QUINTERO, C. A. *et al.* DNA barcoding survey of *Trichoderma* diversity in soil and litter of the Colombian lowland Amazonian rainforest reveals *Trichoderma strigosellum* sp. nov. and other species. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 104, n. 5, p. 657-674, 2013.

LORITO, M. *et al.* Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances

inhibition of spore germination. **Microbiology**, v. 140, n. 3, p. 623-629, 1994.

MELO, I. S. DE; FAULL, J. L. Scanning electron microscopy of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a biocontrol agent of witches' broom disease of cocoa. **Brazilian journal of microbiology**, v. 35, n. 4, p. 330-332, 2004.

MEYER, R. J. Mitochondrial DNAs and plasmids as taxonomic characteristics in *Trichoderma viride*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 8, p. 2269-2276, 1991.

MISHRA, R. K. *et al.* BOX-PCR-and ERIC-PCR-based genotyping and phylogenetic correlation among *Fusarium oxysporum* isolates associated with wilt disease in *Psidium guajava* L. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 25-32, 2015.

MUKHERJEE, P. K. *et al.* *Trichoderma* in agriculture, industry and medicine: an overview. **Trichoderma biology and applications. Boston: CAB International**, p. 1-9, 2013.

MUTHUMEENAKSHI, S. *et al.* Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British Isles. **Microbiology**, v. 140, n. 4, p. 769-777, 1994.

PERSOON, C. H. Neuer Versuch einer systematischen Eintheilung der Schwämme. **Neues Magazin für die Botanik**. 1:63-80,1794.

QIN, L. N. *et al.* Improved production of heterologous lipase in *Trichoderma reesei* by RNAi mediated gene silencing of an endogenic highly expressed gene. **Bioresource technology**, v. 109, p. 116-122, 2012.

RECZEY, K. *et al.* Cellulase production by *T. reesei*. **Bioresource Technology**, v. 57, n. 1, p. 25-30, 1996.

REYNOLDS, D. R. Proving the anamorphic connection. **Pleomorphic fungi: The diversity and its taxonomic implications**, p. 157-180, 1987.

RIFAI, M. A. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycological papers**, v. 116, p. 1-56, 1969.

RUIZ, N. *et al.* Marine-derived *Trichoderma*: A Source of New Bioactive Metabolites. **Trichoderma: biology and applications**, p. 247, 2013.

SAHEBANI, N.; HADAVI, N. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2016-2020, 2008.

SALAS-MARINA, M. A. *et al.* Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. **European Journal of Plant Pathology**, v. 131, n. 1, p. 15-26, 2011.

SAMUELS, G. J. *et al.* The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. **Studies in Mycology**, n. 41, 1998.

SAMUELS, G. J. *et al.* *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. **Mycologia**, v. 102, n. 4, p. 944-966, 2010.

SAMUELS, G. J. *et al.* *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. **Mycologia**, v. 94, n. 1, p. 146-170, 2002.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 787-799, 2010.

SEIBOTH, B.; IVANOVA, C.; SEIDL-SEIBOTH, V. *Trichoderma reesei*: a fungal enzyme producer for cellulosic biofuels. **Biofuel production-recent developments and prospects**, p. 309-340, 2011.

SEIDL, V. *et al.* Sexual development in the industrial workhorse *Trichoderma reesei*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 33, p. 13909-13914, 2009.

SHI, M. *et al.* Antimicrobial peptaibols, novel suppressors of tumor cells, targeted calcium-mediated apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells. **Molecular Cancer**, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2010.



SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L. Secondary metabolism in *Trichoderma*. ***Trichoderma and Gliocladium. Volume 1: Basic Biology, Taxonomy and Genetics***, v. 1, p. 139, 2002.

TAYLOR, J. W. *et al.* Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. ***Fungal genetics and biology***, v. 31, n. 1, p. 21-32, 2000.

TROIAN, R. F. *et al.* Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*: evaluation of antagonism and expression of cell wall-degrading enzymes genes. ***Biotechnology Letters***, v. 36, n. 10, p. 2095-2101, 2014.

TULASNE, L. *Ret al.* Selecta Fungoram Carpologia, v. 3. ***Selecta Fungoram Carpologia***, v. 3, 1865.

WOO, S. L. *et al.* *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. ***The Open Mycology Journal***, v. 8, n. 1, 2014.

ZHANG, F. *et al.* *Trichoderma* biofertilizer links to altered soil chemistry, altered microbial communities, and improved grassland biomass. ***Frontiers in microbiology***, v. 9, p. 848, 2018.



# Diversidade taxonômica e identificação de *Aspergillus*

*Harisson Guimarães de Souza*

*Lucas Souza Sales*

*Cristiane Nascimento Figueiredo*

*Djalma Santana Neto*

*Valter Cruz-Magalhães*

*Jorge Teodoro de Souza*

*Phellippe Arthur Santos Marbach*

*Jackeline Pereira Andrade*

## Importância do gênero

Espécies do gênero *Aspergillus* são amplamente distribuídas na natureza e apresentam grande versatilidade de crescimento em diferentes condições de temperatura, pH, salinidade e umidade. Espécies desse gênero possuem grande diversidade metabólica, toleram ampla variação climática e são encontrados em diversos ambientes como florestas, mares, rios, desertos e Antártica, colonizando diferentes substratos como solo, rochas e matéria orgânica em decomposição (LEVIĆ *et al.*, 2013; ABDEL-AZEEM *et al.*, 2019). Sua ocorrência em um ambiente está relacionada com a disponibilidade de substratos, interações ecológicas existentes e microclima. *Aspergillus* spp. estão entre os fungos filamentosos com maior frequência em ambientes salinos (ABDEL-AZEEM *et al.*, 2019). Algumas espécies como *A. nidulans* e *A. niger* possuem adaptações fisiológicas como o armazenamento de solutos como glicerol no citoplasma para tolerar ambientes com elevada concentração de sais (PARK *et al.*, 1993). Muitas espécies do gênero também são predominantemente encontradas crescendo em ambientes de clima quente e sob condições escassas de água como desertos (PALACIOS-CABRERA *et al.*, 2005; ABDEL-AZEEM *et al.*, 2019).

O gênero *Aspergillus* possui um importante papel na manutenção e equilíbrio ecológico, participando, principalmente, na dinâmica da reciclagem da matéria orgânica e disponibilização de nutrientes, afetando tanto a produtividade da cadeia alimentar como a qualidade do solo (CRAY *et al.*, 2013; FRAÇ *et al.*, 2018). A degradação da matéria orgânica é realizada por enzimas extracelulares, secretadas no substrato, que degradam polímeros complexos de cadeias longas como a celulose, hemicelulose e pectinas, além de decompor ceras, óleos, gorduras e proteínas como a queratina (GUGNANI, 2003; RAVEENDRAN *et al.*, 2018; ABDEL-AZEEM *et al.*, 2019). Na natureza, muitas espécies desse gênero também são capazes de solubilizar fosfato, produzir fitohormônios, sideróforos e outros compostos bioativos que ajudam a modular o crescimento e desenvolvimento de plantas (PANDYA *et al.*, 2018; FADIJI; BABALOLA, 2020).

Espécies do gênero *Aspergillus* também podem contaminar alimentos com micotoxinas ou são patógenos de plantas e animais, incluindo a espécie humana. As contaminações causadas por espécies desse gênero acarretam enormes perdas para a economia, por atuarem em diferentes estágios da produção agrícola, incluindo a pré e pós-colheita, processamento e estocagem. *Aspergillus niger*, *A. ochraceus* e *A. carbonarius* são comumente responsáveis pela contaminação de diversos armazéns de manutenção de grãos (feijão, café, arroz, trigo e nozes), além de vinícolas e frutos de interesse comercial como maçã, pera, pêssego, morango e melão (PERRONE *et al.*, 2007). No Brasil, a espécie *A. welwitschiae* é o principal agente etiológico da podridão vermelha do sisal, uma cultura relevante para produção de fibras por pequenos agricultores do sertão nordestino (DUARTE *et al.*, 2018). A doença afeta todos os estágios de desenvolvimento da planta e inviabiliza sua comercialização por ocasionar a perda de turgescência das folhas, escurecimento dos tecidos e apodrecimento do caule (SÁ, 2013).

As micotoxinas são produtos do metabolismo secundário de fungos. A ingestão de alimentos contaminados com micotoxinas pode promover a morte por intoxicação de humanos e animais, principalmente de pessoas com o sistema imunológico debilitado. Essas toxinas possuem baixo peso molecular e intensa atividade biológica após ingestão (KUMAR *et al.*, 2017). As principais micotoxinas de relevância sanitária, produzidas por espécies do gênero *Aspergillus* são as aflatoxinas, ocratoxina A e patulina. As aflotoxinas são produzidas principalmente pelas espécies *A. flavus* e *A. parasiticus* e afetam culturas como amendoim, milho e feijão. Apesar de existir mais de vinte diferentes tipos de aflotoxinas produzidas por espécies desse gênero, apenas quatro (Aflotoxina B1, B2, G1 e G2) apresentam elevada toxicidade (KUMAR *et al.*, 2017). A ocratoxina A e a patulina são menos frequentes nas espécies do gênero *Aspergillus*, entretanto promovem efeitos tóxicos similares causados pelas aflotoxinas, como efeito carcinogênico, teratogênico, citotóxico, imunossupressor e hepatotóxico (KAMEI; WATANABE, 2005).

Os esporos de espécies do gênero *Aspergillus* são facilmente encontrados no ar que respiramos e, quando inalados por indivíduos suscetíveis ou imunocomprometidos, podem causar a aspergilose, uma infecção fúngica causada por qualquer espécie do gênero *Aspergillus*. Após a inalação os esporos germinam produzindo hifas que irão colonizar os pulmões causando doenças que vão desde a inflamação das vias respiratórias até infecções graves nos pulmões, como aspergilose broncopulmonar saprofítica e aspergilose invasiva, além de infecções superficiais como a cutânea e a do canal auditivo externo (BEISSWENGER; HESS; BALS, 2012). As aspergiloses são causadas mais frequentemente por *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. nidulans* e *A. terreus* (MURRAY *et al.*, 2006).

*Aspergillus* spp. são utilizadas na indústria para a produção de metabólitos de importância farmacológica como antibióticos, de

enzimas de importância industrial e na produção de alimentos, via fermentação. As espécies *A. niger* e *A. ochraceus* são utilizadas pela indústria farmacêutica na produção de cortisona, um esteroide que apresenta capacidade anti-inflamatória e imunossupressora. *A. terreus* produz mevinolina, um composto capaz de reduzir o colesterol no sangue inibindo uma enzima que atua na biossíntese de colesterol (BIZUKOJC; LEDAKOWICZ, 2009). Já a espécie *A. parasiticus* é responsável por produzir o ácido kójico, um metabólito secundário com ação despigmentante e antimicrobiana bastante utilizado em pomadas que agem sob o melasma (BRACARENSE, 2014).

Além do uso farmacológico, muitas espécies do gênero *Aspergillus* produzem uma grande variedade de enzimas extracelulares e metabólitos usadas em processos realizados pelas indústrias de alimentos, bebidas e higiene (RAVEENDRAN *et al.*, 2018). As principais enzimas utilizadas industrialmente são as proteases, lipases, celulasas, amilases e xilanases. As celulasas, por exemplo, são utilizadas na indústria têxtil, na fabricação de papel e na geração de bioetanol de segunda geração; as lipases apresentam vasta aplicação nas indústrias de detergentes, cosméticos e oleoquímica enquanto as amilases são aplicadas na panificação e laticínios (RAVEENDRAN *et al.*, 2018; ABDEL-AZEEM *et al.*, 2019). Espécies como *A. niger* e *A. aculeatus* são usadas na produção industrial de ácido cítrico, substância comumente utilizada na conservação de alimentos, na fabricação de plásticos, agentes quelantes e lubrificantes (SHOW *et al.*, 2015). *Aspergillus* spp. também são usados na biorremediação em áreas contaminadas com petróleo, pois convertem derivados de hidrocarbonetos em compostos fenólicos de baixo impacto ambiental (PASSOS *et al.*, 2009).

### **Morfologia e reprodução**

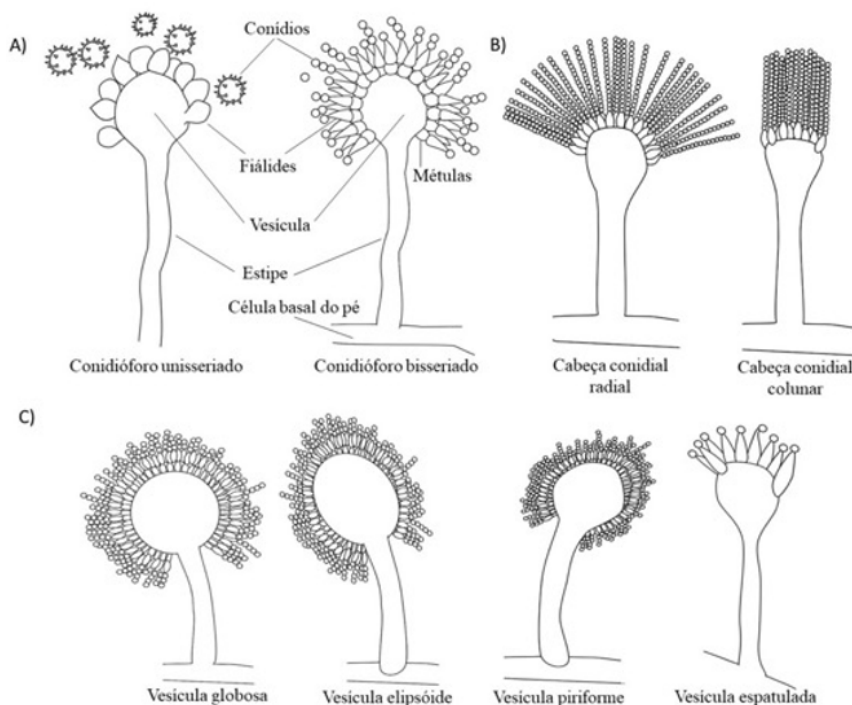
A morfologia é a arquitetura física de um organismo que pode modificar ou sofrer interferência de sinais específicos do

ambiente. A morfologia é baseada na observação da tipologia da colônia (macromorfologia) e da avaliação de estruturas somáticas e reprodutivas (micromorfologia). As espécies do gênero *Aspergillus* são constituídas por filamentos celulares denominados hifas, que em conjunto formam o micélio do fungo, por esse motivo as espécies desse gênero são incluídas em um grupo informal denominado fungos filamentosos (YOSHIMI; MIYAZAWA; ABE, 2016). Suas hifas são septadas e hialinas e variam quanto ao diâmetro. Podem estar no substrato, exercendo a função de absorção de nutrientes, ou ficam sobre o substrato e apresentam função reprodutiva. A partir de ramificações das hifas aéreas são formados os conidióforos, as estruturas reprodutivas assexuadas produtoras de esporos assexuais chamados de conídios (ADAMS; WIESER; YU, 1998). Os conidióforos se originam da célula basal do pé, localizada na hifa vegetativa de suporte e terminam em uma vesícula expandida no ápice (SINGH, 1973). A vesícula é conectada a célula basal por meio de uma haste, a estipe (Figura 1A). A presença de uma vesícula no ápice do conidióforo é típica de espécies do gênero *Aspergillus*. Essa vesícula apresenta formas variadas como globosa, elipsoidal, piriforme e espatulada (Figura 1C) (SAMSON *et al.*, 2014). Os conidióforos são classificados como unisseriados — quando as células produtoras de conídios, as fiálides, surgem diretamente da vesícula ou em bisseriados — quando as fiálides surgem a partir de células estéreis denominadas métulas, ligadas à vesícula do conidióforo (Figura 1A). As fiálides ou as métulas podem cobrir completamente a superfície da vesícula (cabeça conidial radial) ou parcialmente apenas na superfície superior (cabeça conidial colunar) (Figura 1B).

A partir da extremidade da fiálide encontram-se os conídios em cadeias presos um ao outro por uma ponte conectiva (Figura 1A). Os conídios de espécies do gênero *Aspergillus* são estruturas assexuadas oriundas do processo de divisão mitótica, cuja as dimensões variam entre 2 e 5  $\mu\text{m}$ . Os conídios podem variar de esféricos a elípticos, além de apresentar cor e ornamentação variada (OKUDA *et al.*, 2000).

A coloração da superfície das colônias de *Aspergillus* pode conter tons de amarelo, verde, cinza, marrom, preto e branco e podem apresentar o verso e o reverso de uma mesma colônia com cores distintas (Figura 2) (OKUDA *et al.*, 2000). No reverso das colônias da maioria das espécies de *Aspergillus* predominam as cores amarelo pálido, roxa e laranja. As colônias geralmente apresentam textura aveludada, flocosa ou lanosa (SAMSON *et al.*, 2014). As seções de *Aspergillus* exibem diferentes padrões de coloração das colônias, o que torna essa característica relevante para a identificação e descrição de espécies.

**Figura 1.** A) Conidióforos de *Aspergillus* e suas respectivas estruturas. B) Tipos de cabeça conidial de acordo com a distribuição das fiálides ou métulas. C) Tipos de vesículas.



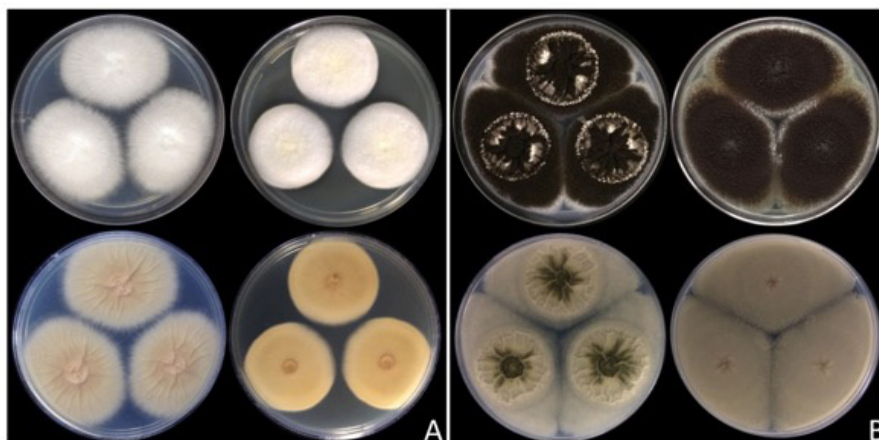
Fonte: Lucas Sales.

De acordo com forma de reprodução, os fungos são classificados em teleomorfos, anarmorfos e holomorfos (BARON, 1996). Teleomorfo é



a designação dada à forma sexuada de um fungo, anamorfo refere-se a sua forma assexuada e holomorfo é a designação que inclui tanto a fase sexuada como a assexuada do fungo. As espécies de *Aspergillus* podem apresentar os dois tipos de reprodução, contudo a maioria delas se reproduz predominantemente de forma assexuada (ODEJA-LÓPEZ *et al.*, 2018). Os conídios são oriundos de divisões mitóticas nas extremidades das fiáldes, e são transportados para o ambiente por ação dos ventos. Ao se depositarem sobre o substrato, os conídios iniciam o processo de germinação, em que a primeira estrutura formada é um tubo germinativo que se desenvolve e dá origem ao micélio (KRIJGSHELD *et al.*, 2013). O micélio se ramifica e origina hifas aéreas que crescem e produzem novos conidióforos e conseqüentemente novos conídios, completando o ciclo reprodutivo.

**Figura 2.** A) Coloração do verso e reverso das colônias da espécie *Aspergillus bezerrae* nos meios de cultivo ágar de autolisado de levedura de Czapek (CYA) e ágar de Blakeslee's MEA (MEAbI) da esquerda para a direita. B) Coloração do verso e reverso das colônias da espécie *Aspergillus oxumiae* nos meios de cultivo CYA e MEAbI da esquerda para a direita.



Fonte: Cristiane Figueiredo, Harisson de Souza.

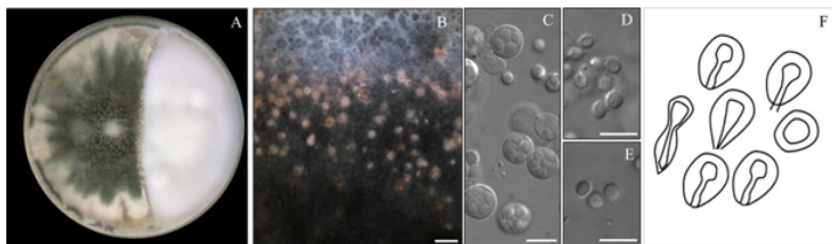
A reprodução sexual é menos frequente nas espécies do gênero *Aspergillus* (KRIJGSHELD *et al.*, 2013). Algumas espécies apresentam a reprodução homotática, ou seja, realizam a autofertilização e outras são

heterotáticas (Figura 3A), necessitam da presença de outro indivíduo compatível para que ocorra a reprodução sexuada. As espécies de *Aspergillus* que se reproduzem sexuadamente são majoritariamente homotáticas, com uma proporção de aproximadamente 13 homotáticas para 1 heterotática na natureza (DYER; O'GORMAN, 2012; OJEDA-LÓPEZ *et al.*, 2018).

No ciclo reprodutivo sexual, duas hifas haplóides se conectam por meio de um processo chamado plasmogamia, a fusão dos citoplasmas. Após fusão das membranas plasmáticas, diz-se que a célula se encontra em estágio dicariótico ( $n + n$ ) (KWON-CHUNG; SUGUI, 2009). A partir desse momento, as hifas ascogênicas são formadas e hifas somáticas se ramificam para produzir uma estrutura fechada e oca denominada cleistotécio (Figura 3B). No interior do cleistotécio, os dois núcleos celulares se fundem em um processo denominado cariogamia. O asco (Figura 3C) diploide passa por divisão meiótica e mitótica originando estruturas chamadas ascósporos (Figura 3D e 3E) Após maturação, os ascósporos são liberados pela ação do vento e caem sobre o substrato, se as condições ambientais forem favoráveis germinam e originam um novo micélio com células reprodutivas haplóides (KWON-CHUNG; SUGUI, 2009; KRIJGSHELD *et al.*, 2013).

Algumas espécies do gênero *Aspergillus*, como *A. niveus* e *A. nidulans* durante a reprodução sexual apresentam células multinucleadas estéreis com aspecto vítreo denominadas células Hülle (Figura 3F). Essas células surgem após a agregação de hifas e auxiliam no desenvolvimento sexual tardio do cleistotécio. As células Hülle estão presentes em todas as 80 espécies da seção *Nidulantes*, sendo, portanto, uma característica importante na identificação e classificação taxonômica (CHEN *et al.*, 2016; SKLENÁŘ *et al.*, 2020). Todas as variações encontradas nas características macroscópicas da colônia e do ciclo de vida do fungo ajudam na descrição, classificação e identificação das espécies do gênero.

**Figura 3.** A e B) Cleistotécios férteis resultante do cruzamento entre os isolados *Aspergillus bezerrae* 9EM2<sup>T</sup> e 63EM7 em meio de cultura ágar de aveia (AO) após 5 semanas. C) Ascospórios. D e E) Ascósporos. F) Células Hülle. Fonte: Cristiane Figueiredo, Harisson de Souza e Lucas Sales.



Fonte: Cristiane Figueiredo, Harisson de Souza e Lucas Sales.

### Histórico da taxonomia

A Taxonomia é um ramo da biologia que tem como objetivo classificar, agrupar e descrever os organismos vivos e faz parte da prática científica conhecida como sistemática, uma área da biologia que estuda as relações evolutivas entre os diferentes organismos. A taxonomia tem importante papel para o registro da biodiversidade das espécies, pois é responsável por desenvolver um sistema de descrição, identificação e classificação dos organismos, considerando as relações evolutivas entre eles. Esse sistema facilita a comunicação científica (KATOCH; KAPOOR, 2015; RAJA *et al.*, 2017).

O gênero *Aspergillus* pertence ao Domínio Eukarya, Reino Fungi, Filo *Ascomycota*, Classe *Eurotiomycetes*, Ordem *Eurotiales* e à Família *Aspergillaceae*. Este gênero surgiu há aproximadamente 81,7 milhões de anos, no período Cretáceo, é filogeneticamente relacionado com o gênero *Penicillium* e é taxonomicamente dividido em quatro subgêneros (*Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati* e *Nidulantes*) e 20 seções que abrigam, atualmente, 451 espécies (STEENWYK *et al.*, 2019). O nome *Aspergillus* foi introduzido pelo padre Pier Antonio Micheli em 1729, para descrever fungos assexuais cujos conidióforos se assemelhavam

a um aspergillum, um objeto utilizado para dispersar água benta em rituais religiosos.

Em 1768 o gênero *Aspergillus* foi validado por Haller e sancionado por Fries em 1832. Aproximadamente 20 anos depois De Bary (1854) descreveu o gênero sexual *Eurotium*, o primeiro teleomorfo ligado a *Aspergillus* (SAMSON *et al.*, 2014). Ao longo dos anos, muitas espécies de *Aspergillus* foram encontradas e descritas de acordo com caracteres morfológicos e fisiológicos. Baseando-se nesses caracteres Thom e Raper (1945) aceitaram 77 espécies, com 10 variedades em 14 grupos para o gênero. Em 1965, Raper e Fennell publicaram uma das principais monografias em que aceitavam 150 espécies pertencentes ao gênero e desconsideraram nomes teleomorfos, usando apenas o nome *Aspergillus* com o intuito de evitar confusão nomenclatural. Pitt *et al.* (2000) aceitaram 184 nomes de *Aspergillus* e 70 nomes teleomorfos associados de acordo com estudos baseados na morfologia das espécies.

A introdução do conceito 'um fungo, um nome' foi estabelecido na Seção de Nomenclatura do Congresso Internacional de Botânica em 2011. A mudança no Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas resultou na transição para um único nome por espécie, assim o nome *Aspergillus* foi mantido e seus nominais teleomorfos foram abandonados (TAYLOR, 2011). Com base em análises filogenéticas multilocus, Houbraken *et al.* (2014) sugeriram a subdivisão do gênero *Aspergillus* em quatro subgêneros e 20 seções e apontaram que juntamente com os gêneros *Polypaecilum*, *Phialosimplex*, *Dichotomyces* e *Cristaspora*, *Aspergillus* forma um clado monofilético estritamente relacionado com o gênero *Penicillium*.

A classificação infragenérica do gênero *Aspergillus*, foi tradicionalmente baseada em critérios morfológicos. Como o número e a variação de caracteres morfológicos é limitado o conceito de espécie usado era muito amplo e não representava a real extensão da divergência evolutiva do gênero (GAUTIER; NORMAND; RANQUE, 2016). A incorporação da filogenia molecular na taxonomia e sistemática

de *Aspergillus* contribuiu para resolver esse problema e, como consequência, promoveu uma reorganização taxonômica do gênero.

Na filogenia molecular relações evolutivas entre organismos são inferidas a partir da comparação de sequências nucleotídicas de regiões gênicas e intergênicas homólogas relativamente conservadas, mas que apresentam variabilidade interespecífica capaz de discriminar de modo mais preciso os isolados que pertencem a espécies diferentes. Os espaçadores internos transcritos 1 e 2 (ITS1 e ITS2) do *operon* dos RNAs ribossomais foram as primeiras regiões amplamente usadas nas análises filogenéticas do gênero *Aspergillus*, uma vez que passaram a ser o DNA *barcode* oficial para fungos (XU, 2016). A ideia adjacente ao conceito de DNA *barcoding* (código de barras de DNA) é usar uma região do genoma como marcador molecular para discriminar os seres vivos anônimo de espécie por meio de análises comparativas.

As filogenias moleculares com o ITS contribuíram para a taxonomia e sistemática de *Aspergillus*. Por exemplo, essa região foi utilizada para agrupar as espécies nas 20 seções atuais do gênero *Aspergillus* (SAMSON *et al.*, 2014). Contudo, como a variação existente no ITS não é suficiente para distinguir espécies muito próximas dentro dessas seções, novos marcadores moleculares passaram a ser utilizados para discriminar e identificar isolados em nível de espécie (SCHOCH *et al.*, 2012). Os marcadores secundários mais indicados para *Aspergillus* são regiões dos genes que codificam a  $\beta$ -tubulina (*BenA*), calmodulina (*CaM*) e os genes da segunda subunidade maior da RNA polimerase II (RPB2) (SAMSON *et al.*, 2014). Estes marcadores são capazes de discriminar, inclusive, espécies crípticas. São consideradas crípticas duas ou mais espécies classificadas como uma única espécie nominal por apresentarem características morfológicas indistinguíveis. Espécies crípticas são frequentes em fungos porque o processo de especiação nestes organismos nem sempre é acompanhado por mudanças morfológicas (GAUTIER; NORMAND; RANQUE, 2016). As

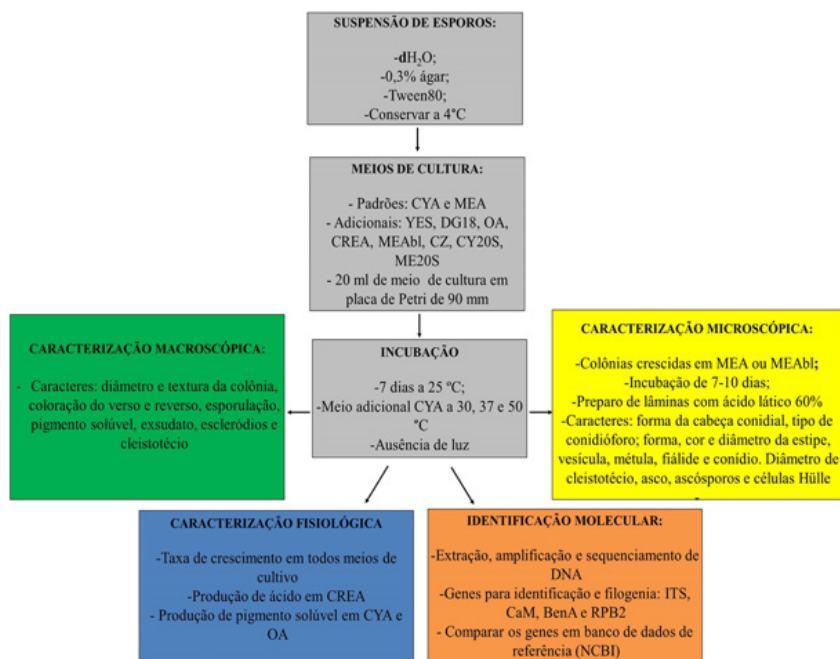
implicações da identificação de espécies crípticas de *Aspergillus* vão além da possibilidade de termos uma classificação taxonômica mais precisa e um melhor conhecimento da diversidade do gênero. Por exemplo, a incapacidade de identificar espécies crípticas patogênicas de *Aspergillus* pode dificultar os esforços para seu controle, uma vez que, diferentes espécies podem responder de modo diferente às medidas de controle e o diagnóstico incorreto pode agravar o quadro de infecção (GAUTIER; NORMAND; RANQUE, 2016).

Atualmente, a identificação e a descrição de novas espécies fúngicas são realizadas utilizando uma abordagem polifásica, ou seja, várias características do isolado são analisadas além da morfologia, como características fisiológicas, genéticas, ecológicas e evolutivas, esta última a partir de filogenias moleculares *multilocus*. As análises empregadas na abordagem polifásica para identificar e descrever novas espécies de *Aspergillus* serão descritas no tópico a seguir.

### **Identificação polifásica**

Historicamente, a classificação de espécies do gênero *Aspergillus* era avaliada por meio de uma abordagem fenotípica, baseando-se apenas em características morfológicas macroscópicas e microscópicas. A descrição baseada apenas em caracteres morfológicos pode ser pouco precisa, pois muitas espécies de *Aspergillus* possuem diferenças fenotípicas indistinguíveis de espécies relacionadas, como no caso das espécies crípticas citadas no tópico anterior. Para solucionar tais problemas, uma abordagem polifásica foi proposta com o intuito de integrar diferentes informações na descrição de uma espécie. Assim, dados morfológicos, fisiológicos, moleculares e filogenéticos são empregados para delimitar uma espécie (SAMSON *et al.*, 2014). Para isso, as metodologias utilizadas devem seguir critérios padronizados no intuito de evitar classificações inconsistentes. As condições e métodos utilizados na descrição polifásica de *Aspergillus* estão resumidas na (Figura 4) e serão abordadas detalhadamente.

**Figura 4.** Fluxograma com os métodos utilizados para a identificação e caracterização de espécies do gênero *Aspergillus*.



Fonte: Cristiane Figueiredo e Harisson de Souza.

### Caracterização morfológica

Na taxonomia polifásica, os critérios taxonômicos convencionais como morfologia celular, ciclo sexual e os tipos de esporos são ainda úteis para a identificação das espécies ao nível de gênero e ajudam na sua caracterização descritiva (SAMSON *et al.*, 2014). A caracterização morfológica é feita utilizando tanto dados macroscópicos como microscópicos. Os principais caracteres das colônias utilizados na descrição de espécies incluem taxas de crescimento das colônias, textura, cor e nível de esporulação, produção de escleródios ou cleistotécio, coloração do micélio, reverso da colônia, pigmentos solúveis, exsudatos e células Hülle.

Para realizar a análise microscópica são avaliadas estruturas relacionadas com a reprodução assexuada e sexuada (Figura 4). A avaliação dos conidióforos permite classificar o formato da cabeça conidial, a presença ou ausência de métulas entre a vesícula e fiálides (ou seja, unisseriados ou bisseriados), diâmetro, forma e textura dos estipes, vesículas, métulas, fiálides, conídios e células Hülle (quando presentes). Os parâmetros usados na descrição de estruturas assexuadas também são utilizados na caracterização de estruturas sexuadas como cleistotécio, ascos e ascósporos. O tamanho e as ornamentações (rugosidade, sulcos, etc.) presentes nos ascósporos são características que ajudam no diagnóstico e delimitação das espécies. Após a análise dos caracteres, uma tabela é preparada para comparar as características do isolado analisado com as características das espécies filogeneticamente próximas (Tabela 1).

**Tabela 1.** Características morfológicas que distinguem duas espécies próximas: *Aspergillus bezerrae* e *Aspergillus wyomingensis*.

Características		Espécies	
		<i>Aspergillus bezerrae</i>	<i>Aspergillus wyomingensis</i>
Tamanho das colônias (mm) após 7 dias	CYA 25 °C	40-43	52-58
	CYA 37 °C	29-34	65-70
	MEAbI 25 °C	35-41	43-44
	MEAbI 45 °C	Não cresceu até 7 dias	Até 16
	YES	68-70	68-70
	CREA	36-44	46-50
Características das colônias	CZ	35-41	38-42
		36-41	
	Ácido em CREA Pigmento solúvel em CYA	Ausente Amarelo brilhante	Sim Não
Características microscópicas	Comprimento/largura (µm) das estipes Ascoma a 37 °C	13-178 x 2-3 Ausente	Até 275 x 4-6,5 Presente

O primeiro passo na caracterização morfológica e fisiológica de *Aspergillus* é a avaliação do crescimento do isolado em diferentes



meios de cultura e condições de incubação. Os meios de cultura e as condições de incubação são padronizados para que seja possível comparar as características morfológicas e fisiológicas do isolado analisado com as características de espécies filogeneticamente próximas a ele. É recomendável usar como inóculo nessas análises uma suspensão de esporos com 0,3% de ágar e 0,001% de *Tween* 80. Essa suspensão de esporos deve ser armazenada a 4 °C e manipulada apenas em condições assépticas, para prevenir contaminação. Com o auxílio de uma micropipeta, 0,5-1µl da suspensão de esporos são dispostos em um padrão de três pontos equidistantes no meio de cultivo em placas de Petri 90 mm de vidro ou de poliestireno com 20 ml de meio de cultura. Volumes acima ou abaixo de 20 ml interferem no crescimento e esporulação dos isolados. (OKUDA *et al.*, 2000; SAMSON *et al.*, 2014). Em seguida, as placas são incubadas de modo invertido a 25 °C durante sete dias (Figura 4). Placas com o meio de cultivo ágar de autolisado de levedura de Czapek (CYA) são incubadas também a 30 e 37 °C para facilitar o desenvolvimento de isolados que crescem apenas nessas faixas de temperatura. Para espécies de algumas seções, como *Fumigati*, é necessária a incubação de placas com o meio de cultura CYA em temperaturas que variam de 45 a 50 °C (VISAGIE *et al.*, 2014).

Meios de cultivos específicos fornecem muitas condições necessárias para o desenvolvimento de caracteres que podem ser utilizados na separação de espécies. O ágar de autolisado de levedura de Czapek (CYA) e o ágar extrato de malte (MEA) são meios padrão recomendados na descrição das espécies de *Aspergillus* pois fornecem informações sobre a taxa de crescimento, esporulação e coloração e textura das colônias. Tanto a coloração como a textura da colônia são características que podem mudar ao longo dos dias, por isso, a padronização dos métodos de avaliação dos caracteres morfológicos deve ser seguida rigorosamente.

Meios adicionais são utilizados para observar uma maior variedade de caracteres. Os meios de cultura ágar de Czapeck (CZ) e o

ágar de Blakeslee MEA (MEAb1) foram utilizados em muitas descrições de fungos por Raper e Fennell (1965) e tradicionalmente ainda são utilizados na comparação de espécies. O ágar creatina-sacarose (CREA) é um meio de cultura de cor roxo, que se torna amarelo ao redor das colônias após a produção de ácidos por algumas espécies, essa característica fisiológica é fundamental na separação de espécies próximas (SAMSON *et al.*, 2014). Os meios de cultivo ágar CYA com 20% de sacarose (CY20S), ágar dicloro 18% de glicerol (DG18) e ágar extrato de malte com 20% de sacarose (M20S) estimulam o crescimento de isolados que apresentam baixa atividade de água. Já os meios de cultura ágar de sacarose e extrato de levedura (YES) e CYA são necessários para a produção de metabólitos secundários, denominados extrólitos (SAMSON *et al.*, 2014). O meio de cultura ágar de aveia (OA) pode promover a rápida produção de estruturas sexuadas como o cleistotécio em algumas espécies de *Aspergillus*. O preparo do meio de cultivo OA necessita de bastante atenção, por isso, recomendamos aquecer os flocos de aveia com água destilada em placa aquecedora por duas horas a 80 °C e em seguida filtrá-lo com tecido permeável. As formulações para preparo dos meios de cultivo estão resumidas na Tabela 2.

As observações microscópicas requerem poucos meios de cultivo em comparação com a caracterização macroscópica. Salvo a especificidade de algum táxon do gênero, os isolados são transferidos para o meio de cultura MEA a 25 °C por um período de 7-10 dias para observação e análises microscópicas. Após esse período, as estruturas microscópicas como conidióforo, fiálide, métula e conídio são medidas e analisadas quanto a estrutura. É necessário analisar a estrutura e medir, no mínimo, 80 estruturas assexuadas (conidióforos, fiálide, métulas e conídios) (SAMSON *et al.*, 2014). Para a observação de estruturas sexuadas (cleistotécios), os isolados são cultivados em meio OA a 25 °C por duas ou mais semanas. Após esse período o micélio é transferido para lâminas, fixados com ácido lático e visualizados sob o microscópio de luz (Figura 4) (OKUDA *et al.*, 2000). As microestruturas

sexuadas são analisadas quanto ao tipo, forma, cor, textura e dimensões e por fim, fotografadas.

### Caracterização molecular

A introdução de técnicas de biologia molecular na taxonomia teve início nos anos 90. O desenvolvimento e automação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) combinada com o uso *primers* universais tornou possível amplificar regiões gênicas específicas do genoma dos organismos. Isto facilitou a obtenção de sequências nucleotídicas homólogas de diferentes organismos e usá-las para inferir sobre as relações evolutivas entre eles. O *operon* que codifica os RNAs ribossomais foi uma das primeiras regiões genômicas usadas com esta finalidade em estudos taxonômicos de fungos (XU, 2016).

Os RNAs ribossomais são encontrados em todas as células vivas e estão relacionados com a transcrição e síntese proteica, processos conservados, geralmente em todos os seres vivos. Portanto, a modelagem das mudanças evolutivas nesta região pode ser usada para inferir sobre a evolução dos organismos, uma vez que os RNAs ribossomais dos seres vivos são homólogos. Em eucariotos, o *operon* dos RNAs ribossomais contém os genes que codificam o RNAr 18S, o RNAr 5.8S e o RNAr 28S, arranjados nesta ordem (Figura 5).

**Tabela 2.** Soluções e meios de cultivo utilizados na caracterização morfológica e fisiológica de espécies do gênero *Aspergillus*.

<b>Solução estoque Czapek (100 ml)</b>		Conservar a 4-10 °C	
NaNO <sub>3</sub> NaNO <sub>3</sub>	30 g	<b>Agar creatina-sacarose (CREA)</b>	
KCl	5 g	Sacarose	30 g
MgSO <sub>4</sub> – 7H <sub>2</sub> O	5 g	Creatina – 1H <sub>2</sub> O	3g
FeSO <sub>4</sub> – 7H <sub>2</sub> O	0,1 g	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> – 7H <sub>2</sub> O	1,6 g
dH <sub>2</sub> O	100 ml	MgSO <sub>4</sub> – 7H <sub>2</sub> O	0,5 g
Conservar a 4-10 °C		KCl	0,5 g
<b>Ágar extrato de malte de Blakeslee (MEA bl)</b>		FeSO <sub>4</sub> – 7H <sub>2</sub> O	0,01 g
Extrato de malte	10 ml	Solução estoque de elementos traços	1 ml
Peptona	1 g	Bromocresol purpúro	0,05 g
Glicose	20 g	Ágar	20 g
Solução estoque de elemento traço	1 ml	dH <sub>2</sub> O	1000 ml
Ágar	20 g	Autoclavar a 121 °C por 15 min. pH8.0	
DH <sub>2</sub> O	100 ml	<b>Ágar de Czapek (CZ)</b>	
Autoclavar a 121 °C por 15 min. pH 5.3		Concentrado Czapek	10 ml

<b>Ágar CYA com 20% de sacarose (CY20S)</b>		Sacarose	30 g
Concentrado Czapek	10 ml	Solução de elementos traços	1 ml
Sacarose	200 g	Ágar	20 g
Extrato de levedura	5 g	dH <sub>2</sub> O	1000 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g	Autoclavar a 121 °C por 15 min.	
Solução estoque de elementos traços	1 ml		
Ágar	20 g	<b>Ágar de sacarose e extrato de levedura (YES)</b>	
dH <sub>2</sub> O	1000 ml	Extrato de levedura	20 g
Autoclavar a 121 °C por 15 min. pH 5.4		Sacarose	150 g
		MgSO <sub>4</sub> – 7H <sub>2</sub> O	0.5 g
<b>Ágar de autolisado de levedura de Czapek (CYA)</b>		Solução estoque de elementos traços	1 ml
Concentrado Czapek	10 ml	Ágar	20 g
Sacarose	30 g	dH <sub>2</sub> O	885 ml
Extrato de levedura	5 g	Autoclavar a 121 °C por 15 min. pH 6.5	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g		
Solução estoque de elementos traços	1 ml	<b>Ágar extrato de malte (MEA)</b>	
Ágar	20 g	Extrato de malte (oxid)	50 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml	Solução estoque de elementos traços	1 ml
Autoclavar a 121 °C por 15 min. pH 6.2		Ágar	20 g
		dH <sub>2</sub> O	1000 ml
<b>Ágar de aveia (AO)</b>		Autoclavar a 121 °C por 15 min. pH 5.4	
Flocos de aveia	30 g		
Solução estoque de elementos traços	1 ml	<b>Ágar dicloro 18 % de glicerol (DG18)</b>	
Ágar	20 g	Dicloro base de ágar de glicerol	31.5 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml	Glicerol	220 g
Autoclavar a 121 °C por 15 min. pH 6.5		Solução estoque de elementos traços	1 ml
		Cloranfenicol	0.05 g
<b>Ágar extrato de malte (M20S)</b>		Ágar	20 g
Extrato de malte (oxid)	50 g	dH <sub>2</sub> O	1000 ml
Sacarose	200g	Autoclavar a 121 °C por 15 min. pH 5.6	
Solução estoque de elementos traços	1 ml		
Ágar	20 g		
dH <sub>2</sub> O	1000 ml		
Autoclavar a 121 °C por 15 min. pH 5.4			
<b>Solução estoque de elementos traços (100 ml)</b>			
CuSO <sub>4</sub> – 5H <sub>2</sub> O	0.5 g		
ZnSO <sub>4</sub> – 7H <sub>2</sub> OZ	0.1 g		
dH <sub>2</sub> O	100 ml		

O gene do RNAr 5.8S é separado dos genes dos RNAr 18S e 28S pelas sequências espaçadoras internas 1 e 2, respectivamente (*Internal Transcribed Sequence* - ITS1 e ITS2). Existem várias cópias deste operon em um genoma eucariótico. Em geral, elas estão dispostas em tandem e separadas por uma sequência nucleotídica denominada espaçador inter-gênico (IGS) (Figura 5).

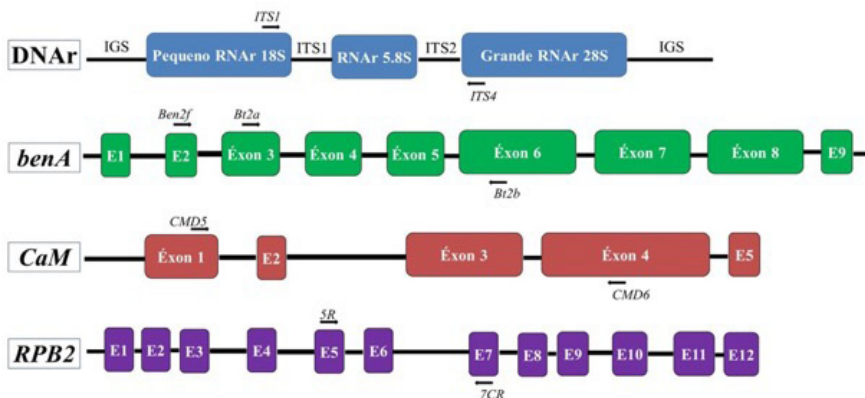
As sequências dos DNAr 18S, 5.8S e 28S são conservadas e podem ser usadas na filogenia de diferentes níveis taxonômicos, de filo a espécie. As regiões ITS1 e ITS2 são mais variáveis e apesar de recomendadas para a distinção de espécies, sendo até mesmo propostas como o DNA

*barcode* oficial para identificação de fungos (VU *et al.*, 2019), espécies próximas dentro do gênero *Aspergillus* não podem ser discriminadas (SCHOCH *et al.*, 2012). Entretanto, sequências de ITS ainda são úteis para determinar em qual seção um isolado de *Aspergillus* está contido, essa informação é necessária para definir quais espécies serão incluídas nas análises filogenéticas realizadas para identificar ou descrever uma nova espécie de *Aspergillus*.

Devido às limitações do uso do ITS para distinguir espécies próximas de *Aspergillus*, outros marcadores são, tais como calmodulina (*CaM*),  $\beta$ -tubulina (*benA*) ou a segunda maior subunidade da RNA polimerase II (RPB2) (SAMSON *et al.*, 2014) (Figura 5). O gene calmodulina codifica para um receptor de  $Ca^{2+}$  intracelular e seu principal papel é participar em sinalizações químicas que levam a proliferação e progressão celular. O gene calmodulina é o marcador molecular mais indicado nos estudos filogenéticos de *Aspergillus* por ser facilmente amplificado por PCR e distinguir espécies intimamente relacionadas, além de estar disponível para quase todas as espécies descritas (VISAGIE *et al.*, 2014).

O terceiro marcador mais utilizado é o gene *BenA*, que codifica a  $\beta$ -tubulina, uma das subunidades que compõem os microtúbulos, estrutura que faz parte do citoesqueleto dos eucariotos. Assim como calmodulina, *BenA* também pode ser facilmente amplificado, entretanto, em algumas espécies da seção *Nigri* os *primers* utilizados para amplificar o gene *BenA* podem amplificar de modo inespecífico uma região de *tubC*, um parálogo do gene. O uso das sequências de *tubC* em análises filogenéticas de *Aspergillus* resulta em inferência incorretas sobre as relações evolutivas entre as espécies incluídas nas análises (HUBKA; KOLARIK, 2012).

**Figura 5.** Estrutura de uma unidade de DNAr, dos genes beta tubulina, calmodulina e RPB2 e as regiões amplificadas nos estudos de filogenia molecular multilocus de espécies do gênero *Aspergillus*.



Fonte: Cristiane Figueiredo, Harisson de Souza.

Filogenias moleculares que visam inferir relações evolutivas entre espécies devem ser realizadas apenas com sequências nucleotídicas ortólogas. Devido a essa limitação, os parálogos de  $\beta$ -tubulina são frequentemente misturados em análises filogenéticas, gerando clados inconsistentes na taxonomia do gênero *Aspergillus*. Hubka e Kolarik (2012) conseguiram solucionar a amplificação de parálogos, desenvolvendo *primers* mais específicos como o *Ben2f* (Tabela 3) capazes de amplificar apenas o gene *BEN1*.

O marcador molecular RPB2 é também utilizado em filogenias de *Aspergillus*, pode distinguir espécies intimamente relacionadas, entretanto sua amplificação nem sempre é fácil, o que acaba dificultando seu uso em estudos polifásicos (SAMSON *et al.*, 2014). A filogenia molecular utiliza em suas análises, a combinação de múltiplos marcadores moleculares para garantir a robustez e confiança nos clados gerados, separando, desse modo, espécies intimamente relacionadas. Abaixo estão listados os *primers* para amplificação dos genes utilizados para a identificação das espécies do gênero *Aspergillus* (SAMSON *et al.*, 2014; HUBKA; KOLARIK, 2012) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Oligonucleotídeos utilizados na amplificação e sequenciamento de regiões gênicas e intergênicas de espécies do *Aspergillus*.

Locus	Nome do primer	Sentido	Sequência do primer (5'-3')	Tamanho (pb)
ITS	ITS1	<i>Forward</i>	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	600
	ITS4	<i>Reverso</i>	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	
<i>BenA</i>	Bt2a	<i>Forward</i>	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC	550
	Bt2b	<i>Reverso</i>	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	
	Ben2f	<i>Forward</i>	TCC AGA CTG GTC AGT GTG TAA	620
	Bt2b	<i>Reverso</i>	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	
<i>CaM</i>	CMD5	<i>Forward</i>	CCG AGT ACA AGG ARG CCT TC	580
	CMD6	<i>Reverso</i>	CCG ATR GAG GTC ATR ACG TGG	
RPB2	5F	<i>Forward</i>	GAY GAY MGW GAT CAY TTY GG	1000
	7CR	<i>Reverso</i>	CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT	

Fonte: Houbraken *et al.* (2014).

Após amplificação e sequenciamento de cada região gênica, as sequências nucleotídicas obtidas de cada isolado são comparadas com sequências ortólogas de outras espécies depositadas em bancos dados, como o *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, utilizando o programa BLASTN (ALTSCHUL, *et al.*, 1997). Esta comparação inicial entre as sequências visa identificar quais espécies são filogeneticamente relacionadas com os isolados em estudo e assim determinar qual seção taxonômica do gênero *Aspergillus* os isolados pertencem. As sequências nucleotídicas de todas as espécies Tipo da seção em que o isolado está inserido são recuperadas e armazenadas em um arquivo '.txt' ou '.fasta', junto com as sequências ortólogas dos isolados que estão sendo estudados. Essas sequências de nucleotídeos são armazenadas em um arquivo. Não é necessário incluir sequências de espécies outras seções do gênero, pois elas são distantemente relacionadas com o isolado.

O próximo passo é fazer o alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos, ele é sua hipótese de homologia posicional entre as

bases nucleotídicas das sequências analisadas. Ou seja, é a inferência de homologia das bases das sequências que estão sendo estudadas. O alinhamento múltiplo permite inferir qual base de uma dada sequência é homóloga a uma dada base de outra sequência do alinhamento múltiplo. Existem muitos programas gratuitos que fazem alinhamento múltiplo de sequências disponíveis na internet, uma lista deles pode ser encontrada no site <https://www.expasy.org>, um portal em que estão listados vários programas e bases de dados de bioinformática.

O procedimento seguinte é usar o alinhamento múltiplo para estimar qual modelo evolutivo melhor explica como as sequências incluídas no alinhamento evoluíram ao longo do tempo. Essa informação será usada para fazer a análise filogenética. Atualmente, a máxima verossimilhança e a análise bayesiana são os métodos de reconstrução filogenética mais utilizados. A confiabilidade de cada nó da árvore filogenética obtida deve ser estimada antes que ela seja analisada, o método estatístico mais utilizado para isso é o *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985). O programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis* - TAMURA *et al.*, 2013) é uma plataforma gratuita em que é possível executar todos os procedimentos de uma análise filogenética e está disponível no link <https://www.megasoftware.net>.

A taxonomia das espécies do gênero *Aspergillus* passou por diversas modificações ao longo do tempo. A descrição e classificação do gênero com base em uma abordagem polifásica possibilitou inferir com maior precisão as relações evolutivas entre as espécies de *Aspergillus* e resultou na última reorganização taxonômica do gênero. O uso de ferramentas adicionais à abordagem polifásica tem permitido gerar informações mais robustas de modo a ampliar e refinar nosso conhecimento sobre a taxonomia e diversidade do gênero *Aspergillus*. Por exemplo, estimativas indicam que o número de espécies de *Aspergillus* está subestimado (ALASTRUEY-IZQUIERDO *et al.*, 2012).



A técnica de MALDI-TOF vem sendo utilizada como ferramenta adicional para a identificação de espécies do gênero *Aspergillus* de importância médica (GAUTIER; NORMAND; RANQUE, 2016). A inclusão da ecologia e biogeografia também tem sido consideradas em alguns estudos de taxonomia polifásica de *Aspergillus*. Estas análises adicionais auxiliam na discriminação das espécies e fornecem dados ecológicos e biogeográficos preditivos de sua ocorrência e distribuição (BARBOSA *et al.*, 2020). Por fim, o desenvolvimento de métodos automatizados de sequenciamento de DNA de alto rendimento (NGS: *Next Generation Sequencing*) possibilitou o surgimento de uma nova abordagem em estudos de diversidade de comunidades microbianas em amostras ambientais, a metataxonômica (WU *et al.*, 2019). A disseminação do uso dessa abordagem em estudos de diversidade permitirá, em um futuro próximo, obter uma compreensão melhor da distribuição e diversidade das populações de *Aspergillus* na natureza.

## Referências

- ABDEL-AZEEM, A. M. *et al.* *Aspergillus*: Biodiversity, Ecological Significances, and Industrial Applications. *In: Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi*. Springer, Cham, 2019. p. 121-179.
- ADAMS, T. H.; WIESER, J. K.; YU, J. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 1, p. 35-54, 1998.
- ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; MELLADO, E.; CUENCA-ESTRELLA, M. Current section and species complex concepts in *Aspergillus*: recommendations for routine daily practice. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1273, n. 1, p. 18-24, 2012.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

BARBOSA, R. N. *et al.* Brazilian tropical dry forest (Caatinga) in the spotlight: an overview of species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* (*Eurotiales*) and the description of *P. vascosobrinhou* sp. nov. **Acta Botanica Brasilica**, v. 34, n. 2, p. 409-429, 2020.

BARY, A. **Ueber die Entwicklung und den Zusammenhang von *Aspergillus glaucus* und Eurotium**. 1854.

BEISSWENGER, C.; HESS, C.; BALS, R. *Aspergillus fumigatus* conidia induce interferon-signalling in respiratory epithelial cells. **European Respiratory Journal**, v. 39, n. 2, p. 411-418, 2012.

BIZUKOJC, M.; LEDAKOWICZ, S. Physiological, morphological and kinetic aspects of lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus*. **Biotechnology journal**, v. 4, n. 5, p. 647-664, 2009.

BRACARENSE, A. A. P.; TAKAHASHI, J. A. Modulation of antimicrobial metabolites production by the fungus *Aspergillus arasiticus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 313-321, 2014.

CHEN, A. J. *et al.* *Aspergillus* section *Nidulantes* (formerly *Emericella*): polyphasic taxonomy, chemistry and biology. **Studies in mycology**, v. 84, p. 1-118, 2016.

COLE, G. T. Basic biology of fungi. *In*: **Medical Microbiology. 4th edition**. University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.

CRAY, J. A. *et al.* The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds? **Microbial biotechnology**, v. 6, n. 5, p. 453-492, 2013.

DUARTE, E. A. A. *et al.* Putting the mess in order: *Aspergillus welwitschiae* (and not *A. niger*) is the etiological agent of sisal bole rot disease in Brazil. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1227, 2018.

FADIJI, A. E.; BABALOLA, O. O. elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 467, 2020.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

FRAÇ, M. *et al.* Fungal biodiversity and their role in soil health. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 707, 2018.

FRIES, E. M. Systema Mycologicum, vol. 3 (2). **E. Moritz, Greifswald**, 1832.

GAUTIER, M.; NORMAND, A-C.; RANQUE, S. Previously unknown species of *Aspergillus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 8, p. 662-669, 2016.

GUGNANI, H. C. Ecology and taxonomy of pathogenic aspergilli. **Front Biosci**, v. 8, n. 1-3, p. 346, 2003.

HOUBRAKEN, J.; DE VRIES, R. P.; SAMSON, R. A. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *In: Advances in applied microbiology*. Academic Press, 2014. p. 199-249.

HUBKA, V.; KOLARIK, M. -tubulin paralogue tubC is frequently misidentified as the benA gene in *Aspergillus* section *Nigri* taxonomy: primer specificity testing and taxonomic consequences. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 29, p. 1, 2012.

PITT J. L.; SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. List of accepted species and their synonyms in the family *Trichocomaceae*. **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification**, p. 9-49, 2000.

KAMEI, K.; WATANABE, A. *Aspergillus* mycotoxins and their effect on the host. **Medical mycology**, v. 43, n. Supplement\_1, p. S95-S99, 2005.

KATOCH, A.; KAPOOR, P. Recent concepts in fungal taxonomy: A review. **Journal of Agriculture and Allied Sciences**, v. 3, p. 23-35, 2014.

KRIJGSHELD, P. *et al.* Development in *Aspergillus*. **Studies in mycology**, v. 74, p. 1-29, 2013.

KUMAR, P. *et al.* Aflatoxins: a global concern for food safety, human health and their management. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 2170, 2017.

KWON-CHUNG, K. J.; SUGUI, J. A. Sexual reproduction in *Aspergillus* species of medical or economical importance: why so fastidious?. **Trends in microbiology**, v. 17, n. 11, p. 481-487, 2009.

LEVIĆ, J. *et al.* An outbreak of *Aspergillus* species in response to environmental conditions in Serbia. **Pesticidi i fitomedicina**, v. 28, n. 3, p. 167-179, 2013.

MICHELI, P. A. **Nova plantarum genera**. 1729.

MURRAY, P. R. **Microbiologia Medica**. Elsevier Brasil, 2006.

OKUDA, T. *et al.* Media and incubation effect on morphological characteristics of *Penicillium* and *Aspergillus*. **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classi**, p. 83-99, 2000.

PALACIOS-CABRERA, H. *et al.* Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 24-28, 2005.

PANDYA, N. D. *et al.* Plant growth promoting potential of *Aspergillus* sp. NPF7, isolated from wheat rhizosphere in South Gujarat, India. **Environmental Sustainability**, v. 1, n. 3, p. 245-252, 2018.

PARK, J-C. *et al.* Adaptation of *Aspergillus niger* to short-term salt stresses. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 40, n. 2-3, p. 394-398, 1993.

PASSOS, C. T. DOS *et al.* Biodegradação de fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp. isolada de um solo contaminado do sul do Brasil. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 950-954, 2009.

PERRONE, G. *et al.* Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in mycology**, v. 59, p. 53-66, 2007.

RAJA, H. A. *et al.* Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. **Journal of natural products**, v. 80, n. 3, p. 756-770, 2017.

RAPER, K. B. *et al.* The genus *Aspergillus*. **The genus *Aspergillus***, 1965.

RAVEENDRAN, S. *et al.* Applications of microbial enzymes in food industry. **Food technology and biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 16-30, 2018.

SÁ, F. O. **Controle biológico da podridão vermelha do Sisal (*Agave sisalana* Perrine) com *Trichoderma* ssp. e *Actinobactérias***. 2014.

SAMSON, R. A. *et al.* Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in mycology**, v. 78, p. 141-173, 2014.

SCHOCH, C. L. *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.

SHOW, P. L. *et al.* Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. **Frontiers in Life Science**, v. 8, n. 3, p. 271-283, 2015.

SKLENÁŘ, F. *et al.* Increasing the species diversity in the *Aspergillus* section *Nidulantes*: Six novel species mainly from the indoor environment. **Mycologia**, v. 112, n. 2, p. 342-370, 2020.

STEENWYK, J. L. *et al.* A robust phylogenomic time tree for biotechnologically and medically important fungi in the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. **MBio**, v. 10, n. 4, p. e00925-19, 2019.

TAMURA, K. *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TAYLOR, J. W. One fungus = one name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. **IMA fungus**, v. 2, n. 2, p. 113-120, 2011.

THOM, C.; RAPER, K. B. **A Manual of the Aspergilli**. LWW, 1945. VISAGIE, C. M. *et al.* Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). **Studies in Mycology**, v. 78, p. 1-61, 2014.

VU, D.*et al.* Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. **Studies in mycology**, v. 92, p. 135-154, 2019.

XU, J. Fungal DNA barcoding. **Genome**, v. 59, n. 11, p. 913-932, 2016.

YOSHIMI, A.; MIYAZAWA, K.; ABE, K. Cell wall structure and biogenesis in *Aspergillus* species. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 80, n. 9, p. 1700-1711, 2016.

# Diversidade taxonômica e identificação de *Penicillium*

Cristiane Nascimento Figueiredo  
Harisson Guimarães de Souza  
Valter Cruz-Magalhães  
Lucas Souza Sales  
Djalma Santana Neto  
Jorge Teodoro de Souza  
Jackeline Pereira Andrade  
Phellippe Arthur Santos Marbach

## Importância do gênero

*Penicillium* é um gênero do reino Fungi e está distribuído mundialmente sendo encontrado em uma variedade de habitats, no solo, ar, água, alimentos e vegetação (WANG, *et al.*, 2017). Algumas espécies de *Penicillium* são capazes de crescer em ambientes extremos, como em altas e baixas temperaturas, altas concentrações de sal e açúcar, baixa acidez ou mesmo em baixos níveis de oxigênio. Esse gênero fúngico ficou mundialmente conhecido em 1928 com a descoberta da penicilina, pelo médico microbiologista escocês Alexander Fleming. A penicilina produzida por *Penicillium chrysogenum* (renomeado *Penicillium rubens*) foi o primeiro antibiótico utilizado no tratamento contra infecções bacterianas (GAYNES, 2017).

Atualmente, biomoléculas produzidas por espécies de *Penicillium* são utilizadas na fabricação de importantes medicamentos. *Penicillium brevicompactum* produz a compactina, usada para controlar o colesterol, e o ácido micofenólico, usado como imunossupressor. A griseofulvina, amplamente usada como antifúngico, é produzida por *P. griseofulvum* (OXFORD, RAISTRICK, SIMONART, 1939; SHALIGRAM *et al.*, 2008). Estes exemplos ilustram a importância econômica do gênero *Penicillium* em diferentes setores da sociedade (VISAGIE *et al.*, 2014).

Algumas espécies de *Penicillium* são utilizadas na indústria alimentícia, para a produção de queijos especiais. *Penicillium roquefort* é usado como cultura inicial na fermentação dos queijos azuis (Roquefort, Stilton, Gorgonzola, Danablu, Cabrales) (ROPARS *et al.*, 2017). *Penicillium camemberti* é usado na produção dos queijos brancos Camembert e Brie. Ainda na produção de alimentos, as espécies *P. nalgiovense* e *P. salamii* são utilizadas no processo de fermentação para a produção de salsichas. Culturas de *Penicillium nalgiovense* são aplicadas como inibidores do crescimento de microrganismos indesejáveis na fabricação de produtos embutidos como salames e carnes enlatadas (CASTRO; LUCHESE; MARTINS, 2000). Outras espécies são utilizadas na produção de vitaminas, enzimas e pigmentos naturais (YAO *et al.*, 2016; SCHNEIDER *et al.*, 2016).

Os biossurfactantes são compostos de origem microbiana com características tensoativas utilizados nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia (SANTOS *et al.*, 2016). Espécies de *Penicillium* são conhecidas pela flexibilidade de produção de diferentes tipos de biossurfactantes, como os fosfolipídios, ácidos graxos, glicolipídios, lipopeptídeos e polímeros complexos (GAUTAM *et al.*, 2014). Biossurfactantes produzidos por *Penicillium* possui vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, pois são biodegradáveis, atóxicos para o meio ambiente e apresentam maior eficácia em condições físico-químicas extremas (temperatura, pH e salinidade) (GAUTAM *et al.*, 2014; YADAV *et al.*, 2018). Essas propriedades permitem a aplicabilidade de *Penicillium* spp. como biorremediadores capazes de atuar na biodegradação de derivados do petróleo e na remoção de metais pesados presentes na água (YILMAZ; DENIZLI, 2003; VANISHREE; THATHEYUS; RAMYA, 2014; SAY).

As espécies de *Penicillium* possuem um importante papel na ciclagem de nutrientes, uma vez que são importantes decompositoras de material orgânico. Por outro lado, espécies desse gênero podem causar deterioração em alimentos durante as etapas de pré e pós-



colheita, transporte e armazenamento. Por exemplo, *P. expansum*, *P. digitatum* e *P. italicum*, são causadores do “mofo azul” em plantas frutíferas, como maçã e citros. Entretanto, outras espécies desse gênero são capazes de promover o crescimento de plantas, solubilizar minerais e atuar como antagonistas de fitopatógenos. As espécies *P. roqueforti* e *P. citrinum*, podem controlar o crescimento de *Aspergillus niger*, fungo causador da podridão negra em cebolas e de *Botrytis cinerea*, agente causador do mofo no grão de bico (KHOKHAR *et al.*, 2012; SREEVIDYA *et al.*, 2015).

Espécies de *Penicillium* produzem uma grande variedade de metabólitos secundários tóxicos à saúde humana encontrados principalmente em alimentos. Essas micotoxinas causam grande prejuízo na agricultura e na indústria de alimentos, contaminando principalmente as culturas de cereais como trigo, nozes, milho e amendoim e alimentos como queijo, presunto, embutidos e enlatados (GREEFF-LAUBSCHER, 2020). O consumo contínuo de micotoxinas pode levar a efeitos carcinogênicos, neurotóxicos, nefrotóxicos ou imunossupressores.

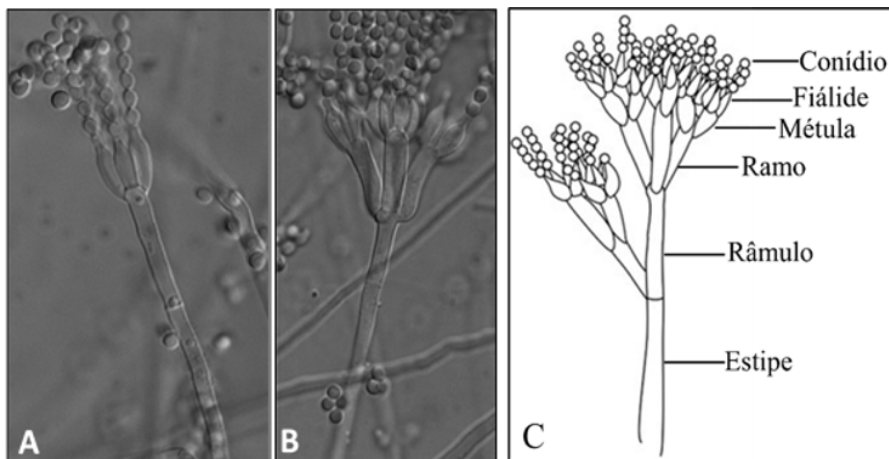
As principais micotoxinas produzidas por espécies de *Penicillium* são a ocratoxina A, rubrosulfina, viopurpurina, viomelina, citrinina, citreoviridina, islanditoxina, ácido ciclopiazônico e patulina (ZAIN, 2011). Apesar dos efeitos maléficos, as micotoxinas podem ser úteis na distinção de espécies de *Penicillium* que apresentam caracteres morfológicos semelhantes (FRISVAD, 2014). Por exemplo, *P. aurantiogriseum* e *P. commune* são morfológicamente similares, no entanto, *P. aurantiogriseum* sintetiza ácido penicílico não produz o ácido ciclopiazônico, que é produzido por *P. commune*. Espécies desse gênero raramente são patogênicas para humanos, pois dificilmente crescem a 37 °C. Espécies de *Penicillium* podem causar infecções respiratórias oportunistas em humanos, contudo isso é raro. Em geral, essas infecções ocorrem em indivíduos que estão com a imunidade comprometida por doença ou pelo uso de fármacos imunossupressores

(GUEVARA-SUAREZ *et al.*, 2016).

## Morfologia e reprodução

O nome *Penicillium* foi introduzido pela primeira vez por Heinrich Link há mais de 200 anos para descrever um novo gênero de fungo filamento que possuía conidióforos, semelhantes a um pincel (Figura 1A e 1B). Os conidióforos são estruturas reprodutivas assexuadas que possuem importantes características para a taxonomia do gênero *Penicillium*. Essas estruturas podem apresentar padrões simples ou complexos, com uma variedade de estágios de ramificações simétricos ou assimétricos (Figura 1C).

**Figura 1.** A e B) Conidióforos simétricos de *Penicillium* sp. em forma de pincel. C) Ilustração de conidióforo com padrões assimétricos e seus respectivos componentes.



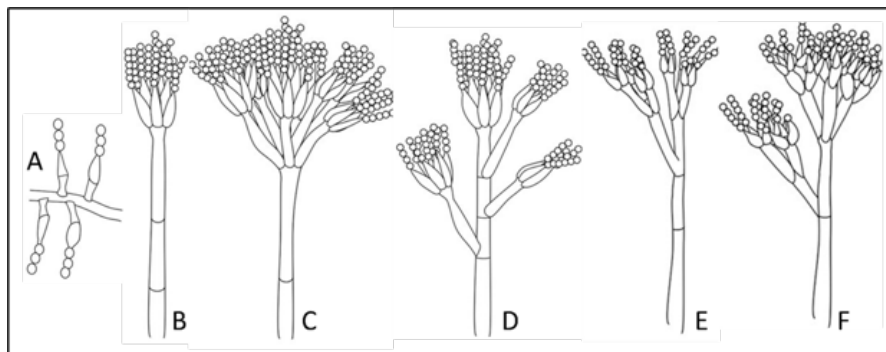
Fonte: Cristiane Figueiredo, Harisson de Souza e Lucas Sales.

De acordo com os padrões de ramificação, os conidióforos são classificados em: conidióforos com fiálides solitárias, monoverticilados, biverticilados, divaricados, tertverticilados e quaterverticilados (Figura 2).

Conidióforos com fiálides solitárias não possuem métulas e em alguns casos as fiálides surgem diretamente da hifa vegetativa (Figura

2A). Os conidióforos monoverticilados são caracterizados por possuir apenas um verticilo terminal de fiáldes em seu ápice (Figura 2B), e em algumas espécies, a célula terminal do conidióforo se expande e forma uma vesícula. O ápice dos conidióforos biverticilados apresenta dois verticilos, um conjunto de duas ou mais métulas entre o final da estirpe e as fiáldes (Figura 2C). As métulas de um mesmo conidióforo podem apresentar tamanho distinto e forma variada (vesiculada a clavada). Os conidióforos divaricados também são conhecidos como irregulares e apresentam um padrão de ramificação simples a complexo, com métulas e ramos subterminais de tamanho divergente (Figura 2D). Os conidióforos terverticilados possuem outro nível de ramificação entre a estirpe e as métulas (Figura 2E). Enquanto os conidióforos quaterverticilados são produzidos por poucas espécies e apresentam dois níveis de ramificação entre o ápice da estirpe, métulas e fiáldes (Figura 2F e Figura 1C). Ambos os conidióforos terverticilados e quaterverticilados tendem a ser visivelmente assimétricos.

**Figura 2.** Padrões de ramificação de conidióforos do gênero *Penicillium*. A. Conidióforos com fiáldes solitárias. B. Monoverticilado. C. Biverticilado. D. Divaricado. E. Terverticilado. F. Quaterverticilados.



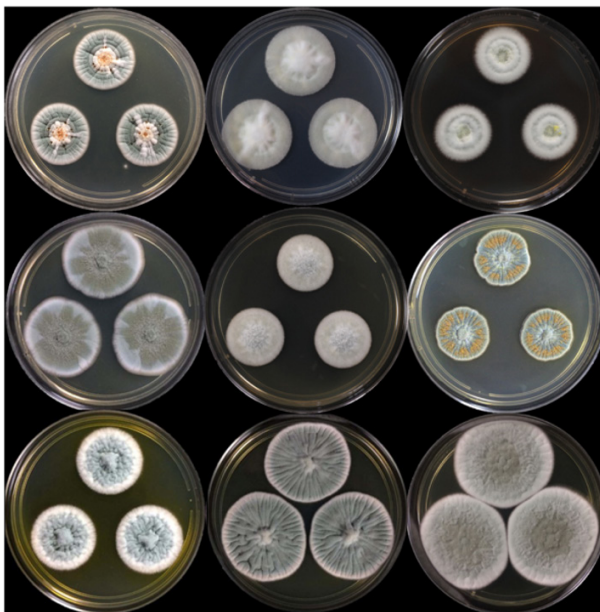
Fonte: Lucas Sales.

As fiáldes são estruturas responsáveis pela produção de conídios, esporos assexuais, e para a maioria das espécies de *Penicillium* apresentam forma ampuliforme (Figura 1C). Os conídios apresentam

coloração que varia principalmente em tons de cinza a azul e verde-azulado. Entretanto, a coloração dos conídios não é um critério utilizado para identificação e distinção de espécies de *Penicillium*, uma vez que essa característica é pouco variável entre as espécies do gênero.

Em relação a macromorfologia, as colônias de *Penicillium* comumente apresentam uma ampla variedade de cores como verde acinzentado, laranja, amarelo, azul, cinza e branco, às vezes, frequentemente mais de uma cor pode estar presente em uma colônia (Figuea 3).

**Figura 3.** Culturas de isolados de espécies de *Penicillium* com 7 dias de crescimento em diferentes meios de cultura a 25 °C. Da esquerda para direita: primeira fila, verso em CYA; segunda fila, verso em MEAbI; terceira fila, verso em YES. Espécies da esquerda pra direita na primeira fila: *P. citrinum*, *P. guaibinense* e *P. reconvexoveloso*; na segunda fila: *P. paxilli*, *P. guaibinense* e *P. guanacastense*; na terceira fila: *P. citrinum*, *P. paxilli* e *P. pedernalense*.



Fonte: Cristiane Figueiredo, Harisson de Souza.

As colônias podem apresentar diferentes texturas como flocosa, velutinosa, fasciculada e sinematosa. Colônias com textura flocosa

apresentam uma massa felpuda de hifas ramificadas e entrelaçadas com micélio aéreo semelhante a pequenos flocos. Na textura velutinosa os conidióforos são produzidos individualmente e formam uma superfície densa e uniforme que dão as colônias aspecto aveludado. A textura fasciculada ocorre quando os conidióforos são agrupados formando pequenos tufo, sendo encontrados principalmente na borda das colônias. As colônias com textura sinematosa raramente são encontradas em espécies de *Penicillium* e são caracterizados por possuírem conidióforos com um talo e uma cabeça bem definidos, encontrados principalmente nas espécies *P. vulpinum*, *P. clavigerum* *P. coprobium* e *P. formosanum* (FRISVAD; SAMSON, 2004). As colônias das espécies de *Penicillium* podem ser planas, apresentar crateras ou zonas enrugadas, além de possuir sulcos radiais ou concêntricos. O estudo da macromorfologia é relevante para a descrição e caracterização das espécies, além de ser útil na classificação subgenérica.

De acordo com a forma de reprodução, os fungos podem ser classificados em: teleomorfos, anarmofos e holomorfos. Teleomorfo é a designação dada à forma sexuada de um fungo, anamorfo refere-se à sua forma assexuada e holomorfo é a designação que inclui tanto a fase sexuada como a assexuada do fungo. Os tipos de reprodução assexuada mais comuns incluem a brotação simples e a produção de conídios, formado na extremidade das fiálides por divisão mitótica. Após a mitose um dos núcleos migra para a extremidade da fiálide, e em seguida ocorre a formação de uma parede divisória que separa o novo conídio da célula mãe, a fiálide. Consecutivamente, os conídios que são recém produzidos empurram o conídio que está na extremidade da fiálide para fora, formando assim uma cadeia de conídios (Figuras 1 e 2). Os conídios são facilmente dispersos pelo ar, e germinam quando encontram condições favoráveis. Quando eles germinam ocorre a formação e desenvolvimento do tubo germinativo seguida da formação de septos dando origem a um novo micélio.

Na reprodução sexuada, a maioria das espécies de *Penicillium* são homotáticas, ou seja, produzem gametas geneticamente compatíveis e autofecundáveis. Nesse tipo de reprodução, o citoplasma das hifas de um mesmo isolado fúngico são unidas em um processo chamado plasmogamia e em seguida ocorre a fusão dos dois núcleos (cariogamia). Esse novo núcleo diploide sofre meiose, seguido de mitose originando oito ascósporos haploides. Os ascósporos são formados dentro dos ascos, que por sua vez se encontram no interior de uma estrutura chamada cleistotécio. O ciclo de vida é reiniciado quando o ascósporo encontra um substrato adequado e germina. A forma, dimensão e ornamentações de estruturas sexuadas como cleistotécio, asco e ascósporo apresenta grande variação entre as espécies de *Penicillium*, assim, essas microestruturas são taxonomicamente úteis pois podem ser usadas na distinção de espécies próximas.

### **Histórico da taxonomia**

O gênero *Penicillium* evoluiu há 73,6 milhões de anos, no período Cretáceo (STEENWYK *et al.*, 2019). Esse gênero pertence ao Domínio *Eukarya*, Reino *Fungi*, Filo *Ascomycota*, Classe *Eurotiomycetes*, Ordem *Eurotiales*, Família *Aspergillaceae*, sendo dividido em 2 subgêneros e em 26 seções (HOUBRAKEN *et al.*, 2016). Este gênero foi introduzido em 1809 pelo naturalista Heinrich Link com a descrição de três espécies: *P. candidum*, *P. expansum* e *P. glaucum*. Aproximadamente 65 anos depois Brefeld observou pela primeira vez e caracterizou detalhadamente o ciclo de vida em *P. glaucum*. Em 1901, Dierckx introduziu o primeiro sistema de classificação subgenérico para o gênero *Penicillium*. Thom (1930) verificou que muitas espécies de *Penicillium* publicadas eram sinônimas ou não seguiam os critérios de classificação, ele revisou todas as espécies descritas até 1930, e considerou 300 espécies para o gênero. Quase duas décadas depois Raper e Thom (1949), revisaram o gênero e, com base em características morfológicas e fisiológicas, consideraram 137 espécies.

Em 1955, Benjamin estabeleceu um novo gênero, *Talaromyces*, e incluiu nesse novo táxon espécies de *Penicillium* que possuíam conidióforos biverticilados simétricos e ascos contendo ascósporos dispostos em cadeias curtas (NICOLETTI; TRINCONE, 2016; SAMSON *et al.*, 2011). Do ponto de vista morfológico, *Penicillium* e *Talaromyces* apresentam algumas diferenças marcantes. As fiálides das espécies de *Talaromyces* são mais estreitas, conhecidas como aculeadas ou lanceoladas, enquanto as fiálides de *Penicillium* são mais largas e com formato ampuliforme (SAMSON *et al.*, 2011). As estruturas reprodutivas sexuadas de *Talaromyces* possuem paredes celulares sem nenhuma rigidez. Essas estruturas são compostas por múltiplas camadas de hifas entrelaçadas e os ascomas amadurecem rapidamente, geralmente dentro de algumas semanas. Em *Penicillium*, as espécies produzem estruturas reprodutivas sexuadas semelhantes a esclerócios formadas por células com paredes espessa que conferem rigidez e uma maior resistência e a maturação das estruturas reprodutivas pode durar meses.

Com base na morfologia dos conidióforos e no seu padrão de ramificação, Pitt (1979) revisou o gênero *Penicillium* e aceitou 150 espécies e subdividiu o gênero em quatro subgêneros: *Penicillium*, *Biverticillium*, *Aspergilloides* e *Furcatum* (HOUBRAKEN; SAMSON, 2011). No ano de 1982, com base no sistema de Raper e Thom (1949), Ramirez fez a descrição de novas espécies e aceitou 252 espécies de *Penicillium*. Neste mesmo ano o subgênero *Eupenicillium* foi proposto para abrigar as espécies de *Penicillium* produtoras de cleistotécio, ou seja, que se reproduziam sexuadamente. No entanto, esse sistema de classificação infragenérico sofreu inúmeras mudanças, pois diferentes autores utilizaram características morfológicas diferentes para classificar os subgrupos de *Penicillium*. Houbraken e Samson (2011) investigaram por meio de filogenia molecular multigênica a relação de *Penicillium* com outros gêneros da Família *Trichocomaceae*. O estudo indicou que as espécies do gênero *Penicillium* que anteriormente eram

classificadas no subgênero *Penicillium biverticillium* formam um clado monofilético com o gênero *Talaromyces*, e foram transferidas para esse táxon, enquanto as demais espécies pertencentes aos subgêneros *Aspergilloides*, *Furcatum*, *Penicillium* e *Eupenicillium* formaram um outro clado monofilético distinto.

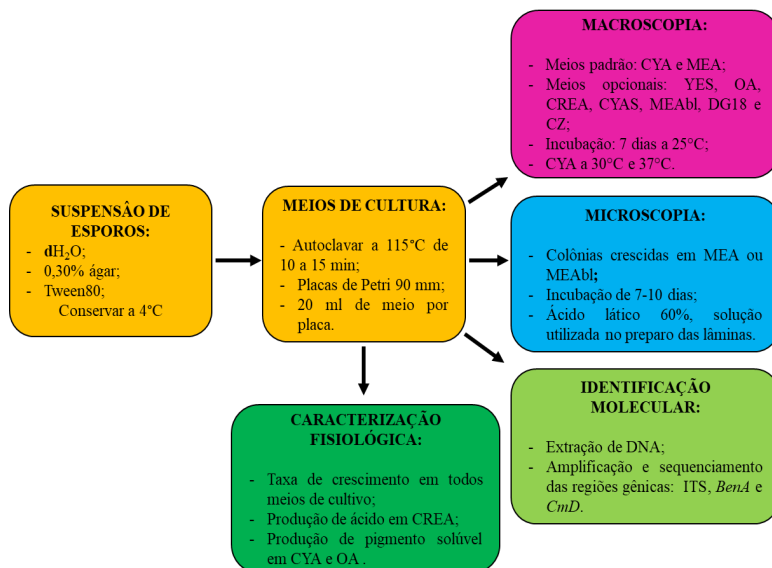
A descrição de espécies baseado apenas em características morfológicas pode resultar em classificações imprecisas. Por exemplo, espécies fúngicas que possuem conidióforos típicos em vforma de pincel necessariamente não pertencem ao gênero *Penicillium*. Do mesmo modo, espécies que não possuem o padrão de ramificação dos conidióforos característicos de *Penicillium* spp., podem pertencer a este gênero. É o que ocorre com a espécie *Penicillium paradoxus*. Descrito em 1955, *P. paradoxus* pertencia ao gênero *Aspergillus*, pois suas estruturas reprodutivas assexuadas são semelhantes às observadas em *Aspergillus clavatus*. Entretanto, a combinação de estudos fenotípicos mais aprofundados e análises filogenéticas indicam que de fato a espécie *P. paradoxus* pertence ao gênero *Penicillium* (VISAGIE *et al.*, 2014). Esse tipo de abordagem foi utilizado na última revisão do gênero *Penicillium*, realizada por Visagie e colaboradores (2014). Eles utilizaram dados oriundos de filogenias moleculares *multilocus* para (i) dividir o gênero *Penicillium* em dois subgêneros: *Aspergilloides* e *Penicillium*; e (ii) criar 25 seções: *Lanata-Divaricata*, *Sclerotiora*, *Fasciculata*, *Chrysogena*, *Exilicaulis*, *Gracilentia*, *Citrina*, *Canescentia*, *Aspergilloides*, *Brevicompecta*, *Paradoxa*, *Stolkia*, *Turbata*, *Penicillium*, *Ramigena*, *Roquefortorum*, *Charlesia*, *Cinnamopurpurea*, *Torulomyces*, *Digitata*, *Fracta*, *Charlesii*, *Thrysanophora*, *Ochrosalmonea* e *Ramosa*. Este novo esquema taxonômico do gênero *Penicillium* está de acordo com a nomenclatura baseada na ideia de “um fungo-um nome” implementada no *International Nomenclature Code* (ICN) para Algas, Fungos e Plantas, em 2013. Assim, atualmente, uma única denominação holomórfica, no caso *Penicillium*, é utilizada para nomear espécies que apresentam dois estágios alternados em seu ciclo de vida.



## Identificação polifásica

A identificação de espécies do gênero *Penicillium* era baseada na taxonomia clássica, onde considerava basicamente caracteres morfológicos. Uma limitação desse tipo de taxonomia é a plasticidade fenotípica, que é a capacidade de um organismo mudar sua morfologia de acordo as condições ambientais, o que pode dificultar as comparações entre as espécies. Por exemplo, a mesma espécie fúngica pode parecer uma espécie distinta quando cultivada em diferentes temperaturas, iluminação, nutrientes e umidade. Portanto, para minimizar esse problema em estudos taxonômicos, passou-se a utilizar a taxonomia polifásica, que integra dados morfológicos, fisiológicas e moleculares. Para realizar essa abordagem é necessário a utilização de técnicas estritamente padronizadas como está detalhado na Figura 4.

**Figura 4.** Métodos padronizados para identificação polifásica de espécies do gênero *Penicillium*.



Fonte: Cristiane Figueiredo e Harisson de Souza.

## Caracterização morfofisiológica

Na taxonomia polifásica, as principais características macromorfológicas e fisiológicas analisadas para identificar espécies de *Penicillium* spp. são coloração do verso e reverso, textura, formato das margens e diâmetro das colônias, produção e coloração de pigmento solúvel e exsudato e a produção de ácido. Para analisar essas características é recomendado seguir uma rigorosa padronização na preparação dos meios de cultura, na transferência do inóculo e no controle das condições de incubação. Por esse motivo, foi estabelecido utilizar 20 ml de meio de cultura em placa de Petri com dimensões de 90 mm x 15 mm. Volumes diferentes interferem na coloração e no tamanho das colônias. O inóculo fúngico deve ser uma suspensão de esporos em solução ágar água semi-sólido e a transferência dessa suspensão é realizada com o auxílio de uma micropipeta (0,5-1 µL) em 3 pontos equidistantes nas placas. Essas placas são incubadas em BOD a 25 °C, no escuro, por sete dias. Além disso, placas adicionais são incubadas a 30 e 37 °C para distinção de espécies (Figura 4). Durante o período de incubação, não é recomendado fechar as placas com parafilme, uma vez que a condição de aeração dentro da placa deve ser mantida.

Os meios de cultivo considerados meios padrão para observar as principais características macromorfológicas e fisiológicas das espécies desse gênero são ágar autolisado de Czapek levedura (CYA) e o ágar extrato de malte (MEA, Oxoid). Para observar uma variedade maior de características, são utilizados meios adicionais, tais como: ágar de Czapek (CZ), ágar de sacarose e extrato de levedura (YES), ágar de aveia (OA), ágar de creatina-sacarose (CREA), ágar de dicloran 18% de glicerol (DG18), ágar de Blakeslee MEA (MEAb1) e CYA com NaCl a 5% (CYAS) (Tabela 1). Isolados cultivados em meio OA podem fornecer valiosas informações para a taxonomia, uma vez que, o meio é utilizado para favorecer a produção e desenvolvimento de estruturas sexuadas. No meio de cultura CREA é possível obter informações fisiológicas, pois

as espécies que produzem ácidos orgânicos mudam a coloração do meio de cultura ao redor das colônias. Os meios de cultura DG18 e CYAS possuem baixa atividade de água, e são importantes para avaliar as taxas de crescimento das colônias. O meio cultivo YES é utilizado para descrição do perfil de extrólitos e coloração do reverso das colônias (VISAGIE *et al.*, 2014). É recomendado o uso de cartas de cores para descrever a coloração do verso e reverso das colônias e para o gênero *Penicillium* é comumente utilizada a carta de cores *Methuen Handbook of Color*.

Existe também uma padronização para realizar a caracterização micromorfológica, como descrito na figura 4, mas nesse caso, é utilizado apenas um meio de cultura. Os isolados fúngicos são transferidos para o meio de cultura MEA ou MEAbI a 25 °C por 7-10 dias. Após esse período de incubação, as lâminas são preparadas utilizando o ácido láctico 60%. Os caracteres microscópicos observados incluem: a forma do conidióforo, textura e tamanho das estipes, tamanho das métulas (quando presentes), tamanho e forma das fiálides e vesículas (quando presentes) e forma, textura e tamanho dos conídios.

Algumas espécies desse gênero produzem ascomas, que são estruturas reprodutivas sexuadas e podem ser utilizados na identificação, por ser um fator de distinção das espécies de *Penicillium* spp. Quando ocorre a formação de ascomas, os caracteres analisados são o tamanho dos cleistotécios, ascos e ascósporos, número de ascósporos por asco, ornamentação dos ascósporos e o tempo para a formação dos cleistotécios.

### **Caracterização molecular**

Atualmente, sequências nucleotídicas são utilizadas para inferir relações filogenéticas, bem como identificar espécies de fungos. Esse método se tornou uma importante ferramenta para diversos taxonomistas, nas mais diferentes áreas. A região genômica do

espaçador transcrito interno (ITS - *Internal Transcribed Spacer*) (Tabela 2) do DNA ribossomal (DNAr) é amplamente sequenciada e utilizada como o *barcode* oficial para inferir relações filogenéticas entre fungos. Contudo, esse *locus* é insuficiente na identificação e distinção de espécies proximamente relacionadas no gênero *Penicillium*, podendo ser utilizado na definição de seções dentro do gênero. Atualmente, outros marcadores são utilizados devido as limitações do ITS, como a  $\beta$ -tubulina (*BenA*), a segunda subunidade maior da RNA polimerase II (RPB2) e a calmodulina (*CaM*) (Tabela 2), que são capazes de distinguir espécies de *Penicillium* spp. intimamente relacionadas. Para identificações de rotina, os taxonomistas, consideram o gene *BenA* como o melhor *locus* para separar espécies dentro desse gênero. No entanto, para as descrições de novas espécies de *Penicillium* spp. é recomendado o sequenciamento de no mínimo três genes, ITS, *BenA* e *CaM*. Veja no capítulo sobre diversidade e taxonomia de *Aspergillus* mais detalhes sobre os procedimentos para realizar análises filogenéticas.

**Tabela 1.** Formulações dos meios de cultura utilizados para a caracterização morfológica de espécies do gênero *Penicillium*.

Solução estoque Czapek (100 ml)		Solução estoque de elementos traços (100 ml)	
NaNO <sub>3</sub>	30 g	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.5 g
KCl	5 g	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> OZ	0.1 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub>	5 g	dH <sub>2</sub> O	100 ml
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1 g	Conservar a 4-10°C	
dH <sub>2</sub> O	100 ml		
Conservar a 4-10°C		<b>Agar creatina-sacarose (CREA)</b>	
		Sacarose	30 g
<b>Ágar extrato de malte de Blakeslee (MEAbI)</b>		Creatina·1H <sub>2</sub> O	3 g
Extrato de malte	20 g	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.6 g
Peptona	1 g	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
Glicose	20 g	KCl	0.5 g
Solução estoque de elemento traço	1 ml	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01 g
Ágar	20 g	Solução estoque de elemento traço	1 ml

dH <sub>2</sub> O	1000 ml	Bromocresol púrpuro	0.05 g
Autoclavar a 121 °C por 15 min. pH 5.3		Ágar	20 g
		dH <sub>2</sub> O	1000 ml
<b>Ágar de Czapek (CZ)</b>		Autoclavar a 121 °C por 15 min. pH 8.0	
Concentrado Czapek	10 ml		
Sacarose	30 g	<b>Ágar autolisado de Czapek levedura com NaCl a 5% (CYAS)</b>	
Solução estoque de elementos traços	1 ml	Concentrado Czapek	10 ml
Ágar	20 g	Sacarose	30 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml	Extrato de levedura	5 g
Autoclavar a 121 °C por 15 min.		K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
		Solução estoque de elementos traços	1 ml
<b>Ágar autolisado de Czapek levedura (CYA)</b>		NaCl	50 g
Concentrado Czapek	10 ml	Ágar	20 g
Sacarose	30 g	dH <sub>2</sub> O	1000 ml
Extrato de levedura	5 g	Autoclavar a 121 °C por 15 min. pH 6.2	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g		
Solução estoque de elementos traços	1 ml	<b>Ágar de dicloro 18% de glicerol (DG18)</b>	
Ágar	20 g	Dicloro base de ágar de glicerol	31.5 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml	Glicerol	220 g
Autoclavar a 121 °C por 15 min. pH 6.2		Solução estoque de elementos traços	1 ml
		Cloranfenicol	0.05 g
<b>Ágar extrato de malte (MEA)</b>		Ágar	20 g
Extrato de malte (oxid)	50 g	dH <sub>2</sub> O	1000 ml
Solução estoque de elementos traços	1 ml	Autoclavar a 121 °C por 15 min. pH 5.6	
Ágar	20 g		
dH <sub>2</sub> O	1000 ml	<b>Ágar de sacarose e extrato de levedura (YES)</b>	
Autoclavar a 121 °C por 10 min. pH 5.4		Extrato de levedura	20 g
		Sacarose	150 g
<b>Ágar de aveia (OA)</b>		MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
Flocos de aveia	30 g	Solução estoque de elementos traços	1 ml
Solução estoque de elementos traços	1 ml	Ágar	20 g
Ágar	20 g	dH <sub>2</sub> O	885 ml

dH<sub>2</sub>O 1000 ml Autoclavar a 121 °C por 15 min. pH 6.5  
 Autoclavar a 121 °C por 15 min. pH 6.5

**Tabela 2.** Oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sequenciamento de espécies de *Penicillium* spp.

Locus	Nome do primer	Sentido	Sequência do primer (5'-3')	Tamanho (pb)
ITS	ITS1	<i>Forward</i>	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	600
	ITS4	<i>Reverso</i>	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	
<i>BenA</i>	Bt2a	<i>Forward</i>	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC	550
	Bt2b	<i>Reverso</i>	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	
<i>CaM</i>	CMD5	<i>Forward</i>	CCG AGT ACA AGG ARG CCT TC	580
	CMD6	<i>Reverso</i>	CCG ATR GAG GTC ATR ACG TGG	
RPB2	5F	<i>Forward</i>	GAY GAY MGW GAT CAY TTY GG	1000
	7CR	<i>Reverso</i>	CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT	

O uso da taxonomia polifásica na identificação e descrição de espécies fúngicas fornecem resultados mais consistentes. A crescente disponibilização de sequências gênicas nos bancos de dados, aliados a preservação das espécies em coleções de cultura contribuíram para assegurar a continuidade dos estudos taxonômicos das espécies de *Penicillium* spp. Além disso, esses esforços podem contribuir para a melhor utilização das funções biotecnológicas associadas às diversas espécies desse gênero. Já existem alguns trabalhos utilizando análise proteômica por MALDI-TOF MS para identificar espécies de *Penicillium* spp. Esse é um método adicional que pode contribuir para caracterização de espécies desse gênero de modo rápido e com um custo reativamente baixo.

## Referências

BENJAMIN, C. R. Ascocarps of *Aspergillus* and *Penicillium*. **Mycologia**, v. 47, p. 669-687, 1955.

FRISVAD, J. C. *Penicillium*/Penicillia in food production. In: **Encyclopedia Af Food Microbiology**. Elsevier, 2014. p. 14-18.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* A guide to identification of food and air-borne terverticillate Penicillia and their mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 49, p. 1-174.

GAUTAM, G. *et al.* A Cost effective strategy for production of bio-surfactant from locally isolated *Penicillium chrysogenum* SNP5 and Its Applications. **J Bioprocess Biotech**, v. 4, n. 177, p. 2, 2014.

GAYNES, R. The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 849-853, 2017.

GUEVARA-SUAREZ, M. *et al.* Identification and Antifungal Susceptibility of *Penicillium*-Like Fungi from Clinical Samples in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 2155, 2016.

HOUBRAKEN, J. *et al.* New sections in *Penicillium* containing novel species producing patulin, pyripyropens or other bioactive compounds. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 36, p. 299, 2016.

HOUBRAKEN, J. A. M. P.; SAMSON, R. A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. **Studies in mycology**, v. 70, p. 1-51, 2011.

KHOKHAR, I. *et al.* Biological control of *Aspergillus niger*, the cause of Black-rot disease of *Allium cepa* L.(onion), by *Penicillium* species. **Journal of Agrobiology (Czech Republic)**, 2012.

NICOLETTI, R.; TRINCONE, A. Bioactive Compounds Produced by Strains of *Penicillium* and *Talaromyces* of Marine Origin. **Marine Drugs**, v. 14, n. 2, 2016.

OXFORD, A. E.; RAISTRICK, H.; SIMONART, P. Studies in the biochemistry of micro-organisms: Griseofulvin, C (17) H (17) O (6) Cl, a metabolic product of *Penicillium griseo-fulvum* Dierckx. **The Biochemical journal**, v. 33, n. 2, p. 240-248, 1939.

ROPARS, J. *et al.* Blue cheese-making has shaped the population genetic structure of the mould *Penicillium roqueforti*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0171387, 2017.

SAMSON, R. A. *et al.* Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. **Studies in mycology**, v. 70, p. 159-183, 2011.

SANTOS, D. K. *et al.* Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 401, 2016.

SAY, R.; YILMAZ, N.; DENIZLI, A. Removal of heavy metal ions using the fungus *Penicillium canescens*. **Adsorption Science & Technology**, v. 21, n. 7, p. 643-650, 2003.

SCHNEIDER, W. D. H. *et al.* *Penicillium echinulatum* secretome analysis reveals the fungi potential for degradation of lignocellulosic biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 66, 2016.

SHALIGRAM, N. S. *et al.* Compactin production studies using *Penicillium brevicompactum* under solid-state fermentation conditions. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 159, n. 2, p. 505, 2009.

SREEVIDYA, M. *et al.* Biological control of *Botrytis cinerea* and plant growth promotion potential by *Penicillium citrinum* in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Biocontrol Science and Technology**, v. 25, n. 7, p. 739-755, 2015.



STEENWYK, J. L. *et al.* A robust phylogenomic time tree for biotechnologically and medically important fungi in the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. **MBio**, v. 10, n. 4, p. e00925-19, 2019.

VANISHREE, M.; THATHEYUS, A. J.; RAMYA, D. Biodegradation of petrol using the fungus *Penicillium* sp. **Science international**, v. 2, n. 1, p. 26-31, 2014.

VISAGIE, C. M. *et al.* Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in mycology**, v. 78, p. 343-371, 2014.

WANG, X. C. *et al.* Phylogeny and morphological analyses of *Penicillium* section *Sclerotiora* (Fungi) lead to the discovery of five new species. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017.

YADAV, A. N. *et al.* Biodiversity of the genus *Penicillium* in different habitats. In: **New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering**. Elsevier, 2018. p. 3-18.

YAO, G. *et al.* Production of a high-efficiency cellulase complex via -glucosidase engineering in *Penicillium oxalicum*. **Biotechnology for biofuels**, v. 9, n. 1, p. 78, 2016.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, p. 129-144, 2011.



## Sobre os autores

### **Adriana dos Santos Silva**

Graduação em Nutrição e Mestrado em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Atua na área de análise nutricional de população, desnutrição e desenvolvimento fisiológico, dietética e microbiologia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3596-5454>

### **Aline Simões da Rocha Bispo**

Graduação em Agronomia e Mestrado em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Doutorado em Biotecnologia pela Universidade Estadual de Feira de Santana (UESF). Bolsista do Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD) vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pela UFRB atuando na linha de segurança alimentar, principalmente com o uso de revestimentos comestíveis para a conservação de alimentos. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7672-2582>

### **Allana de Oliveira Santos**

Graduação em Farmácia pela Faculdade Maria Milza e Mestrado em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Tem experiência na área de Ciências de Alimentos, atuando nos temas Microbiologia e Higiene de Alimentos. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9542-1865>

### **Ana Cristina Fermino Soares**

Graduação e Mestrado em Microbiologia e Imunologia pela Universidade do Arizona, Estados Unidos. Doutorado em Produção Vegetal pela Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos, Rio de Janeiro. Professora Titular do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4014-1794>

### **Aristóteles Góes Neto**

Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal da Bahia (UFBA), Doutorado em Botânica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com Pós-Doutorado pela FIOCRUZ-MG. Foi Professor Pleno do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana (1995-2016) e atualmente é Professor Adjunto do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7692-6243>

### **Cristiane Nascimento Figueiredo**

Graduação em Bacharelado em Biologia e mestranda em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

### **Daniela Simões Velame**

Graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Foi estagiária na Agência de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB), e nas empresas Gujão Alimentos e Laticínio Maralat. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2884-8412>

### **Danuza das Virgens Lima**

Graduação em Medicina Veterinária e Mestranda em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Foi estagiária na Agência de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB), e nas empresas Gujão Alimentos e Laticínio Maralat. Tem experiência na área de Microbiologia, onde desenvolve análises da qualidade da água, avaliação microbiológica de produtos de origem animal (carne, ovos, leite e derivados), isolamento e identificação de microrganismos de interesse da saúde pública. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8305-3591>

### **Djalma Santana Neto**

Graduando do Bacharelado em Biologia pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

**Edileide Santana da Cruz**

Graduação em Nutrição e Mestranda em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Integrante do Grupo de Pesquisa Saúde Alimentos, Nutrição e Ambiente. Tem experiência na área de Ciências de Alimentos, atuando nos temas Microbiologia e Higiene de Alimentos. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9831-9321>

**Eduardo Chumbinho de Andrade**

Graduação em Agronomia, Mestrado e Doutorado em Agronomia (Fitopatologia) pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Tem experiência na área de biotecnologia e biologia molecular, com ênfase em Virologia Vegetal, atuando principalmente nos seguintes temas: caracterização e diversidade molecular de vírus voltado para o desenvolvimento de métodos diagnósticos e de controle. Atualmente coordena projetos com foco no desenvolvimento de estratégia genéticas de controle de insetos, especialmente RNA interferente. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5960-0957>

**Elaine Araújo de Carvalho**

Graduação em Nutrição pela Universidade Salvador (UNIFACS) e Mestrado em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8951-5064>

**Elina Isaque Delane**

Mestrado em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Docente da Universidade de Zambeze. Tem experiência na área de microbiologia.

**Elizabeth Amélia Alves Duarte**

Graduação em Bacharel e licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Especialista em nutrigenômica e nutrigenética na prática clínica, Mestrado em Melhoramento Genético de Plantas pela Universidade Federal Rural

de Pernambuco (UFRPE) e Doutorado em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). Foi bolsista de Pós-doutorado PNPd-CAPES vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Atualmente é docente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Faculdade Maria Milza. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8667-502X>

### **Fábio Santos de Oliveira**

Graduação em Química Aplicada pela Universidade do Estado da Bahia (UNEB), Mestrado e Doutorado em Química pela Universidade Federal da Bahia (UFBA). Tem experiência na área de Química Analítica, com ênfase em Instrumentação Analítica, atuando principalmente nos seguintes temas: análises químicas ambientais, análise química de alimentos e bebidas, desenvolvimento de métodos espectrofotométricos de análise química, automação analítica, instrumentação e quimiometria. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0737-2144>

### **Fernanda Freitas**

Graduação e Mestrado em Nutrição pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Doutorado em Ciência Animal Tropical pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Tem experiência na área de Ciência dos Alimentos, atuando principalmente nos seguintes temas: controle de qualidade de produtos e processos, Segurança Alimentar e Nutricional, microbiologia de alimentos e água, aquicultura e economia solidária. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0701-9025>

### **Harisson Guimarães de Souza**

Graduação em Bacharelado em Biologia e mestrando em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

### **Isabella de Matos Mendes da Silva**

Graduação em Medicina Veterinária e Mestrado em Nutrição pela Universidade Federal da Bahia (UFBA). Doutorado em Ciência

Veterinária pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Tem experiência na área de Ciências Agrárias, atuando principalmente nos seguintes temas: Microbiologia e Higiene de Alimentos. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9700-0354>

### **Jackeline Pereira Andrade**

Graduação em Bacharelado em Biologia e Licenciatura em Biologia, e Mestrado em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana. Atualmente é docente da Faculdades Integradas de Sergipe.

### **Jessica Ferreira Mafra**

Graduação em Biologia e Mestrado em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Tem experiência na área de microbiologia, atuando principalmente nos seguintes temas: microbiologia de alimentos, microbiologia ambiental, biodegradação e resistência antimicrobiana. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8833-7158>

### **Jéssica Silva Santos**

Graduação em Engenharia Agrônoma pela Universidade Federal de Sergipe (UFS). Discente do curso de mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8789-0146>

### **Jonatha dos Santos Silva**

Graduação em Biologia. Tem experiência nas áreas de virologia, biologia molecular e entomologia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7196-1533>

### **Jorge Teodoro de Souza**

Graduação em Engenharia Agrônoma e Mestrado em Fitopatologia pela Universidade Federal de Lavras. Doutorado em Fitopatologia pela Wageningen University. Docente da Universidade Federal de Lavras.

### **Layanna Rebouças de Santana Cerqueira**

Graduação em Biologia e Mestrado em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1001-3046>

### **Leonardo de Oliveira Barbosa**

Graduação em Licenciatura em Ciências Agrárias pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB), com Mestrado e Doutorado em Ciências Agrárias pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3388-6130>

### **Liliane Andrade Sande da Silva**

Graduação em Biomedicina pela Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e Mestrado em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB).

### **Lucas Souza Sales**

Graduação em Bacharelado em Biologia e mestrando em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

### **Ludmilla Santana Soares e Barros**

Graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Goiás UFG. Especialista em Saúde Ambiental pela Faculdade de Saúde Pública Universidade de São Paulo (FSP-USP). Mestrado e Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) e Pós-Doutora em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca também pela CAUNESP. Tem experiência na área de saúde única. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4397-1881>

### **Márcia Luciana Cazetta**

Graduação em Ciências Biológicas e Mestrado em Ciências de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina (UEL). Doutorado em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP). Tem experiência na área de Microbiologia, com ênfase em Microbiologia Aplicada, atuando principalmente com bioprospecção



microbiana e produção de produtos de interesse biotecnológico, industrial e alimentício por meio de processos fermentativos.

### **Mariza Alves Ferreira**

Graduação em Engenharia Agrônômica, Mestrado em Microbiologia Agrícola e Doutorado em Ciências Agrárias pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Bolsista do Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD) vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela UFRB atuando nas linhas de pesquisa em segurança alimentar, microbiologia ambiental e resistência antimicrobiana. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9238-9161>

### **Milena da Cruz Costa**

Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado da Bahia (UNEB) e Mestrado em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Atua nas áreas de Biologia, Ciências e Microbiologia de alimentos, Segurança alimentar, Resistência antimicrobiana, Controle higiênico-sanitário, Revestimento comestível para produtos alimentícios e pesquisas com antimicrobiano natural. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8347-724X>

### **Norma Suely Evangelista-Barreto**

Graduação em Engenharia de Pesca, Mestrado em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal do Ceará (UFC) e Doutorado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Docente Associado II na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), atuando nas linhas de pesquisa Tecnologia do Pescado e Microbiologia de Alimentos. Possui experiência nos seguintes temas: microbiologia de alimentos com ênfase em segurança alimentar, microbiologia ambiental, resistência antimicrobiana, desenvolvimento de produtos a base de pescado e revestimento alimentar. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5960-0957>

### **Phellippe Arthur Santos Marbach**

Graduação em Licenciatura em Biologia pela Universidade Federal do Espírito Santo. Mestrado em Genética pela Universidade Federal

de Viçosa e Doutorado em Genética pela USP/ESALQ. Docente da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

### **Renata Alves de Sousa**

Graduação em licenciatura em Ciências Biológicas pelo Instituto Federal de Rondônia (IFRO), com Mestrado em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6677-8136>

### **Tiago Araújo Pinho Alcântara**

Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Católica de Salvador (UCSAL) e Mestrado em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Atualmente é Professor Efetivo III na Secretaria de Educação do Estado da Bahia, lecionando Ciências e Biologia para níveis Fundamental II e Médio.

### **Valéria Macedo Almeida Camilo**

Graduação em Nutrição pela Universidade do Estado da Bahia (UNEB), Mestrado em Alimentos, Nutrição e Saúde pela Universidade Federal da Bahia (UFBA) e Doutorado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente pela Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). Tem experiência na área de Nutrição e na área Interdisciplinar, com ênfase em Técnica Dietética e Segurança Alimentar e Nutricional (SAN), atuando principalmente nos seguintes temas: processamento de alimentos, alimentação saudável, análise da interface entre meio ambiente e SAN. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0180-2649>

### **Valter Cruz-Magalhães**

Graduação em Engenharia Agrônoma e Mestrado em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Doutorado em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Estadual de Santa Cruz.



Esta obra apresenta conteúdo científico atualizado, na área de atuação dos docentes e discentes do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola (PPGMA) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia em parceria com a Embrapa Mandioca e Fruticultura. Os capítulos abordam problemas e temas de interesse da região do Recôncavo e de todo o estado da Bahia, do país e também de abrangência internacional. Em linhas gerais, nossas pesquisas envolvem o acesso à biodiversidade de grupos microbianos de interesse na indústria, agricultura e pesca, com o objetivo de explorar o seu potencial biotecnológico na busca por inovações tecnológicas e soluções para problemas relacionados a essas áreas de atuação. Esperamos que a leitura desse livro inspire jovens futuros cientistas a ingressarem na área de microbiologia agrícola.

ISBN: 978-65-87743-35-6



Editora UFRB