

Bioprospecção de fungos isolados do intestino de besouros amazônicos da ordem Coleoptera com atividade anti-candida sp.

Bioprospecting of fungi isolated from the gut of Amazonian of the order Coleoptera with anti-candida sp activity.

Bioprospección de hongos aislados del intestino de escarabajos amazónicos del orden Coleoptera con actividad anti-candida sp.

Recebido: 19/12/2022 | Revisado: 09/01/2023 | Aceitado: 11/01/2023 | Publicado: 13/01/2023

João Lucas da Silva Rufino

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8547-5280>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: jjoao_lucas2018@outlook.com

Thais Karoline de Sousa Rodrigues

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7982-7371>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: thaiskarolyne2522@gmail.com

Maxwel Adriano Abegg

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0328-1122>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: maxabegg@ufam.edu.br

Resumo

Com uma atividade exploratória desenfreada dos recursos naturais, muito da biodiversidade mundial vem diminuindo com o passar dos anos. Com toda a riqueza Amazônica dá-se a vantagem ao Brasil pela busca pelo desenvolvimento nacional, através da exploração adequada destes recursos, minimizando danos ao ambiente. Neste sentido a Bioprospecção surge como uma ferramenta do Desenvolvimento Sustentável, que pode ser entendida como a busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos, que tenham potencial econômico e eventualmente, levam ao desenvolvimento de um produto. Muitos fungos vivem em associações simbióticas ou comensais em intestinos de Besouros e estes fungos possuem uma capacidade ainda desconhecida de produção de substâncias ainda desconhecidas. Tendo em vista estas relações, esta pesquisa objetiva realizar uma Bioprospecção de fungos filamentosos extraídos do intestino de besouros da Amazônia. Os resultados são promissores ao destacar a atividade antifúngica contra cepas de espécies de *Cândida sp* com as frações de extratos estudadas proveniente de espécie de *Fusarium Incarnatum-equisetti*.

Palavras-chave: Microbiologia; Fungos; Bioprospecção; Amazônia.

Abstract

With an unbridled exploitation of natural resources, much of the world's biodiversity has been decreasing over the years. With all the Amazonian wealth, Brazil is given the advantage in the search for national development, through the proper exploitation of these resources, minimizing damage to the environment. In this sense, Bioprospection emerges as a tool for Sustainable Development, which can be understood as the systematic search for organisms, genes, enzymes, compounds, processes and parts from living beings, which have economic potential and eventually lead to the development of a product. Many fungi live in symbiotic or commensal associations in beetle intestines and these fungi have an as yet unknown ability to produce as yet unknown substances. In view of these relationships, this research aims to carry out a Bioprospection of filamentous fungi extracted from the gut of Amazon beetles. The results are promising when highlighting the antifungal activity against strains of *Candida sp* species whit the studied extract fractions from *Fusarium Incarnatum – equiseti* species.

Keywords: Microbiological; Fungi; Bioprospection; Amazon.

Resumen

Con una explotación desenfrenada de los recursos naturales, gran parte de la biodiversidad mundial ha ido disminuyendo a lo largo de los años. Con toda la riqueza amazónica, Brasil tiene ventaja en la búsqueda del desarrollo nacional, a través de la adecuada explotación de esos recursos, minimizando los daños al medio ambiente. En este sentido, la Bioprospección surge como una herramienta para el Desarrollo Sostenible, el cual puede entenderse como la búsqueda sistemática de organismos, genes, enzimas, compuestos, procesos y partes de los seres vivos, que tengan potencial económico y que eventualmente conduzcan al desarrollo de un producto. . . Muchos hongos viven en

asociaciones simbióticas o comensales en los intestinos de los escarabajos y estos hongos tienen una capacidad aún desconocida para producir sustancias aún desconocidas. En vista de estas relaciones, esta investigación tiene como objetivo realizar una Bioprospección de hongos filamentosos extraídos del intestino de escarabajos amazónicos. Los resultados son prometedores al destacar la actividad antifúngica frente a cepas de la especie *Candida* sp con las fracciones de extracto estudiadas de *Fusarium Incarnatum* – especie *equisetti*.

Palabras clave: Microbiología; Hongos; Bioprospección; Amazonía.

1. Introdução

A incidência de doenças fúngicas se alastra de forma alarmante em todas as partes do mundo, sejam elas infecções superficiais, ou, de forma mais preocupante, infecções sistêmicas invasivas. A maioria das pessoas apresentará pelo menos uma infecção fúngica superficial durante a vida e, milhões de indivíduos em todo o mundo irão contrair a forma invasiva. Infelizmente, na contramão desses dados, os impactos dessas infecções na saúde humana ainda não são amplamente reconhecidos e esse patógeno é muitas vezes negligenciado quando comparado a outros patógenos (Fuentefria et al., 2017; Brown et al., 2012).

Os patógenos mais frequentemente observados nas infecções fúngicas invasivas pertencem aos quatro gêneros: *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* e *Pneumocystis*, sendo que a candidemia está associada à maior mortalidade bruta entre todas as infecções sanguíneas. *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente isolada de espécimes clínicos, entretanto outras espécies de *Candida* (*Candida* não *albicans* - CNA) são cada vez mais encontradas. Espécies de CNA, como *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, estão atraindo grande preocupação, uma vez que são altamente virulentas e estão associadas à falha do tratamento devido à susceptibilidade reduzida aos agentes antifúngicos (Miceli et al., 2011; Enoch et al., 2006; Mavor et al., 2005; Garber, 2001;).

Um fator importante, que caminha na contramão do combate a infecções fúngicas invasivas, dar-se-á ora pois os medicamentos atuais também sofrem de restrições na via de administração, espectro de atividade e biodisponibilidade em alguns tecidos. Outras limitações incluem toxicidade, interações medicamentosas indesejáveis e o surgimento de resistência aos fármacos (Fuentefria et al., 2017; Denning e Hope, 2010).

Muitas respostas a estes questionamentos podem possivelmente serem encontrados na biodiversidade da região amazônica. Toda a diversidade biológica, variação genética entre membros diferentes dentro da mesma espécie, diferença entre ecossistemas que abrigam diferentes espécies, compreende a biodiversidade. Uma das maneiras de extrair valor econômico da biodiversidade é a bioprospeção, termo que academicamente pode ser entendido como a busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos, que tenham potencial econômico e eventualmente, levam ao desenvolvimento de um produto (Saccaro Júnior, 2011).

A biodiversidade é um repositório químico, biológico e genético que pode fornecer a base para aplicações científicas e tecnológicas em diversas áreas do conhecimento. Estima-se que 40% da atividade econômica mundial seja composta por produtos relacionados à biodiversidade (Pimentel, 2015). O ambiente Amazônico comporta a maior biodiversidade terrestre do planeta, algo em torno de 10 a 15%. Diante deste contexto, a Amazônia comporta um arsenal inexplorado de plantas, animais e microrganismos, o que revela a necessidade de estudos voltados para a identificação e exploração de novas espécies.

Com toda a riqueza Amazônica dá-se a vantagem ao Brasil pela busca pelo desenvolvimento nacional; através da exploração correta destes recursos naturais, minimizando danos ao ambiente e, fazendo com que haja o retorno financeiro em um período adequado. Os recursos genéticos utilizados na bioprospeção formam o patrimônio genético nacional. Dentre estes produtos biotecnológicos resultantes da bioprospeção cita-se o desenvolvimento de novos fármacos, que além de atrair ganhos financeiros acabam por tratar da saúde:

embora existam, nos dias atuais, diversas estratégias e metodologias disponíveis para que se possa sintetizar e descobrir novos fármacos, a química de produtos biológicos é privilegiada porque, ao longo da evolução, moléculas foram construídas, por meio da seleção natural para serem capazes de induzir respostas específicas (Junior, 2011).

A partir do advento da Tecnologia do DNA recombinante, ou Engenharia Genética, o termo biotecnologia passou a ser muito utilizado (Filho, et al., 2014), assim como, metodologias para descobrir metabólitos, moléculas e genes foram desenvolvidas. Relacionando com a Floresta Amazônica, berço de mega diversidade, por meio da bioprospecção em muitas espécies de seres vivos, extratos e moléculas serão frutos de descobertas que servirão para desenvolvimento de produtos biotecnológicos.

A Biotecnologia está aliada à bioprospecção, podendo, através da tecnologia, gerar produtos biotecnológicos e ser autossustentável. A Mega Biodiversidade avaliza a certeza da predestinação do Estado do Amazonas em promover seu desenvolvimento econômico por meio da biotecnologia (Matias, Pimentel, 2005). Os recursos naturais devem ser aproveitados, desde que se tenha atenção ao cuidado do bem natural, perpetuando para futuras gerações. Desta forma, com o uso sustentável e consciente destes recursos, os produtos terão maior agregação de valor no mercado mundial.

trata-se de uma contrapartida ao atual modelo de suporte da economia do Estado e, ao contrário dele, leva em conta as peculiaridades potenciais do Estado, promovendo interiorização do desenvolvimento socioeconômico favorecidos por atividades econômicas que agreguem valor ao longo de toda cadeia reprodutiva (Matias, Pimentel, 2005).

Com a tendência mundial da abordagem sobre o tema “sustentabilidade”, constata-se a necessidade de inovações tecnológicas e biotecnológicas, incentivando o uso de microrganismos benéficos para as atividades humanas, assim como seus produtos metabólicos e interações com plantas (Priyanka, 2020; Fang-Zhou, 2020; Posada, 2016;).

A biotecnologia tem levado a uma manipulação, cada vez mais bem sucedida, de vias bioquímicas de interesse biotecnológico. Muitos microrganismos possuem capacidades produtivas, através dessas vias endógenas, bem interessantes de serem exploradas:

os fungos filamentosos têm a capacidade de produzir uma bateria de produtos naturais de função frequentemente desconhecida, sintetizados por vias metabólicas complexas. Infelizmente, a maioria dessas vias parece silenciosa, muitas em organismos intratáveis e seus produtos, consequentemente, não identificados. O desafio básico é a dificuldade de expressar por uma via de biossíntese para um produto natural complexo em um hospedeiro eucariótico heterólogo (Shiela, 2014).

Fungos filamentosos também possuem a capacidade de viver em simbiose ou parasitando outros organismos. Desta forma, ele está inserido em um *habitat* diferenciado, sob condições diferenciadas, como por exemplo, em besouros. Alguns besouros pertencem à ordem Coleoptera (Insecta, Artropoda, Metazoa), sendo uma das mais diversas dentro da classe Insecta; e é composta por pelo menos 400.000 (quatrocentas mil) espécies descritas (Lelej & Storozhenko, 2010).

Figura 1 - Espécime Coleoptera.



Fonte: Autores.

Os besouros passalídeos (Passalidae, Coleoptera) alimentam-se principalmente de madeira em decomposição e passam a maior parte de suas vidas dentro de troncos de árvores em decomposição (Boucher, 2005; Reyes-Castillo, 1970). A família de besouros é composta por aproximadamente 960 (novecentas e sessenta) espécies, e na mais recente reclassificação taxonômica da família, além de sua distribuição, características morfológicas externas e biologia, a macromorfologia do intestino é outro caráter proposto para distinguir as cinco subfamílias em *Passalidae* (Fonseca et al, 2011).

Segundo Reis (2017), os besouros da ambrosia (Coleoptera: Curculionidae: subfamílias Platypodinae e Scolytinae), também conhecidos como brocas, vivem em simbiose com diferentes microrganismos (fungos filamentosos, leveduras, bactérias e protozoários) que habitam o sistema digestivo dos mesmos.

Outros autores como Montefusco (2020) e Milano (2012) atestam em suas pesquisas a presença de espécies fúngicas com potencial enzimático que estão associados ao intestino de larvas e pragas próprias da cana-de-açúcar. Uma avaliação da flora do trato digestório de besouros pode ser uma fonte grande de descobrimento de novos compostos e espécies fúngicas.

Este trabalho tem por objetivo realizar a Bioprospecção de fungos extraídos do intestino de besouros da Amazônia com potencial anti-candida sp.

2. Metodologia

Para esta pesquisa foram selecionados os fungos filamentosos extraídos do intestino de besouro (Insecta: *Coleoptera*).

2.1 Coleta dos besouros e extração dos microrganismos

A coleta foi realizada em dois pontos na Floresta Amazônica: no Campus II da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), no Km 260 da rodovia AM-010 (S03°05.654' W058°27.464') e no ramal da comunidade Sol Nascente (S03°01.045' W058°28.830'), ambos no município de Itacoatiara – AM. Após os besouros serem mantidos em jejum, por 3 dias, para ajudar na eliminação de alguns microrganismos contaminantes, passaram por um processo de desinfecção superficial para então proceder-se a extração do intestino. Os intestinos foram removidos assepticamente com auxílio de estereomicroscópio em cabine de segurança biológica e posteriormente macerados e suspensos em microtubos estéreis contendo 100 µL solução salina 0,9%. Esse macerado foi espalhado sobre ágar YM acidificado. As colônias individuais foram retiradas e isoladas por pelo menos 2 repiques sucessivos. Esta etapa é descrita por Souza, et al., 2017.

2.2 Identificação morfológica, cultivo e extração inicial

Os fungos foram identificados a nível de gênero por meio de análises macro e microscópicas das colônias crescidas em meio Ágar Batata Dextrose (BDA). Para análise macroscópica observou-se aspectos de borda e contorno, topografia do Anverso e Verso.

Para análises microscópicas foram preparadas lâminas contendo corante lactofenol azul algodão e analisadas à microscopia com objetiva de 100x. Esta análise identificou características estruturais, tais como: a presença de hifas septadas ou cenocíticas, coloração das hifas, presença dos corpos de frutificação, bem como presença de esporos.

O cultivo dos fungos ocorreu em 2 tipos de meios: Um meio sólido, produzidos em substrato arroz e aveia (10g de arroz ou aveia ressuspendidos em água destilada); e em meio líquido utilizando Czapeck Dox, produzido de acordo com as normas do fabricante (Kasvi). Após cultivo foram extraídos com Metanol P.A em ambos os tipos de culturas, sob agitação de 100 rpm durante 24 horas a temperatura ambiente. Os extratos foram concentrados sob rotaevaporação e particionados em ordem crescente de polaridade. Esta etapa é descrita por Negreiros, et al., 2020.

2.3 Microrganismos utilizados para os testes antimicrobianos

Foram utilizados como microrganismos testes as cepas: *C. albicans* ATCC 28.367, *C. albicans* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22014, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* sp. ATCC 2890, *Staphylococcus aureus* ATCC 9040, pertencentes à coleção microbiana do Laboratório de Diversidade e Motilidade Microbiana (LDM) do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia – ICET da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

2.4 Teste antimicrobiano com frações de extratos bioprospectados

Foram selecionadas 66 (sessenta e seis) frações dos extratos de fungos filamentosos que ainda não haviam sido analisados, sendo submetidas ao teste antimicrobiano por meio da técnica em *Spot* (Demir; Basbülbül, 2017). Foram produzidas inicialmente suspensões padronizadas (0,02 para *C. albicans* ATCC 2001, *C. albicans* ATCC 28367 e *C. parapsilosis* ATCC 22014) com absorbância ajustada em Espectrofotômetro (Biospectro, SP-22) (OD = 600 nm). As suspensões dos microrganismos-teste foram adicionadas sobre meio de cultura Água Batata Dextrose (BDA) solidificado, onde 10 µL das frações dos extratos foram pipetados em três pontos equidistantes. O teste foi realizado em triplicata e a água estéril foi utilizada como controle negativo. Os resultados foram interpretados com base na formação de halos de inibição (analisados em milímetros após 24 h. de incubação a 37°C).

Para halos de até 12mm, agrupou-se as frações candidatas ao estudo com um índice de atividade antifúngica “leve”. Para halos entre 12mm e 20mm, agrupou-se as frações candidatas ao estudo com um índice de atividade antifúngica “moderada”. Para halos acima de 20mm, foram agrupadas as frações candidatas ao estudo com um índice de atividade antifúngica “intensa”. Desta forma, poder-se-ia filtrar candidatos com atividades antifúngicas mais notáveis, desde que agrupados em categorias de maior atividade antifúngica.

2.5 Cultivo em Escala de bancada

Das 69 (sessenta e nove) frações de extratos testadas, duas foram escolhidas para prosseguir ao cultivo. Seguiu-se para o cultivo da espécie fúngica da qual o extrato havia sido produzido em escala de bancada. Para este cultivo utilizou-se o Czapeck Dox líquido, produzido de acordo com as normas do fabricante (Kasvi).

Inicialmente os fungos foram cultivados em Batata Dextrose Agar (BDA) durante 5 (cinco) dias a 28°C para o crescimento das colônias. Para o cultivo em caldo, dez *plugs* de 7mm de diâmetro foram recortados da cultura fúngica e

adicionados a 250mL do caldo Czapeck. As culturas foram fermentadas a 28°C, sob agitação orbital a 100rpm durante 21 (vinte e um) dias.

2.6 Extração da Cultura de Fungos

Após o cultivo em escala piloto foram adicionados 250mL de Acetato de Etila P.A (agente extrator) nas culturas líquidas. Em seguida o material fermentado foi extraído sob agitação orbital a 100rpm, durante 24 (vinte e quatro) horas, a temperatura ambiente. Os extratos brutos foram concentrados em evaporador rotativo, seus rendimentos calculados e testados para atividade antimicrobiana pela técnica de *Spot* (Demir; Basbülbül, 2017).

2.7 Purificação Parcial dos Metabólitos Secundários

Os extratos brutos produzidos durante a escala de bancada foram particionados líquido-líquido, por três vezes, com cada solvente empregado. Para isto, foram utilizados três solventes em ordem crescente de polaridade: Hexano (C₆H₁₄), Clorofórmio (CHCl₃) e Acetato de Etila (C₄H₈O₂) na proporção 1:1 (v/v) (Etame, et al., 2019). Após particionamento, quatro frações foram geradas, sendo denominadas: Fração Hexano (FH), Fração Clorofórmio (FC), Fração Acetato de Etila (FA) e a Fração Remanescente (FR).

As frações que foram obtidas foram levadas à concentração, em evaporador rotativo, e suas massas foram determinadas por pesagem em balança analítica. O rendimento das frações foi calculado em gramas e as frações foram testadas para atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar (Silveira, et al., 2009).

2.8 Identificação genética das espécies selecionadas para prosseguimento no estudo através da técnica de Sequenciamento e Análise de Homologia por BLAST

As amostras fúngicas selecionadas para esta etapa do estudo foram submetidas a um cultivo para crescimento da colônia, posterior extração do material genético e procedido ao sequenciamento genético com primer ITS2, através da técnica de BLAST (Ye J. et al., 2006).

3. Resultados e Discussão

Selecionaram-se 66 (sessenta e seis) frações de fermentações anteriores, já realizadas por Negreiros (2020), para prosseguir no teste antimicrobiano de diferentes espécies. Os resultados foram expressos em positividade (quando há inibição de crescimento) e negatividade (quando não há inibição de crescimento); acompanhados da intensidade dos halos: leve (halo ≤12mm), moderado (halo entre 12mm e 20mm) e intenso (halo ≥20mm).

Os resultados estão dispostos no Quadro 1 a seguir.

Quadro 1 - Resultados do teste antimicrobiano das frações de fungos filamentosos.

Código das Frações	<i>Candida albicans</i> ATCC 2001	<i>Candida albicans</i> ATCC 28367	<i>Candida parapsilosis</i>
TPP1-1 14d	-	-	-
5.8 14d	-	-	-
IS-7 14d	-	-	-
IS-13 14d	Positivo - leve	-	-
HSUC-6 14d	Positivo - leve	-	-
TPP1-2 14d	-	-	-
7,4 21d	Positivo - moderado	-	Positivo - leve

8,4 21d	-	-	-
IS-7 21d	-	-	-
TPP1-2 21d	-	-	-
TPP1-1 21d	-	-	-
5,8 21d	-	-	-
8,2 21d	Positivo - intenso	Positivo - intenso	Positivo - intenso
IS-6 21d	Positivo - moderado	Positivo - moderado	Positivo - moderado
IS7 – Aveia	-	-	-
IS 13 21d	-	-	-
HSUC-6 21d	-	-	-
2,5 Arroz	Positivo - moderado	-	-
IS-6 Aveia	-	-	-
HSUC-6 Aveia	-	-	Positivo - moderado
IS-6 Arroz	-	-	-
IS-7 Arroz	-	-	-
8,4 Arroz	-	-	-
8,5 Arroz	-	-	-
7,4 Arroz	Positivo - moderado	Positivo - moderado	Positivo - moderado
HSUC-6 Arroz	-	-	-
7,3 Aveia	-	-	-
IS 13 Arroz	-	-	-
IS 13 Aveia	-	-	-
2,5 Aveia	-	-	-
7,4 Aveia	-	-	-
7,3 Arroz	-	-	Positivo - moderado
TPP1-1 Aveia	-	-	Positivo - moderado
8,2 Aveia	-	-	-
8,2 Arroz	-	-	-
8,5 Aveia	Positivo - moderado	-	Positivo - moderado
8,4 Aveia	-	-	Positivo - moderado
BP 13.3	-	-	-
BU 11.3	-	-	-
No name	-	-	-
B 4.1	-	-	-
HSUC Bu 26.1	-	-	-
HSUC Bu 34.2	-	-	-
HSUC 18.2	-	-	-
BU 10.1	-	-	-
BU 27.3	-	-	-
HSUC B1.2	-	Positivo - moderado	-
BU 33.3	-	-	-
BU 9.2	-	-	-
BU 10.2	-	-	-
BA 35.1.1	Positivo - intenso	Positivo - moderado	Positivo - intenso

BU 25.1	-	-	-
BA 14.1	-	-	-
B4.3	-	-	-
BU 24.2	-	-	-
B1.3	-	-	-
HSUC BA 22.3	-	-	-
BU 12.1	Positivo - leve	Positivo – leve	Positivo - leve
BU 8.3	-	-	-
BU 5.3	-	-	-
HSUC 23.3	-	-	-
B 20.2	-	-	-
BU 26.3	-	-	-
BA 35.12	-	-	-
B3.1	-	-	-

Legenda: Resultados positivos: Positivos; Resultados negativos: - ; Intensidade da atividade (halo ≤ 12 mm): leve; Intensidade da atividade (halo entre 12mm-20mm): moderado; Intensidade da atividade (halo ≥ 20 mm): intenso. Fonte: Autores.

Para as amostras 8,1 21d e BA35.1.1 os halos de inibição para *Candida albicans* ATCC 2001, *Candida albicans* ATCC 28367 e *Candida parapsilosis*, foram, respectivamente: 8,2 21d (24mm, 24mm, 23mm), BA35.1.1 (22mm, 14mm, 20mm).

O método de ensaio antimicrobiano, empregado para análise preliminar das amostras de fermentação, é um teste que emite resultado de forma qualitativa, onde se interpretou os resultados neste estudo pelo grau de intensidade da atividade antifúngica. É importante destacar que as atividades antifúngicas advêm da presença de algum composto que esteja presente naquela fração utilizada com propriedades fungicidas e fungistáticos, ou uma dessas individualmente. A atividade de um composto é identificada durante a dinâmica com o microrganismo que a induz a seguir um mecanismo específico de inibição.

O tamanho do halo também é visto como a intensidade de atividade, onde a capacidade de se difundir no ágar, inibir crescimento e multiplicação de microrganismos, é medida conforme o tamanho do halo medidos em milímetros. Lima *et al* (2006) também chegou a mesma conclusão ao analisar a atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida sp*; em que relatou os resultados em milímetros de inibição.

Devido à baixa quantidade de amostra, fez-se necessário efetuar outra fermentação, seguindo as mesmas recomendações seguidas por Negreiros 2020; que produziu inicialmente o extrato e dividiu as frações que foram testadas neste trabalho.

Dentre os resultados do teste antimicrobiano, realizado com as 66 (sessenta e seis) amostras, foram selecionados os melhores resultados, com as amostras 8,2 21d e BA35.1.1 destacando-se. Estas duas amostras prosseguiram nos estudos onde obteve-se, após 21 dias, o fermentado líquido bruto.

A cultura fúngica ficou sob agitação para crescimento por 21 dias, a 100rpm. Estas condições propiciaram uma condição de **Estresse Biológico**. Conforme Santos (2018), o Estresse Biológico pode ser definido como um fator ou fatores que criam um desafio fisiológico para um microrganismo, ameaçando as suas funções ou a sua sobrevivência. Fatores como oscilação de temperatura, falta de nutrientes, pH, presença de outros organismos competindo por nutrientes e espaço também tendem a influenciar no metabolismo fúngico, afetando na produção de uma ou várias substâncias e enzimas.

O estresse biológico é um fator de extrema importância, pois com sua utilização na produção de biocompostos, os microrganismos podem ser pressionados a produzirem metabólitos que supram sua necessidade para superar tais adversidades.

Neste momento pôde-se observar a existência de produção de compostos de interesse biotecnológico. As condições para esta fermentação foram similares às iniciais já realizadas e todo o processo seguiu o mesmo protocolo utilizado anteriormente. Desta forma, ao final de 21 (vinte e um) dias, obteve-se o extrato bruto, em Erlenmeyer do cultivo, de ambas as espécies selecionadas.

Para a extração do material produzido pela cultura fúngica é importante considerar qual o melhor composto químico para se utilizar; aquele que conseguirá retirar da cultura fúngica compostos de interesse. A utilização de Acetato de Etila foi ponderada devido suas características físico-químicas. O triângulo de seletividade proposto por Snyder e descrito no trabalho de Afonso 2009, agrupa agentes extratores em três grupos: valores de alfa (acidicidade); beta (basicidade); e pi (dipolaridade); na qual as características do solvente Acetato de Etila está com valores próximos a PI, trazendo seu amplo espectro, extraindo da cultura fúngicas compostos polares e apolares; evitando algumas estruturas complexas como de carboidratos e açúcares, que acabam deixando as amostras impuras.

Desta forma ao se selecionar o solvente extrator, pensou-se na capacidade de arrastar compostos da cultura para o solvente, para que fosse possível a *posteriori* a purificação dessa extração. A utilização de outro solvente, como metanol, por exemplo, arrastaria todos os carboidratos presentes, inclusive os presentes no meio de cultura. Não é interessante a análise de açúcares para este trabalho, pela razão de sua presença dificultar a purificação de frações de extratos.

Com a capacidade de amplo espectro que tem o Acetato de Etila, pôde-se observar que, provavelmente, uma grande variedade de compostos estará em suspensão no solvente extrator. Após a extração, esse solvente com extrato passa pelo processo de concentração e secagem em rota evaporador. O extrato foi seco a temperatura ambiente, pois as altas temperaturas podem desnaturar compostos microbiológicos presentes e o Acetato de Etila é bem volátil, permitindo uma secagem ainda mais rápida e eficiente do que outros solventes, devido suas características físico-químicas.

O extrato seco foi resuspendido em água destilada e então particionado 3 (três) vezes, em ordem crescente de polaridade, para realização da pré-purificação que resultaria no teste das frações contra os microrganismos, já testados anteriormente, para verificar em qual fração se concentrava o grupamento de substâncias responsáveis pela atividade antimicrobiana. A partição líquido-líquido permite fazer um arraste profundo no extrato quando dois líquidos se cruzam e, através de afinidades relacionadas a características de polaridade e apolaridade, terminam por levar consigo todas as substâncias que possuem afinidade química.

A extração líquido-líquido é caracterizada pela transferência de solutos entre duas fases que formam um sistema heterogêneo, tendo como principais objetivos: (i) melhorar a seletividade de uma técnica de detecção, separando o elemento de interesse dos constituintes majoritários de uma matriz ou somente separar os interferentes mais significativos e (ii) elevar a sensibilidade, concentrando o analito ou isolando-o numa fase, onde é observado aumento de sinal analítico (Facchin, 1997).

Após partição líquido-líquido, foram obtidas quatro frações: Hexano, Clorofórmio, Acetato de etila e Fração Remanescente.

Após teste das frações, observou-se a manutenção da atividade antimicrobiana na fração Acetato de etila, bem como na Fração Remanescente para *Candidas*, oriundas da amostra **8,2 21d**. Já para a amostra **BA 35.1.1** não houve a manutenção da atividade antimicrobiana em nenhuma das frações testadas. Entretanto, para a amostra **8,2 21d**, que outrora apresentava atividade com halos de inibição acima de 20mm, a atividade antimicrobiana se apresentou de forma mais discreta, formando halos de 4-9 mm para cada fração positiva. Os dados estão dispostos no Quadro 2 a seguir.

Quadro 2 - Resultados da reanálise das frações.

Frações	<i>C. albicans</i> 2001	<i>C. albicans</i> 6258	<i>C. parapsilosis</i> 22014
Hexano (8,2 21d)	-	-	-
Clorofórmio (8,2 21d)	-	-	-
Acetato (8,2 21d)	6mm	6mm	9mm
FR (8,2 21d)	4mm	5mm	5mm
Hexano (BA 35.1.1)	-	-	-
Clorofórmio (BA 35.1.1)	-	-	-
Acetato (BA 35.1.1)	-	-	-
FR (BA 35.1.1)	-	-	-

Fonte: Autores.

A reanálise da atividade antimicrobiana das frações emitiu alguns resultados de forma inesperada. Apenas 2 (duas) frações da amostra 8,1 21d deram positivo para atividade antifúngica, contra 3 (três) espécies de *Candida*, entretanto com atividades mais discretas, com halos abaixo de 9mm, diferentemente do teste anterior no qual se obteve um halo de 24mm. Na outra amostra não houve atividade em nenhuma das frações adquiridas, após fermentação.

A potência observada da ação antifúngica das frações do extrato da amostra 8,1 21d foi inferior ao primeiro teste preliminar de triagem, entretanto a atividade continuou a ser observada. O estresse biológico conseguiu reproduzir, em grande parte, as mesmas condições a que foram submetidas por Negreiros (2020), pois a substância ativa, ou grupamento de substâncias ativas, ainda assim foram produzidas durante a fermentação. Para uma produção em iguais condições ambientais e de estresse biológico, seria necessário uma padronização no cultivo da espécie testada e para isso se faz imperativo identificar e estudar diversos aspectos inerentes à espécie em questão.

As frações que resultaram positivamente, foram levadas para Análise Cromatográfica para realização da análise do perfil químico da amostra, na qual se observaria quais compostos estariam presentes e se especularia quais seriam responsáveis pela atividade antifúngica. Após isto, esse extrato seria purificado e esses grupamentos isolados.

A amostra 8,2 21d possuiu o melhor resultado das análises antimicrobianas, desta forma o fungo filamentosu responsável por este extrato foi cultivado para que houvesse o crescimento da colônia e posterior extração de material genético. Para o sequenciamento genético utilizou-se as bases de dados do “contig (EF3-forward+EF22reverse): BLAST, MLST, e FusariumID. Gene EF-alpha:

O primeiro sequenciamento trouxe uma proximidade de 98,38% com o grupo que compreende espécies de *Fusarium incarnatum-equiseti* na base de dados consultada. Este sequenciamento inicial é uma etapa de triagem para afunilar as pesquisas para determinação da espécie que pode ser acompanhado na Figura 2 a seguir.

Figura 2 - *Fusarium incarnatum-equiseti* como resultado do sequenciamento genético na base de dados. Similaridade de 98,38%.

#	Reference description	Score	Probability	Similarity%	Fragments	Overlap%	Direction	Rating
1	Fusarium incarnatum-equiseti species complex (NRRL 32867; MLST type: 23-a) GQ000616 Fusarium incarnatum-equiseti species complex (NRRL 32867; MLST type: 23-a); Fusarium incarnatum-equiseti species complex (NRRL 32867; MLST type: 23-a), 23-a, NRRL 32867 FRC R-8837, NRRL 32867, USA TX, Human, n1; Translation elongation factor 1 alpha gene (EFl) Fusarium	1046.08	0	98.38%	1	97.24%	+/-	****
2	Fusarium incarnatum-equiseti species complex (NRRL 13379; MLST type: 23-b) GQ000091 Fusarium incarnatum-equiseti species complex (NRRL 13379; MLST type: 23-b); Fusarium incarnatum-equiseti species complex (NRRL 13379; MLST type: 23-b), 23-b, NRRL 13379 FRC R-2198, BBA 62200, NRRL 13379, India, Rice (Oryza sativa), n1; Translation elongation factor 1 alpha gene (EFl) Fusarium	1046.08	0	98.38%	1	97.24%	+/-	****
3	Fusarium incarnatum-equiseti species complex (NRRL 32866; MLST type: 23-a) GQ000617 Fusarium incarnatum-equiseti species complex (NRRL 32866; MLST type: 23-a); Fusarium incarnatum-equiseti species complex (NRRL 32866; MLST type: 23-a), 23-a, NRRL 32866 FRC R-8822, NRRL 32866, USA TX, Human cancer patients, n1; Translation elongation factor 1 alpha gene (EFl)	1046.08	0	98.38%	1	97.24%	+/-	****

Fonte: Autores.

Após sequenciamento o material genético passou por reanálise para confirmar a identificação a nível de espécie, chegando à proximidade de 99,08% com *Fusarium incarnatum-equiseti* complex NRRL 13379, no site do MLST Fusarium, conforme mostrado na Figura 3 a seguir.

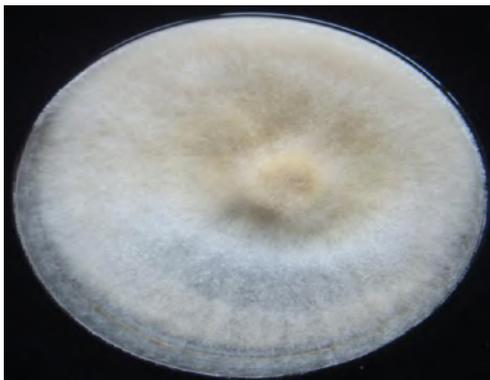
Figura 3 - Comparação com base de dados do MLST Fusarium para identificação das espécies.

Id	Species complex, strain and MLST type	Similarity	Account	Weight
11	Fusarium incarnatum-equiseti species complex (NRRL 13379; MLST type: 23-b) Species name: Fusarium incarnatum-equiseti species complex (NRRL 13379; MLST type: 23-b) Species complex: Fusarium incarnatum-equiseti species complex (NRRL 13379; MLST type: 23-b) MLST type: 23-b	99.08%	2/2	2.00
603	Fusarium incarnatum-equiseti species complex (NRRL 34000; MLST type: 24-a) Species name: Fusarium incarnatum-equiseti species complex (NRRL 34000; MLST type: 24-a) Species complex: Fusarium incarnatum-equiseti species complex (NRRL 34000; MLST type: 24-a) MLST type: 24-a	97.74%	2/2	2.00
1160	Fusarium incarnatum-equiseti species complex (NRRL 48297; MLST type: 24-b) Species name: Fusarium incarnatum-equiseti species complex (NRRL 48297; MLST type: 24-b) Species complex: Fusarium incarnatum-equiseti species complex (NRRL 48297; MLST type: 24-b) MLST type: 24-b	97.72%	2/2	2.00

Fonte: Autores.

Com a similaridade em torno de 99,08% pode-se entender que trata-se de um *Fusarium incarnatum-equiseti*. A sua colônia, trazendo suas características morfológicas, está representada na Figura 4 a seguir.

Figura 4 - *Fusarium Incarnatum-equisetti*.



Fonte: <https://bspjournals.onlinelibrary.wiley.com/cms/asset/ec1cdde4-1368-465b-a30c-b5a33a7bb9d2/ndr2bf00523-fig-0002-m.jpg>

A imagem traz o espécime de *Fusarium* em cultivo com meio sólido em placa de petri. A atividade antifúngica de espécies de *Fusarium* contra espécies de cândidas também já fora descrita anteriormente em outros estudos, como no estudo de Tayung K., Jha D. K. 2010, em que espécies de *Fusarium* tiveram atividades de inibição, com halos bem expressivos, contra *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Singh R. S., Thakur S. 2014 descreveram também atividades antifúngicas oriundas de Lectinas Miceliais de espécies de *Fusarium* sp. Estas pesquisas retratam que há possibilidades de atividades antifúngicas oriundas de extratos de espécies de *Fusarium* sp, convergindo para os dados encontrados nesta pesquisa, embora que esta espécie esteja sendo encontrada no ambiente amazônico, diferente de outros ambientes encontrados. Torna-se interessante em que atividades antifúngicas semelhantes, de um conjunto de espécies semelhantes, mas de origem geográfica diferentes, vivendo em relações comensais, livres ou parasitárias, sejam detectadas. Este resultado atrai olhares para o gênero *Fusarium* sp e suas capacidades biotecnológicas ainda não exploradas na região amazônica.

4. Conclusão

A exploração sustentável leva o pesquisador a caminhos ainda não conhecidos, rotas ainda não decifradas e resultados inesperados. As análises desta Bioprospecção retratam uma substância, ainda desconhecida, produzida por uma espécie de *Fusarium incarnatum-equiseti*, oriundo da flora intestinal de um espécime Coleoptera amazônico, que se alimenta de troncos de árvores mortas, capaz de demonstrar sua atividade antifúngica frente às cepas de espécies de *Candidas* sp.

Neste sentido imperiosa é a necessidade de complementar os dados com análise Cromatográfica juntamente com Espectroscopia para determinação do perfil químico da fração do extrato responsável pela atividade antifúngica, o isolamento do composto de interesse ou grupamento de compostos, bem como a sua elucidação para que em breve a comunidade científica tenha mais um candidato à antifúngico em estudos que por ventura seguirão.

Referências

- Afonso S. *et al.* (2009). Influência do solvente extrator no processo de extração de metabólitos secundários da *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill pelos parâmetros de Snyder. 49º Congresso Brasileiro de Química.
- Balmford, A. *et al.* (2002). Economic Reasons for Conserving Wild Nature. *Science*, 297, 950-953.
- Boucher, S. (2005). Évolution et phylogénie des Coleoptères Passalidae (Scarabaeoidea) Les taxons du groupe famille. In: La tribu néotrôulbopocale des Proculini et son complexe Veturius. *Annales de la Société Entomologique de France* (N. S.) 41(3/4), 239-604.
- Brown, G. D. *et al.* (2012). Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Sci. Transl. Med.*, 4, 165rv13.
- Celestino J. R. *et al* (2014). Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. *Process Biochemistry*. Science Direct. 569-575.

- Constanza, R. et al. (1997). The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature*, 387, 253-260.
- Denning, D. W., & Hope, W. W. (2010). Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. *Trends in Microbiology*, 18, 195-204.
- Demir, E., Basbülbul G. (2017). Screening of Bacteriocin Production in Lactic Acid Bacteria Isolated From Fermented Dairy Products. *Biotechnology Journal, India*, 18(2), 1-9. <http://portal.anvisa.gov.br/fitoterapicos>.
- Enoch, D. A. et al. (2006). Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 809–818.
- Facchini I., Pasquini C. (1997). Extração líquido-líquido em sistemas de fluxo. Universidade Estadual de Campinas. *Química Nova* p21(1)
- Fang-Zhou L. et al. (2020) Bioprospecção de um novo endofítico *Bacillus velezensis* FZ06 das folhas de *Camellia assamica*: Produção de três grupos de lipopeptídeos e a inibição de microrganismos que deterioram alimentos. *Journal of Biotechnology. Elsevier*. [42-53].
- Ferreira M. G. R. (2006). Aspectos Sociais da fitoterapia. Portal Embrapa, ISSN: 0103-9865.
- Fonseca, C.R.V., et al. (2011). A hypothetical evolutionary history of passalid beetles narrated by the comparative anatomy of the hindgut (Coleoptera: Passalidae). *Zootaxa*, 3012(1), 1–20.
- Fuentefria, A. M. et al. (2017). Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. *Lett. Appl. Microbiol.*, 66, 2-13.
- Garber, G. (2001). An Overview of Fungal Infections. *Drugs*, 61, 1-12.
- Júnior N. L. S. (2011). Desafios da Bioprospecção no Brasil. Ipea, Brasília.
- Lavika J., Deepthi (2017). Avaliação do desempenho de celulases fúngicas com bagaço de cana pré-tratado com ácido diluído: Uma estratégia robusta de bioprospecção para enzimas de biocombustíveis. *Science Direct*. 115, 978-988.
- Lelej, A. S., & Storozhenko, S. Y. (2010). Insect taxonomic diversity in the Russian far east. *Entomological Review*, 90(2), 372–386.
- Matias E. D., & Pimentel N. C. (2005). Biotecnologia: um desafio para o Amazonas.
- Mavor, A. L. et al. (2005). Systemic Fungal Infections Caused by Candida Species: Epidemiology, Infection Process and Virulence Attributes. *Curr. Drug Targets*, 6, 863-874.
- Miceli, M. H. et al. (2011). Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect. Dis.*, 11, 142–51.
- Milano, H. S. (2012). Identificação de microrganismos do trato digestivo de pragas de cana-de-açúcar com atividade enzimática para degradação de substratos lignocelulósicos e potencial para bioconversão de D-xilose em xilitol. Master's Dissertation, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, University of São Paulo, Piracicaba. doi:10.11606/D.64.2012.tde-25102012-143920. Retrieved 2022-12-19, from www.teses.usp.br
- Montefusco E. L. B. (2020) Isolamento e potencial enzimático de fungos associados ao intestino de larvas de *Stenochironomus kieffer* (insecta: díptera: chironomidae). *Brazilian Journal of Development*. DOI: 10.34117/bjdv6n5-347
- Negreiros M. A. (2020) Avaliação de meios e condições de cultivo de fungos filamentosos amazônicos em um programa de triagem de antimicrobianos. PPGCTRA – UFAM.
- Pimentel V. et al. (2015). Biodiversidade Brasileira como fonte de inovação farmacêutica: uma nova esperança? *Revista do BNDES*, Junho.
- Posada L. F. et al. (2016). Bioprospecção de bactérias aeróbias formadoras de endosporos com potencial biotecnológico para promoção do crescimento de bananeiras. *Science Direct*.
- Priyanka A., & Pandey A. (2020). Bioprospecting plant growth promoting endophytic bacteria isolated from Himalayan yew (*Taxus wallichiana* Zucc.). Instituto Nacional do Meio Ambiente do Himalaia. *Microbiological Research*. 239. 126536.
- Reis C. S. (2017). Fungos associados a besouros da ambrosia, *Euplatypus paralellus*. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Reyes-Castillo, P. (1970). Coleoptera, Passalidae: Morfología y división en grandes grupos: géneros americanos. *Folia Entomológica Mexicana*, 20(22), 3–240.
- Saccaro Júnior, Nilo L. (2011). A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada: Brasília. Vol XV. 229-244
- Santos R. R. C. (2018). Influência do estresse físico-químico e biológico na produção de pigmentos por *Penicillium sclerotiorum* LM 5679. Universidade Federal do Amazonas.
- Shiela E. U. et al. (2014) Ferramentas de biologia sintética para bioprospecção de produtos naturais em eucariotos. *Science Direct*.
- Silveira, L. M. S., et al. (2009). Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. *Revista Brasileira de Farmácia, Brasil*, 90(2), 124- 128.
- Singh R. S., & Thakur S. (2014). Antimicrobial activity and carbohydrate specificity of new mycelial lectins from *Fusarium sp.* Institute of Molecular Biology, Slovak Academy Science.

Souza G. F. L. (2017). Prospecção de leveduras fermentadoras de xilose do intestino de besouros (Insecta: coleóptera) de áreas de floresta amazônica em Itacoatiara-Am. PPGCTRA – UFAM.

Tayung K., & Jha D. K. (2010). Antimicrobial endophytic fungal assemblages inhabiting bark of *Taxus baccata* L. of Indo-Burma mega biodiversity hotspot. Indian Journal Microbiol.

Ye J. *et al.* (2006). BLAST: improvements for better sequence analysis. Nucleic Acids Research, Oxford University Press.

Zamberlan J. F. *et al.* (2014). Produção e manejo agrícola: impactos e desafios para sustentabilidade ambiental. Eng. Sanit. Ambient. Edição especial.