

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
PARA RECURSOS AMAZÔNICOS (PPGCTRA)

**Bioprospecção de Fungos Filamentosos Amazônicos e Prospecção
Química como estratégia sustentável para descoberta de novos
fármacos na Amazônia.**

JOÃO LUCAS DA SILVA RUFINO

ITACOATIARA

2022

JOÃO LUCAS DA SILVA RUFINO

Bioprospecção de Fungos Filamentosos Amazônicos e Prospecção Química como estratégia sustentável para descoberta de novos fármacos na Amazônia.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, área de concentração em Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Recursos Amazônicos, linha de pesquisa Agrobioenergia, análise e manejo de recursos amazônicos.

Orientador: Prof. Dr. Maxwell Adriano Abegg

ITACOATIARA

2022

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R926b Rufino, João Lucas da Silva
Bioprospecção de fungos filamentosos amazônicos e prospecção química como estratégia sustentável para descoberta de novos fármacos na amazônia / João Lucas da Silva Rufino . 2022
63 f.: 31 cm.

Orientador: Maxwell Adriano Abegg
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Bioprospecção. 2. Prospecção química. 3. Fungos. 4. Amazônia. I. Abegg, Maxwell Adriano. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

A ordem é a base de todas as coisas boas.

(Edmund Burke)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus em suas infinitas formas que nos possibilita estarmos aqui desfrutando do dom da vida e do conhecimento.

Agradeço a minha mãe Kátia Rufino, que fez tudo que pôde para me proporcionar bons estudos, sempre esteve ao meu lado sendo meu porto seguro e a base de minha confiança. Estendo estes agradecimentos aos meus tios Paulo Reis e Leoni Rufino.

Agradeço aos meus amigos Farmacêuticos que tive o prazer de ter vivido a graduação e me apoiam nos meus estudos e sonhos, sempre ajudando quando podem, mesmo que com uma palavra de conforto: Dra Adna Santos, Dra Adriana Farias, Dra Cláudia Regina, Dra Janira Cruz e Dr Felipe Farias.

Aos meus amigos antigos e recentes, que por mais distantes que estejamos, quando nos encontramos sempre é a mesma sintonia boa: Woslon Paes, Ewerton Bandeira, Allana Castro, Sophie Mourão, Edson Wanzeler, Josiele Viana, Kayo Hamysh e ao pequenino Anakin, Juliana Cruz, Aila Carvalho, Thenisson Rodrigo, Marialva Queiroz, Marjoria Botelho e família, Isabella Rebecca e família.

Ao meu Orientador Maxwel Adriano Abegg, pelo tempo, pelos ensinamentos e pela disposição em me guiar no caminho do mundo da pesquisa científica, moldando mais um profissional para a sociedade.

À Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado do Amazonas (FAPEAM) que através da bolsa de estudos financiou meu trabalho durante todo esse processo.

Aos professores Geone Maia Correa e Valdomiro Lacerda Martins por abraçarem a pós graduação dando oportunidades aos discentes do interior a alcançarem maiores degraus de formação acadêmica.

Aos servidores terceirizados e técnicos administrativos do ICET por manterem em pleno funcionamento o instituto onde pude ter o privilégio de cursar esta pós-graduação.

Agradeço a Banca Avaliadora pelo tempo cedido para observações e correções neste trabalho, afim de aprimorá-lo cada vez mais, trazendo para mim uma compreensão melhor sobre a construção de uma pesquisa científica.

Estendo os agradecimentos a CAPES, Projeto PROCAD Amazônia 2018, aos professores Alexandre Meneghello Fuentefria e Saulo Andrade da Faculdade de Farmácia da UFRGS e à Dra Priscila Dallé da Rosa do Laboratório Especial de Doenças Infecciosas/HCPA.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos (PPGCTRA/ICET/UFAM) pelo compartilhamento de conhecimento e incentivo aos estudos e a pesquisa das universidades públicas.

Agradeço a todas as pessoas e instituições que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho de pesquisa.

SUMÁRIO

	Resumo Geral	10
1.0	Introdução Geral.....	11
2.0	Objetivo Geral.....	16
2.1	Objetivos específicos.....	16
	CAPÍTULO I: Bioprospecção como rota de Desenvolvimento Sustentável na Amazônia.....	17
	Resumo.....	17
1.0	Introdução.....	18
2.0	Objetivo Geral.....	22
2.1	Objetivos Específicos.....	22
3.0	Metodologia.....	22
3.1	Coleta dos besouros e extração dos microrganismos.....	22
3.2	Identificação morfológica.....	23
3.3	Microrganismos utilizados para os testes antimicrobianos.....	23
3.4	Teste antimicrobiano com frações de extratos bioprospectados.....	23
3.5	Cultivo em Escala Piloto.....	24
3.6	Extração da Cultura de Fungos	24
3.7	Purificação Parcial dos Metabólitos Secundários.....	24
3.8	Identificação genética das espécies selecionadas para prosseguimento no estudo através da técnica de Sequenciamento e Análise de Homologia por BLAST.....	25
4.0	Resultados e Discussão.....	25
4.1	Resultados do teste antimicrobiano pela técnica de <i>spot</i>	25
4.2	Resultados do cultivo em Escala de bancada em Meio Líquido.....	27
4.3	Resultado da extração da Cultura de Fungos.....	28
4.4	Resultado da Purificação Parcial dos Metabólitos Secundários e reanálise antimicrobiana.....	29
4.5	Resultados da Identificação genética através da técnica de Sequenciamento e Análise de Homologia por BLAST.....	30
5.0	Conclusão.....	33
6.0	Referências Bibliográficas.....	33
	CAPÍTULO II: Prospecção Química como rota para o desenvolvimento Sustentável na Amazônia.....	36
	Resumo.....	36
1.0	Introdução.....	37
1.1	Acetolactato sintase (ALS) como alvo para desenvolvimento de novos fungicidas.....	37
1.2	8-Hidroxiquinolina e seus derivados como compostos fúngicos.	38
1.3	Prospecção de produtos sintéticos antifúngicos como estratégia de descoberta de fármacos.....	40
2.0	Objetivo	41

2.1	Objetivos Específicos	41
3.0	Metodologia	41
3.1	Preparo das amostras de compostos sintéticos.....	41
3.2	Cálculo das concentrações das soluções estoque de compostos sintéticos.....	42
3.3	Concentração Inibitória Mínima (MIC) de extratos e compostos sintéticos.....	42
4.0	Resultados e Discussão	42
4.1	Cálculo das concentrações das soluções estoque de compostos sintéticos.	42
4.2	Concentração inibitória mínima (MIC).....	43
5.0	Conclusão	45
6.0	Referências Bibliográficas	46
	CAPÍTULO III: Revisão Estruturada através de Mapeamento Sistemático sobre o Cenário da Bioprospecção na Amazônia	47
	Resumo	48
1.0	Introdução	49
2.0	Metodologia	50
2.1	Estratégia de Busca.....	50
2.2	Primeiro procedimento de seleção.....	50
2.3	Critérios de inclusão.....	51
2.4	Critérios de Exclusão.....	51
2.5	Segundo procedimento de seleção.....	51
2.6	Procedimento de Extração e análise.....	51
2.7	Procedimento de Síntese.....	52
3.0	Resultados e Discussão	52
3.1	Resumo dos resultados.....	53
3.2	Formulários de Extração.....	55
4.0	Conclusão	60
5.0	Referências Bibliográficas	61
3.0	Conclusão Geral	62
4.0	Referências Bibliográficas Geral	63

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1		
Figura 1	Espécime Coleoptera.....	21
Figura 2	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> como resultado do sequenciamento genético na base de dados.....	31
Figura 3	Comparação com base de dados do MLST <i>Fusarium</i> para identificação das espécies.....	31
Figura 4	Informações complementares sobre <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> ...	32
Figura 5	<i>Fusarium Incarnatum-equisetti</i>	32
CAPÍTULO 2		
Figura 1	Estrutura do inibidor de ALS pyriithiobac.....	38
Figura 2	Estrutura dos derivados de 8-hidroxiquinolinas 1 e 2.....	39
Figura 3	Estrutura do derivado de 8-hidroxiquinolina	40
Figura 4	Estrutura geral dos derivados de 8-hidroxiquinolina, inibidor pyriithiobac e estratégia de hibridização molecular para o planejamento dos análogos híbridos.....	41
CAPÍTULO 3		
Figura 1	Artigos por ano.....	53

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1		
Quadro 1	Resultados do teste antimicrobiano das frações de fungos filamentosos.....	25
Quadro 2	Resultados da reanálise das frações.....	29
CAPÍTULO 2		
Quadro 1	Concentrações das amostras durante o processo de preparo da amostra até a aplicação no poço 1 da placa do MIC.....	43
Quadro 2	Valores aproximados das concentrações das amostras de compostos sintéticos testados no MIC.....	43
Quadro 3	Valores expressos em títulos de diluição das amostras de compostos sintéticos testados no MIC.....	44
CAPÍTULO 3		
Quadro 1	<i>String</i> de Busca.....	50
Quadro 2	Formulário de Extração.....	52
Quadro 3	Passo a passo da execução dos Strings de busca.....	52
Quadro 4	Conjunto Final de Artigos.....	52
Quadro 5	Formulário de Extração preenchidos.....	55

RESUMO

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. As infecções fúngicas superficiais são aquelas que afetam a pele, o tecido queratinoso e mucosas; são bastante comuns e acometem 20 a 25% da população mundial, sendo que a projeção para os próximos anos é de que esse número aumente. Os patógenos mais frequentemente observados nas infecções fúngicas invasivas pertencem aos quatro gêneros: *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* e *Pneumocystis*. A busca por medicamentos antifúngicos cada vez mais se destaca dentro de um cenário com poucos candidatos para uso. Com este cenário, abre-se caminho para o desenvolvimento biotecnológico sustentável através do uso da ferramenta de bioprospecção. Na tentativa para se atingir o objetivo da bioprospecção, tem ocorrido um aumento nas investigações por produtos naturais como possíveis fontes, ainda não estudadas, de compostos e moléculas bioativas. Para além da investigação sobre produtos naturais, ainda se perscruta sobre àqueles de origem sintética, onde se utilizam compostos naturais como base de estudo, ou se sintetizam compostos químicos capazes de atuar em determinada função biotecnológica específica, estudada previamente. Nesta pesquisa estará descrita a realização de uma Bioprospecção de fungos extraídos de intestino de besouro e Prospecção Química bem como Avaliar o Cenário da Bioprospecção no contexto Amazônico.

ABSTRACT

The incidence of fungal diseases is alarmingly widespread in all parts of the world, whether they are superficial infections or, more worryingly, invasive systemic infections. Superficial fungal infections are those that affect the skin, keratinous tissue and mucous membranes; are quite common and affect 20 to 25% of the world population, and the projection for the coming years is that this number will increase. The pathogens most frequently observed in invasive fungal infections belong to the four genera: *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and *Pneumocystis*. The search for antifungal drugs increasingly stands out within a scenario with few candidates for use. With this scenario, a path is opened for sustainable biotechnological development through the use of the bioprospecting tool. In an attempt to achieve the objective of bioprospecting, there has been an increase in investigations of natural products as possible sources, not yet studied, of bioactive compounds and molecules. In addition to research on natural products, those of synthetic origin are still being investigated, where natural compounds are used as a basis for study, or chemical compounds capable of acting in a specific biotechnological function, previously studied, are synthesized. This research will describe the performance of a Bioprospection of fungi extracted from beetle intestines and Chemical Prospecting as well as Evaluating the Bioprospecting Scenario in the Amazonian context.

1.0 INTRODUÇÃO GERAL

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).

As infecções fúngicas superficiais são aquelas que afetam a pele, o tecido queratinoso e mucosas; são bastante comuns e acometem 20 a 25% da população mundial, sendo que a projeção para os próximos anos é de que esse número aumente. Os principais causadores das infecções superficiais são os fungos dermatófitos, especialmente *Trichophyton* spp, *Microsporum* spp e *Epidermophyton* spp e a distribuição das espécies variam de acordo com a região geográfica (Hay, 2017; Ameen, 2010; Foster *et al.*, 2004; Garber, 2001).

A maioria das infecções superficiais são tratáveis e facilmente diagnosticadas por meio de uma combinação do histórico do paciente, exame físico e microscopia e cultura de espécimes de pele ou de unhas, entretanto, o agente etiológico não é rotineiramente identificado. Na maioria dos pacientes, os sintomas são leves e pouco preocupantes, no entanto, o impacto na qualidade de vida do paciente pode ser grave. Apesar de não representarem risco de morte, as doenças superficiais podem atuar como um reservatório de organismos, que em algumas circunstâncias podem se espalhar para outras áreas do corpo ou outros indivíduos. Maior atenção deve ser direcionada aos pacientes imunocomprometidos, por apresentarem maior risco de evoluírem para uma infecção invasiva (Hay, 2017; Garber, 2001).

Ao contrário das infecções superficiais, as infecções fúngicas invasivas podem ser fatais e estão associadas à alta morbidade e mortalidade, matando cerca de um milhão e meio de pessoas a cada ano. O sistema imunológico de indivíduos saudáveis é capaz de prevenir de forma eficiente o aparecimento de infecções fúngicas, entretanto, a incidência dessas infecções vem aumentando nas últimas décadas. Vários fatores foram

atribuídos como responsáveis por esse aumento, dentre eles o crescente uso de agentes antineoplásicos, imunossupressores e antibióticos de amplo espectro, além do elevado número de pacientes com doenças imunossupressoras como a AIDS. O uso de próteses e enxertos além de cirurgias agressivas também predispõem à doença (Brown *et al.*, 2012; Miceli *et al.*, 2011; Enoch *et al.*, 2006; Garber, 2001;).

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;).

Embora as opções de tratamento para infecções fúngicas invasivas tenham aumentado na última década, principalmente com a introdução das equinocandinas e dos triazóis de terceira geração, os resultados nos pacientes são decepcionantes, uma vez que o uso dos agentes antifúngicos resultou em apenas uma modesta redução das altas taxas de mortalidade associadas às doenças invasivas. Isto se deve, também, aos atrasos no diagnóstico da doença e na identificação dos fungos (Brown *et al.*, 2012).

Além disso, 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).

Em comparação com outros agentes patogênicos, os fungos são evolutivamente próximos dos seres humanos, o que dificulta a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. Atualmente existem poucos candidatos a fármacos antifúngicos no desenvolvimento pré-clínico, além de poucas empresas desenvolvendo novos antimicrobianos. Adicionalmente, temos poucos alvos moleculares seletivos descobertos para o planejamento de antifúngicos e, o retorno financeiro previsto com os antifúngicos parecem não atrair as grandes indústrias farmacêuticas (Brown *et al.*, 2012; Denning e Hope, 2010;).

Com este cenário, abre-se caminho para o desenvolvimento biotecnológico sustentável através do uso da ferramenta de bioprospecção. Compreende-se como bioprospecção toda busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos em geral (coletivamente chamados de recursos genéticos) que possam, eventualmente, levar ao desenvolvimento de um produto biotecnológico (Saccaro Júnior, 2011).

Na tentativa para se atingir o objetivo da bioprospecção, tem ocorrido um aumento nas investigações por produtos naturais como possíveis fontes, ainda não estudadas, de compostos e moléculas bioativas.

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 (Ferro, 2006).

Para além da investigação sobre produtos naturais, ainda se perscruta sobre àqueles de origem sintética, onde se utilizam compostos naturais como base de estudo, ou se sintetizam compostos químicos capazes de atuar em determinada função biotecnológica específica, estudada previamente. A bioprospecção visa, de maneira rápida e eficiente, a forma mais sustentável de se obter produtos biotecnológicos. A produção desses compostos podem ser uma alternativa de interesse industrial, caso demonstradas suas promissoras atividades.

Esse cenário faz refletir sobre o impacto das infecções fúngicas no mundo inteiro e da urgente necessidade no aumento das pesquisas, financiamento e desenvolvimento de novos candidatos a fármacos para o tratamento das infecções fúngicas. Neste trabalho os fungos filamentosos serão alvos deste estudo de bioprospecção.

O vale do Amazonas, onde desembarcaram europeus no início do século XVI, era repleto de comunidades indígenas relativamente bem povoadas. Ao longo de 250 anos de conquista e colonização, muitos povos indígenas foram dizimados, tanto pela

violência e deturpação dos seus valores, quanto pelas doenças contagiosas trazidas pelos colonizadores (Imazon 2015). Em muitos casos, houve destribalização e o surgimento do “caboclo” e outros grupos tradicionais (Cunha e Almeida 2001).

No período compreendido entre o final do século XIX e início do século XX, a borracha passou a ser um produto de destaque na economia da região Amazônica. Depois do aprimoramento da técnica de vulcanização, a borracha passou a ser utilizada para a fabricação de sapatos de ótima qualidade, assim como utensílios médicos e de uso doméstico (Imazon 2015).

Na década de 1970, a Amazônia passa a ser considerada prioridade, com a construção de estradas, projetos de mineração, hidrelétricas e fazenda de gados, com atrativo dos grandes produtores rurais para a Região. E por muito tempo a região Amazônica foi considerada como um vazio demográfico, por causa da sua imensidão e das populações bem divididas e espalhadas ao longo da Região; deixando muitos espaços não habitados pelas comunidades locais. Durante o período de pós-guerra da segunda guerra mundial, houve uma movimentação de migração de população de áreas adjacentes, como o Nordeste e Sudeste, para a Amazônia (Hogan *et. al.*, 2002).

Com a diminuição dos incentivos fiscais para a agropecuária houve um incremento na atividade de exploração de madeira de florestas nativas, ocasionando o aumento do desmatamento mais intenso na região conhecida como Arco do Desmatamento. O Arco do Desmatamento é a região que compreende desde o Sudeste do Pará, até o Oeste, passando por Mato Grosso, Rondônia e Acre (Dinâmica Ambiental 2014). O avanço da fronteira agrícola em direção à floresta levou ao conhecido “boom madeireiro”.

A pouca restrição legal para a exploração da madeira levou ao uso predatório da mesma, no ambiente Amazônico. Apenas durante a década de 1990, com a exigência do manejo florestal, houve uma regulamentação maior sobre a exploração madeireira. O desmatamento não afeta apenas as espécies arbóreas, mas também toda a biodiversidade local, com alteração do clima e a dinâmica ambiental. Os Ecossistemas Amazônicos são ricos, mas paradoxalmente, são também extremamente frágeis.

Os solos Amazônicos – diferentemente dos solos de outras regiões do mundo onde florestas foram devastadas sem provocar grandes danos ambientais – são solos rasos, mal estruturados, pobres, em sua maioria; e

sobrevivem às custas de nutrientes que recebem da floresta (Loureiro V. R 2002).

Em virtude de décadas de explorações econômicas desordenadas da Amazônia, bem como a submissão da natureza às consequências destrutivas do desmatamento, observa-se a necessidade de desenvolver pesquisas que visem uma exploração dos recursos naturais de forma sustentável, para que estes prosperem em gerações vindouras. Por tanto, atuar através de Desenvolvimento Sustentável é um caminho promissor.

O Desenvolvimento Sustentável é uma ferramenta para o progresso, juntamente com a preservação do meio ambiente, para garantir às gerações futuras o acesso aos recursos naturais que ainda existem atualmente. Este termo ficou popularizado por meio do relatório “Nosso futuro comum”, de 1987, publicado pela Comissão Mundial Sobre o Meio Ambiente, da Organização das Nações Unidas (ONU).

Os Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contêm metas e indicadores na área de redução de pobreza, proteção ambiental, prosperidade humana e paz (Eileen 2021). Desta forma, deve-se traçar rotas de exploração de recursos naturais sem extingui-los. Ao traçar as metas para este desenvolvimento tecnológico deve-se atentar ao manejo racional destes recursos indispensáveis, bem como o emprego de novas tecnologias durante sua produção. No Brasil, a questão de sustentabilidade deve ser prioridade, uma vez que o País é detentor da maior fatia de biodiversidade do planeta, abrigando cerca de 13% de todas as espécies existentes (Lewindsohn; Prado 2006).

Explorar toda a riqueza da biodiversidade sem comprometê-la, este é o desafio do desenvolvimento sustentável. Os componentes econômicos, ambientais e sociais devem ser compreendidos de forma que sejam vistos totalmente integrados e que não podem, de forma alguma, serem dissociáveis. As implementações de ações ou estratégias que sejam de acordo com apenas uma dessas dimensões, devem ser revisadas para garantir a exploração e desenvolvimento sustentável.

Diante desse contexto, fica evidente de que os desafios da sociedade contemporânea são tão complexos que são exigidas ações coletivas para a redefinição de nossas relações produtivas, cultural, social, para que assim a vivência mais sustentável seja concretizada (Carvalho 2019).

Carvalho (2019) também relaciona a presença do tema em debates políticos, em investigações acadêmicas, nas demais esferas da sociedade, com problemas complexos que são gerados a partir da relação entre recursos naturais e crescimento econômico.

O que preocupa em relação a este tema é a questão estabelecida por diversos segmentos da sociedade em relação ao crescimento econômico e à preservação dos recursos naturais e, equidade social com o ambiente institucional. A busca pelo cumprimento desses fatores, trazendo os componentes principais do Desenvolvimento Sustentável, desenvolvimento econômico, equidade social e proteção ambiental, determinado pela ONU, pode-se atentar ao leque de possibilidades de inovação que se tem na Amazônia. Dentre os modelos de desenvolvimento sustentável destaca-se a Bioprospecção para o planejamento e criação de modelos biotecnológicos, bem como a Prospecção Química como rotas de produção sintética para a Região Amazônica. Estes temas serão amplamente debatidos e discutidos nos capítulos 1 e 2 desta Dissertação enquanto no capítulo 3 estará disposto um mapeamento sistemático da literatura sobre o cenário da bioprospecção no contexto amazônico.

2.0 OBJETIVOS

Objetivo Geral: Realizar Bioprospecção de fungos extraídos de intestino de besouro e Prospecção Química bem como Avaliar o Cenário da Bioprospecção na Amazônia.

Objetivos específicos:

i: Analisar os extratos de espécies fúngicas extraídas do intestino de besouro e pesquisar suas atividades biológicas;

ii: Estabelecer a relação Bioprospecção – Prospecção Química – Desenvolvimento Sustentável;

iii: Analisar o potencial das atividades biológicas dos análogos sintéticos;

iv: Avaliar o cenário da Bioprospecção e Bioprospecção de fungos na Amazônia;

CAPÍTULO I

Bioprospecção de fungos extraídos do intestino de besouro como rota de Desenvolvimento Sustentável na Amazônia

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*.

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.

1. INTRODUÇÃO

A diversidade biológica e variação genética, diferença entre ecossistemas que abrigam diferentes espécies, compreendem a biodiversidade. A atividade exploratória humana tem diminuído rapidamente a biodiversidade mundial, portanto a preocupação com este recurso natural é crescente. O Brasil faz parte de uma importante frente neste cenário, uma vez que é detentor da maior parte de biodiversidade do mundo. Os seres vivos possuem um papel importante com os serviços ambientais, tais como: regulação climática, ciclagem de nutrientes, polinização, formação de solos, fornecimento de água, entre outros cujo valor financeiro entraria na ordem de centenas de trilhões de dólares ao ano (Balmford et al., 2002; Constanza et al., 1997;).

Com toda a riqueza Amazônica dá-se a vantagem ao Brasil pela busca pelo desenvolvimento nacional; através da exploração correta destes recursos, minimizando danos ao ambiente e, fazendo com que haja o retorno deste recurso em um período adequado. Entretanto, este bioma é repleto de atividade agropecuária que dá retorno financeiro muito rápido e bem abundante; sendo bem mais atraente que a exploração sustentável.

O desmatamento é uma prática muito comum para a realização da agropecuária, e a retirada da cobertura vegetal provoca a redução da biodiversidade, extinção de espécies animais e vegetais, desertificação, erosão, redução dos nutrientes do solo; contribuindo para o aquecimento global, entre outros danos (Zamberlan 2014). Agregar valor para regiões com florestas em pé, deve ser uma alternativa mais efetiva de proteção do bioma Amazônico, devido à dificuldade de fiscalização de uma área gigantesca como a da Floresta Amazônica, por parte do governo.

Uma das maneiras de extrair valor econômico da biodiversidade é a bioprospecção, 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).

Os recursos genéticos utilizados na bioprospecção formam o patrimônio genético nacional. Dentre estes produtos biotecnológicos resultantes da bioprospecção cita-se o desenvolvimento de novos fármacos, que além de atrair ganhos financeiros, e trata 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 N. L. S. 2011).

Para bem além dos produtos originários da bioprospecção, há também o uso do conhecimento popular para utilização de medicamentos provenientes de plantas medicinais, como fitoterápicos.

O consumo de fitoterápicos e plantas medicinais tem sido estimulado com base no mito “se é natural não faz mal”. Porém, ao contrário da crença popular, eles podem causar diversas reações como intoxicações, enjôos, irritações, edemas e até morte, como qualquer outro medicamento (Anvisa 2020).

As plantas medicinais e aromáticas podem apoiar o crescimento econômico por meio de atividades relacionadas com o cultivo, a colheita, o processamento, a industrialização e a comercialização (Ferreira M. G. R. 2006). Todos esses processamentos, desde o plantio até a comercialização, podem ser sustentáveis se atenderem às exigências da Sustentabilidade, além de gerar renda, e agregar conhecimento científico.

A partir do advento da Tecnologia do DNA recombinante, ou Engenharia Genética, o termo biotecnologia passou a ser muito utilizado (Filho S. A. *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 biotecnológico.

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 E., Pimentel N. 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 E., Pimentel N. 2005).

Mesmo com o potencial econômico do uso da biotecnologia aliado à bioprospecção e desenvolvimento de fármacos, dentre outras atividades sustentáveis, este modelo de desenvolvimento científico, econômico e de saúde, esbarra nas dificuldades encontradas mediante a exploração legal e repartição de ganhos, levando para a exploração e apropriação ilegal; originando a biopirataria. Apesar da ilegalidade, encontram-se animais, suas partes e produtos sendo comercializados por criadouros clandestinos, lojas e até mesmo feiras livres (Junior N. S. L. 2011).

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;).

Lavika (2017) relata que a bioprospecção é uma ferramenta lucrativa para explorar novidades, como a avaliação do desempenho de celulases fúngicas com bagaço de cana pré-tratado com ácido diluído; como estratégia de bioprospecção robusta para enzimas de biocombustíveis, tal como foi abordado em sua pesquisa. Celestino (2014), por sua vez conclui que a bioprospecção de fungos Amazônicos é um meio viável de busca por novas fontes de corantes naturais, após identificar 5 (cinco) espécies, dentre 50 (cinquenta) coletadas, que produziram pigmentos e que foram caracterizados quimicamente.

Portanto, na atuação investigativa de uma pesquisa sobre biodiversidade e suas potencialidades, deve-se atentar a uma grande quantidade de trabalhos já publicados que utilizam como fonte de matéria biológica os compostos naturais.

A biotecnologia tem levado a uma manipulação, cada vez mais bem sucedida, de vias bioquímicas de interesse biotecnológico. Muitos microrganismos possuem capacidades produtivas 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, conseqüentemente, 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: O autor

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.

2. OBJETIVO

Objetivo Geral: Realizar a Bioprospecção de fungos extraídos do intestino de besouros da Amazônia.

Objetivo Específico:

- i:** Avaliar a atividade antifúngica dos extratos fúngicos frente às cepas de *Candida sp.*;
- ii:** Identificar a espécie fúngica produtora dos extratos de interesse por técnicas genômicas; e
- iii:** Avaliar o perfil químico dos extratos;

3. METODOLOGIA

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

3.1 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 G. F. L. *et al* 2017.

3.2 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 M. A. *et al*, 2020.

3.3 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.

3.4 Teste antimicrobiano com frações de extratos bioprospectados

Foram selecionadas 66 (sessenta e seis) frações dos extratos de fungos filamentosos que ainda não haviam sido trabalhados, 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 fungicida.

3.5 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.

3.6 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; Basbülbul, 2017).

3.7 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).

3.8 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).

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados do teste antimicrobiano pela técnica de *spot*

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 $\leq 12\text{mm}$), moderado (halo entre 12mm e 20mm) e intenso (halo $\geq 20\text{mm}$).

Os resultados estão dispostos nas tabelas abaixo.

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**.

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 fungistáticas, 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.

4.2 Resultados do cultivo em Escala de bancada em Meio Líquido

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 R. R. C., 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.

4.3 Resultado da extração da Cultura de Fungos

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 “sujando” as amostras.

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. A temperatura de secagem não foi tão elevada, pois as altas temperaturas podem desnaturar compostos microbiológicos presentes e o Acetato de Etila é bem volátil, portanto, permitindo uma secagem ainda

mais rápida e eficiente do que outros solventes, devido suas características físico-químicas específicas.

4.4 Resultado da Purificação Parcial dos Metabólitos Secundários e reanálise antimicrobiana

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.

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: O autor.

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.

4.5 Resultados da Identificação genética através da técnica de Sequenciamento e Análise de Homologia por BLAST.

A amostra 8,2 21d possuiu o melhor resultado das análises antimicrobianas, desta forma o fungo filamentosos responsável por este extrato foi cultivado para que para 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*. Este sequenciamento inicial é uma etapa de triagem para afunilar as pesquisas para determinação da espécie.

Figura 1: *Fusarium incarnatum-equiseti* como resultado do sequenciamento genético na base de dados

#	Reference description	Score	Probability	Similarity%	Fragments	Overlap%	Direction	Rating
1	Fusarium incarnatum-equiseti species complex (NRRL 32867; MLST type: 23-a) GQ200616 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-6897; NRRL 32867, USA TX, Human; n1: Translation elongation factor 1 alpha gene (EF1) Fusarium	1046.08	0	98.38%	1	99.24%	+/-	****
2	Fusarium incarnatum-equiseti species complex (NRRL 13379; MLST type: 23-b) GQ200291 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-5198; BBA 62200; NRRL 13379, India, Rice (Oryza sativa), n1: Translation elongation factor 1 alpha gene (EF1) Fusarium	1046.08	0	98.38%	1	99.24%	+/-	****
3	Fusarium incarnatum-equiseti species complex (NRRL 32866; MLST type: 23-a) GQ200615 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-6822; NRRL 32866, USA TX, Human cancer patient; n1: Translation elongation factor 1 alpha gene (EF1) Fusarium	1046.08	0	98.38%	1	99.24%	+/-	****

Fonte: o autor.

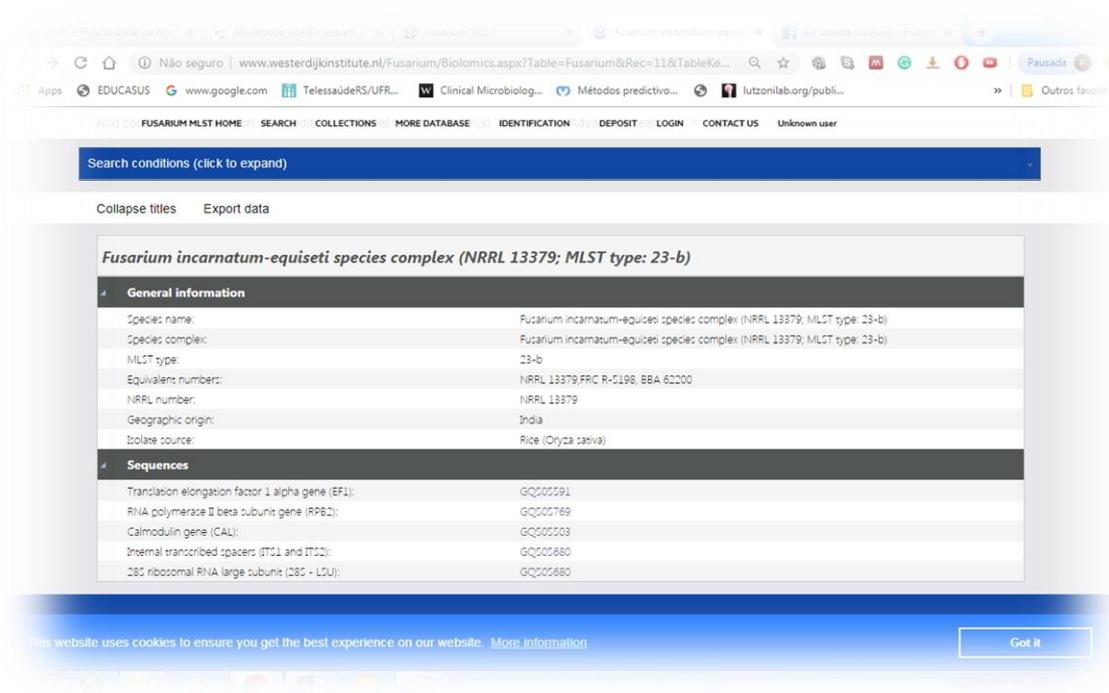
Após sequenciamento o material passou por reanálise para confirmar a identificação a nível de espécie, chegando à proximidade de 99,08% com *Fusarium incarnatum-equiseti* complex NRRL 13379, no site do MLST Fusarium.

Figura 2: Comparação com base de dados do MLST Fusarium para identificação das espécies.

Id	Species complex, strain and MLST type	Similarity	Accounte	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 34005; MLST type: 24-a) Species name: Fusarium incarnatum-equiseti species complex (NRRL 34005; MLST type: 24-a) Species complex: Fusarium incarnatum-equiseti species complex (NRRL 34005; 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: o autor.

Figura 3: Informações complementares sobre *Fusarium incarnatum-equiseti*



The screenshot shows the Fusarium MLST website interface. At the top, there is a navigation bar with links for 'FUSARIUM MLST HOME', 'SEARCH', 'COLLECTIONS', 'MORE DATABASE', 'IDENTIFICATION', 'DEPOSIT', 'LOGIN', and 'CONTACT US'. Below this is a search bar with the text 'Search conditions (click to expand)'. The main content area displays the following information:

Fusarium incarnatum-equiseti species complex (NRRL 13379; MLST type: 23-b)

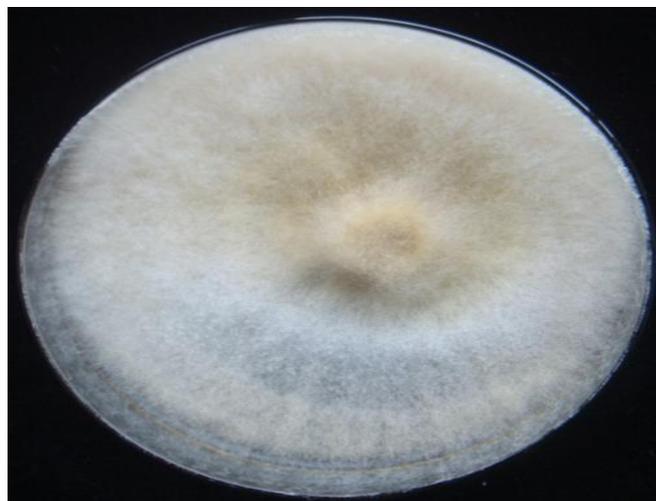
General information	
Species name:	Fusarium incarnatum-equiseti species complex (NRRL 13379; MLST type: 23-b)
Species complex:	Fusarium incarnatum-equiseti species complex (NRRL 13379; MLST type: 23-b)
MLST type:	23-b
Equivalent numbers:	NRRL 13379; FRIC R-5198; BBA 62200
NRRL number:	NRRL 13379
Geographic origin:	India
Isolate source:	Rice (<i>Oryza sativa</i>)

Sequences	
Translation elongation factor 1 alpha gene (EF1):	GQ002591
RNA polymerase II beta subunit gene (RPB2):	GQ002769
Calmodulin gene (CAL):	GQ002503
Internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2):	GQ002680
28S ribosomal RNA large subunit (28S - LSU):	GQ002680

At the bottom of the page, there is a cookie notice: 'This website uses cookies to ensure you get the best experience on our website. More information' with a 'Got it' button.

Fonte: o autor.

Figura 4: *Fusarium Incarnatum-equisetti*



Fonte: o autor

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.

5.0 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* capaz de demonstrar sua atividade 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.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Afonso S. *et al.* – 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. 2009.
- 2- Balmford, A. et al. Economic Reasons for Conserving Wild Nature. **Science**, v. 297, p. 950-953, 2002.
- 3- Boucher, S. Évolution et phylogénie des Coleoptères Passalidae (Scarabaeoidea) Les taxons du groupe famille. In: La tribu néotropical des Proculini et son complexe Veturius. **Annales de la Société Entomologique de France** (N. S.) vol. 41, n. 3-4 p. 239-604, 2005.
- 4- Celestino J. R. *et al.* Bioprospecção de fungos do solo amazônico com potencial para produção de pigmentos. **Science Direct** 2014.
- 5- Constanza, R. et al. The value of the world's ecosystem services and natural capital. **Nature**, v. 387, p. 253-260, 1997.
- 6- Demir, E.; BASBÜLBÜL, G. Screening of Bacteriocin Production in Lactic Acid Bacteria Isolated From Fermented Dairy Products. **Biotechnology Journal, India**, v.18, n. 2, p. 1-9, 2017.

- 7- Disponível em ><http://portal.anvisa.gov.br/fitoterapicos>< Acessado em 4/06/2021.
- 8- Facchin I., Pasquini C. – Extração líquido-líquido em sistemas de fluxo. **Universidade Estadual de Campinas**, 1997.0,3
- 9- Fang-Zhou L. *et al.* 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. **Science Direct**, 2020.
- 10- Ferreira M. G. R. Aspectos Sociais da fitoterapia. **Embrapa** 2006.
- 11- Fonseca, C.R.V.; *et al.* A hypothetical evolutionary history of passalid beetles narrated by the comparative anatomy of the hindgut (Coleoptera: Passalidae). **Zootaxa**, vol. **3012**, n. 1, p. 1–20, 2011.
- 12- Júnior N. L. S. **Desafios da Bioprospecção no Brasil**. Ipea, Brasília 2011.
- 13- Lavika J., Deepti A. Avaliação do desempenho de celulases fúngicas com bagaço de canaprê-tratado com ácido diluído: Uma estratégia robusta de bioprospecção para enzimas de biocombustíveis. **Science Direct** 2017
- 14- Lelej, A. S.; STOROZHENKO, S. Y. Insect taxonomic diversity in the Russian far east. **Entomological Review**, vol. 90, n. 2, p. 372–386. 2010.
- 15- Matias E., Pimentel N. **Biotecnologia: um desafio para o Amazonas. Parcerias Estratégicas** 2005.
- 16- Milano H. S. **Identificação de microrganismos do trato digestivo de pragas de cana-de-açúcar com atividade enzimática para degradação de substratos lignocelulósicos e potencial de bioconversão de D-xilose em xilitol**. USP, 2012.
- 17- Montefusco E. L. B. Isolamento e potencial enzimático de fungos associados ao intestino de larvas de *Stenochironomus kieffer* (insecta: díptera: chironomidae). **Brazilian Journal of Development**, 2020.
- 18- Negreiros M. A. Avaliação de meios e condições de cultivo de fungos filamentosos amazônicos em um programa de triagem de antimicrobianos. **PPGCTRA – UFAM**, 2020.
- 19- Posada L. F. *et al.* Bioprospecção de bactérias aeróbias formadoras de endosporos com potencial biotecnológico para promoção do crescimento de bananeiras. **Science Direct**, 2016.

- 20- Priyanka A., Pandey A. Bioprospecção de bactérias que promovem o crescimento de plantas endofíticas isoladas do Himalaia (*Taxus wallichiana* Zucc.). **Instituto Nacional do Meio Ambiente do Himalaia**, 2020.
- 21- Reis C. S. **Fungos associados a besouros da ambrosia, *Euplatypus paralellus***. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2017.
- 22- Reyes-Castillo, P. Coleoptera, Passalidae: Morfologia y división en grandes grupos: géneros americanos. **Folia Entomológica Mexicana**, vol. 20, n. 22, p. 3–240, 1970.
- 23- Saccaro Júnior, Nilo L. **A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil**. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada: Brasília, 2011.
- 24- Santos R. R. C. – Influência do estresse físico-químico e biológico na produção de pigmentos por *Penicillium sclerotiorum*. **Universidade Federal do Amazonas**, 2018.
- 25- Shiela E. U. *et al.* Ferramentas de biologia sintética para bioprospecção de produtos naturais em eucariotos. **Science Direct**, 2014
- 26- Silveira, L. M. S.; *et al.* Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmácia, Brasil**, v. 90, n. 2, p. 124- 128, 2009.
- 27- Singh R. S., Thakur S. Antimicrobial activity and carbohydrate specificity of new mycelial lectins from *Fusarium sp.* **Institute of Molecular Biology**, Slovak Academy Science, 2014.
- 28- Souza G. F. L. Prospecção de leveduras fermentadoras de xilose do intestino de besouros (Insecta: coleóptera) de áreas de floresta amazônica em Itacoatiara-Am. **PPGCTRA – UFAM**, 2017.
- 29- Tayung K., Jha D. K. Antimicrobial endophytic fungal assemblages inhabiting bark of *Taxus baccata* L. of Indo-Burma mega biodiversity hotspot. **Indian Journal Microbiol** – 2010.
- 30- Ye J. *et al.* BLAST: improvements for better sequence analysis. Nucleic Acids Research, Oxford University Press, 2006.
- 31- ZAMBERLAN J. F. *et al.* **Produção e manejo agrícola: impactos e desafios para sustentabilidade ambiental. Eng. Sanit. Ambient. Edição especial** 2014.

CAPÍTULO II

Prospecção Química de compostos antifúngicos sintéticos como rota de Desenvolvimento Sustentável na Amazônia

RESUMO:

As rotas de produção biotecnológicas de origem sintéticas têm atraído olhares da comunidade científica como um modo sustentável de desenvolvimento tecnológico. É possível elucidar compostos com potenciais de ação biológica, trazendo a síntese de fármacos como um importante capítulo da química orgânica. Algumas vias biossintéticas do metabolismo de fungos podem ser atraentes como alvos para ação de fungicidas: cita-se a Acetolactato sintase (ALS) utilizando um inibidor de ALS Pyriithiobac, de modo a restringir a formação de alguns aminoácidos essenciais para a vida celular; e a 8-hidroxiquinolina com potencial de degradação de parede celular de fungos. Com a técnica de hibridização celular pôde-se elucidar análogos com 2 porções farmacofóricas responsáveis pelas atividades de ambas em uma única molécula. Os resultados mostraram-se promissores, apresentando atividade também contra espécies de bactérias testadas. Objetiva-se realizar a prospecção química de moléculas sintéticas com potencial antifúngico.

ABSTRACT

Biotechnological production routes of synthetic origin have attracted the attention of the scientific community as a sustainable way of technological development. It is possible to elucidate compounds with biological action potentials, bringing the synthesis of drugs as an important chapter of organic chemistry. Some biosynthetic pathways of fungal metabolism may be attractive as targets for fungicide action: Acetolactate synthase (ALS) is cited using an ALS inhibitor Pyriithiobac, in order to restrict the formation of some essential amino acids for cellular life; and 8-hydroxyquinoline with fungal cell wall degradation potential. With the cellular hybridization technique, it was possible to elucidate analogs with 2 pharmacophoric moieties responsible for the activities of both in a single molecule. The results were promising, also showing activity against species of bacteria tested. The objective is to carry out the chemical prospection of synthetic molecules with antifungal potential.

1.0 INTRODUÇÃO

Rotas de produção biotecnológicas sintéticas têm atraído olhares da comunidade científica como um modo sustentável de desenvolvimento tecnológico. Uma vez que são descobertas algumas moléculas com ótimos potenciais estudados, como ação microbiológica, por exemplo, ou a descoberta de rotas biossintéticas do microrganismo de interesse, pode-se propor uma fabricação sintética do composto ou sintetizar um composto que consiga desempenhar um perfil de ação sobre aquela via metabólica.

Segundo Pavão (2011), Felix Hoffmann (1868-1946) foi responsável pela síntese de aspirina em 1897, a partir da salicilina (composto extraído da casca de salgueiro). Esta síntese nasceu da necessidade de melhorar o emprego da salicilina, que possuía efeitos colaterais fortes como acidificação do estômago. Assim, historicamente, nota-se que a prospecção química para fins tecnológicos ou biotecnológicos vem sendo praticada há mais de 100 anos pela comunidade científica.

A síntese de fármacos é um importante capítulo para química orgânica e desenvolvimento sustentável, uma vez que permite a construção de moléculas em seus diversos níveis de complexidade. É necessário racionalizar uma sequência de etapas sintéticas visando obter os melhores rendimentos possíveis.

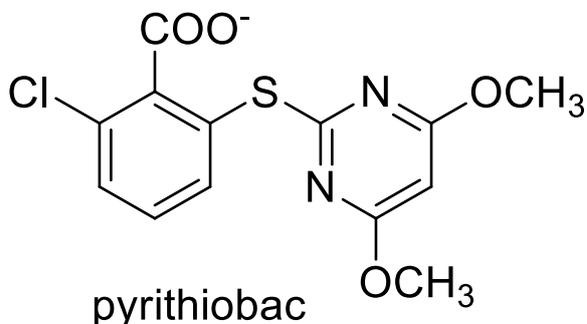
1.1 Acetolactato sintase (ALS) como alvo para desenvolvimento de novos fungicidas.

Algumas vias biossintéticas do metabolismo dos fungos podem ser atraentes como alvo para ação de fungicidas, uma vez que estão ausentes nos mamíferos, o que permite maiores chances de alcançar seletividade e minimizar riscos de toxicidade em humanos. Uma dessas vias é a biossíntese de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR), cuja primeira enzima envolvida é a ALS. Esta enzima catalisa a descarboxilação do piruvato e sua condensação com outra molécula de piruvato para produzir acetolactato e/ou 2-acetobutirato. Demonstrou-se que na ausência de ALS em *C. albicans* resultou na atenuação da sua virulência, além disso, compostos capazes de inibir a ALS apresentaram também relevante atividade antifúngica *in vitro* (Lee *et al.*, 2013; Wendisch, 2001;).

Além da atividade fungicida, alguns herbicidas foram desenvolvidos como inibidores de ALS e vêm sendo amplamente utilizados no controle de ervas daninhas de diversos cultivos, sendo conhecidos por serem seletivos, com boa atividade e baixa

toxicidade para animais (Tan *et al.*, 2006). Entre estes derivados encontra-se o *pyrithiobac* (Figura 1).

Figura 1: Estrutura do inibidor de ALS pyrithiobac.



Fonte: O autor.

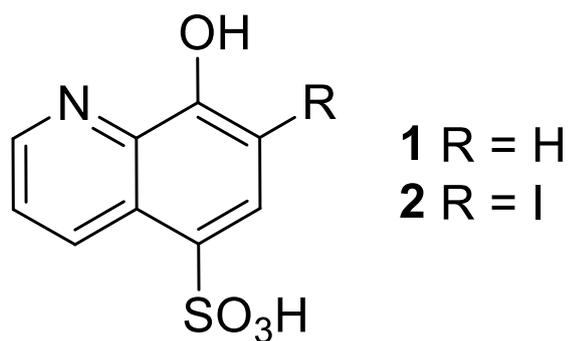
A estrutura cristalográfica de pyrithiobac, pertencente à classe dos pirimidinilbenzoatos, ligado a ALS foi determinada em 2017 por Garcia e colaboradores e o modo de ligação desse composto foi elucidado. No complexo, o anel pirimidina do pyrithiobac forma interações π -stacking no bolso de ligação da enzima. Além disso, o átomo de oxigênio do substituinte metoxila é capaz de interagir por ligação de hidrogênio com resíduo de aminoácido. Já o anel benzoato interage por interações π -stacking e hidrofóbicas com diversos resíduos de aminoácidos. Adicionalmente, o grupo carboxilato interage tanto por ligação iônica quanto por ligação de hidrogênio com a ALS (Garcia *et al.*, 2017).

Com o conhecimento e o maior entendimento dos modos de interação de pyrithiobac com a ALS, além dos resultados positivos já alcançados com compostos que possuem este padrão estrutural, esse derivado foi selecionado para compor a estratégia de obtenção de novos compostos fungicidas, inibidores de ALS.

1.2 8-Hidroxiquinolina e seus derivados como compostos fúngicos.

No âmbito de um programa de nucleação para identificação e obtenção de novos agentes antimicrobianos foram identificados os compostos derivados de 8-hidroxiquinolina como protótipos promissores para o desenvolvimento de agentes antifúngicos; dentre eles se encontram o ácido 8-hidroxi-5-quinolinilsulfônico (1) e o ácido 7-iodo-8-hidroxi-5-quinolinilsulfônico (2) (Figura 2).

Figura 2: Estrutura dos derivados de 8-hidroxiquinolinas 1 e 2.



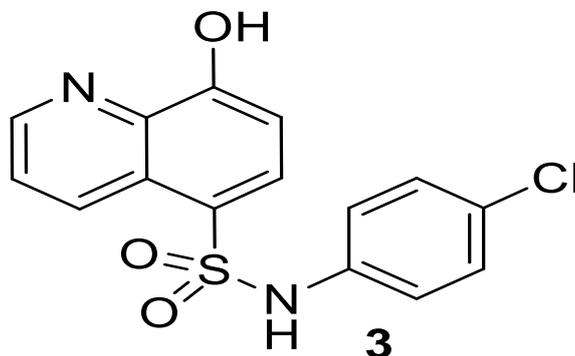
Fonte: O autor.

Os derivados **1** e **2** foram avaliados contra isolados patogênicos e multirresistentes de várias espécies fúngicas *in vitro*, apresentando concentrações inibitórias mínimas (MIC) relevantes, além de baixa toxicidade dermatológica, (Pippi *et al.*, 2017).

Otimizações subsequentes realizadas na estrutura de **1** e **2** levou à obtenção da série de derivados sulfonamidas (**Figura 3**), que também foi avaliada *in vitro* quanto a sua atividade contra seis diferentes espécies de fungos do gênero *Candida* e quatro espécies de fungos dermatófitos. O composto 8-hidroxi-*N*-(4-clorofenil)-5-quinolinassulfonamida (**3**) apresentou atividade substancial contra todas as espécies avaliadas, com valores de MIC entre 1-4 μM (dados não publicados).

Os resultados obtidos nessas avaliações comprovaram o grande potencial dessa classe para o desenvolvimento de novos análogos como candidatos a agentes antifúngicos (Andrade *et al.*, 2017). Em uma tese de doutorado, ficou demonstrado que a ação antifúngica destes compostos está associada a danos na parede celular fúngica e a inibição de formação de pseudo-hifas (dados não publicados)

Figura 3: Estrutura do derivado de 8-hidroxiquinolina 3.



Fonte: O autor.

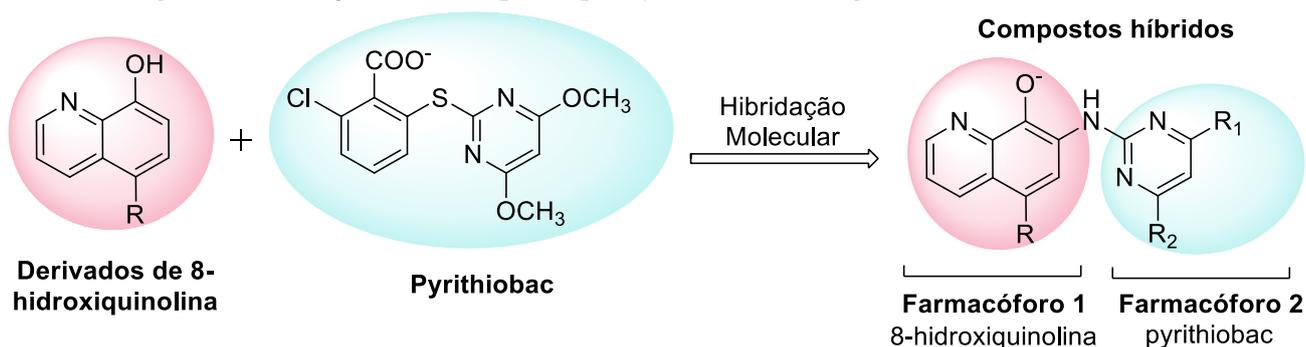
1.3 Prospecção de produtos sintéticos antifúngicos como estratégia de descoberta de fármacos.

Para o planejamento destes novos análogos, utilizou-se como base uma estratégia de química medicinal, relativamente recente, denominada hibridação molecular. Essa estratégia se baseia na combinação de duas ou mais porções farmacofóricas, de diferentes substâncias bioativas, para gerar um novo composto híbrido, apresentando melhores características de afinidade e eficácia comparado aos protótipos (Viegas-Júnior *et al.*, 2007). Com base nos conhecimentos expostos, hipotetizamos ou presumimos que esta estratégia resultará em compostos que sejam mais efetivos que os fármacos atualmente disponíveis. Além disso, essa estratégia pode resultar em substâncias com modo de ação dual (*multitarget*) levando a efeitos adversos reduzidos e menor propensão a desenvolvimento de resistência.

Considerando a classe das 8-hidroxiquinolinas uma das porções farmacofóricas, e o pyrithiobac a segunda porção farmacofórica do composto híbrido, a estrutura dos novos derivados planejados é mostrada na **Figura 4**. Nesta estratégia, é proposta a substituição do anel benzoato do pyrithiobac pelo fenolato de 8-hidroxiquinolina. É importante ressaltar que o grupo carboxilato seria substituído pelo grupo fenolato, mantendo a possibilidade de interação iônica e por ligação de hidrogênio com a enzima. Adicionalmente, propõe-se a substituição do átomo de enxofre entre os anéis por nitrogênio, uma vez que esse último heteroátomo permitiria uma interação adicional com a enzima por ligação de hidrogênio. Finalmente,

concluindo nossa abordagem, a presença do anel pirimidinil é mantida, já que esse grupo se mostrou bastante relevante para a ancoragem do inibidor na enzima, como demonstrado na análise da estrutura cristalográfica de ALS (Garcia *et al.*, 2017). Os grupamentos R₁ e R₂ serão variados gerando uma maior diversidade de compostos que serão avaliados por modelagem molecular quanto à afinidade de ligação com a enzima alvo.

Figura 4: Estrutura geral dos derivados de 8-hidroxiquinolina, inibidor pyriithiobac e estratégia de hibridização molecular para o planejamento dos análogos híbridos.



Fonte: O autor.

2.0 OBJETIVO

Objetivo Geral: Realizar a prospecção química com moléculas sintéticas hibridizadas com potencial antifúngico

Objetivos Específicos

- i: Avaliar a atividade antifúngica das moléculas sintéticas
- ii: Avaliar a atividade antibacteriana das moléculas sintéticas

3.0 METODOLOGIA

3.1 Preparo das amostras de compostos sintéticos.

Os compostos sintéticos possuem características apolares, portanto sua solubilização deverá ocorrer em meio mais apolar. Por esta razão, uma solução de Dimetilsulfóxido (DMSO) a 80% foi criada para solubilizar todos os 19 (dezenove) compostos sintéticos. Os compostos sintéticos foram solubilizados em 4,5 mL de solução DMSO 80%. Entretanto, para utilização em testes antimicrobianos a concentração de DMSO deve ser, de no máximo, na faixa dos 10%; para que erros de leitura não ocorram. Realizou-se a diluição, da qual se separou 1,0 mL da dissolução em 80% e diluiu-se em outros 3mL de água destilada estéril, 1:4. Desta forma a solução

estoque estaria na concentração de 20% e pronta para utilização no teste de Concentração Inibitória Mínima (MIC).

3.2 Cálculo das concentrações das soluções estoque de compostos sintéticos.

Cada amostra tem uma quantidade específica a qual estava disponibilizada para realização de testes (conforme tabela na seção de resultados). Após dissolução em 4,5mL de DMSO 80% obteve-se uma concentração medida em mg/mL. Esta mesma concentração foi recalculada para a proporção de 1:4; conforme diluição subsequente realizada na amostra, para que chegasse a 20% de DMSO. Com aplicação de 100 µL no poço 1 da placa utilizada no teste MIC, com a presença de outros 100 µL de meio de cultura líquida, a concentração do composto é novamente dividida na proporção 1:2 chegando ao teste uma amostra diluída em uma solução de 10% de DMSO. O valor aproximado de todas as amostras foi calculado individualmente, conforme diluição seriada realizada no teste MIC.

3.3 Concentração Inibitória Mínima (MIC) de extratos e compostos sintéticos.

A concentração inibitória mínima (MIC) das moléculas sintéticas foi realizada usando a técnica de microdiluição, utilizando microplacas de 96 (noventa e seis) poços estéreis. Para a atividade antibacteriana e antifúngica, foi distribuído 100µL da solução teste nas concentrações individuais descritas na Tabela 3, no poço 1 e nos poços subsequentes, por meio de diluição seriada. O processo de diluição seriada seguiu por 7 (sete) vezes, sendo homogeneizado e transferido 100 µL para o próximo poço, assim sucessivamente; resultando nas concentrações mínimas em fatores de diluição 1/128. A droga controle Cloranfenicol 2mg/mL, foi aplicada a todos os poços de controle positivo de bactérias, assim como Metanol PA para controle positivo de fungos. O controle negativo tinha solução de DMSO 2%. As microplacas foram encubadas por 24 horas a 35 °C e, após esse período, foi adicionado em cada poço 20µL de reagente Resazurina (0,15mg/mL), que indica crescimento microbiano quando muda a coloração de azul para rosa (RISS *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2013;). Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cálculo das concentrações das soluções estoque de compostos sintéticos

O Quadro 1, a seguir, mostra os resultados durante o processo de preparo da amostra até a concentração inicial (poço 1) que seria utilizado no teste MIC.

Quadro 1: Concentrações das amostras durante o processo de preparo da amostra até a aplicação no poço 1 da placa do MIC.

Código da amostra	Peso amostral	[] na solução estoque (4,5 mL DMSO 80%)	[] na solução teste (4 mL DMSO 20%)	[] no 1º poço (200µL DMSO 10%)
PH 302	0,8mg	0,178 mg/mL	44,5 mg/mL	22,25 mg/mL
PH 308	0,8mg	0,178 mg/mL	44,5 mg/mL	22,25 mg/mL
PH 180 ¹	1,0mg	0,222 mg/mL	55,5 mg/mL	27,75 mg/mL
PH 160	1,9mg	0,422 mg/mL	105,5 mg/mL	52,75 mg/mL
PH 307	2,3mg	0,511 mg/mL	127,75 mg/mL	63,875 mg/mL
PH 154	1,3mg	0,289 mg/mL	72,25 mg/mL	36,11 mg/mL
PH 153	2,2mg	0,499 mg/mL	124,75 mg/mL	62,375 mg/mL
PH 304	1,6mg	0,356 mg/mL	89 mg/mL	44,5 mg/mL
PH 155	2,1mg	0,467 mg/mL	116,5 mg/mL	58,25 mg/mL
PH 152	1,3mg	0,289 mg/mL	72,25 mg/mL	36,125 mg/mL
PH 151	2,6mg	0,578 mg/mL	146,75 mg/mL	73,375 mg/mL
PH 303	1,7mg	0,387 mg/mL	96,75 mg/mL	48,375 mg/mL
PH 180	0,8mg	0,178 mg/mL	44,5 mg/mL	22,25 mg/mL
PH 161	1,5mg	0,333 mg/mL	83,25 mg/mL	41,625 mg/mL
PH 156	1,2mg	0,267 mg/mL	66,75 mg/mL	33,375 mg/mL
PH 179	1,8mg	0,400 mg/mL	100 mg/mL	50 mg/mL

Fonte: O autor.

4.2 Concentração inibitória mínima (MIC)

O Quadro 2 apresenta a relação das amostras testadas em função dos microrganismos que foram utilizados para o teste bem como o valor da concentração aproximada mínima que proporcionou atividade antifúngica e antibacteriana desses compostos.

Quadro 2: Valores aproximados das concentrações das amostras de compostos sintéticos testados no MIC.

Código	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>
PH 302	-	22,25 mg/mL	-	22,25 mg/mL	22,25 mg/mL
PH 308	-	-	-	-	11,125 mg/mL
PH 180 ¹	27,75 mg/mL	-	27,75 mg/mL	22,75 mg/mL	27,75 mg/mL
PH 160	52,75 mg/mL	52,75 mg/mL	52,75 mg/mL	52,75 mg/mL	412 µg/mL
PH 307	31,94 mg/mL	63,87 mg/mL	15,96 mg/mL	31,94 mg/mL	998 µg/mL
PH 154	18,06 mg/mL	18,06 mg/mL	18,06 mg/mL	36,125 mg/mL	564 µg/mL
PH 153	15,59 mg/mL	15,59 mg/mL	15,59 mg/mL	31,188 mg/mL	975 µg/mL
PH 304	44,5 mg/mL	44,5 mg/mL	11,125mg/mL	22,25 mg/mL	695 µg/mL
PH 155	14,59 mg/mL	29,187mg/mL	29,187mg/mL	3,648 mg/mL	912 µg/mL
PH 152	18,06 mg/mL	18,06	36,125mg/mL	1,129 mg/mL	4,515 mg/mL
PH 151	18,34 mg/mL	18,34 mg/mL	9,171 mg/mL	2,292 mg/mL	2,292 mg/mL
PH 303	-	-	-	1,512 mg/mL	6,046 mg/mL
PH 180	-	22,25 mg/mL	22,25 mg/mL	347 µg/mL	1,39 mg/mL

PH 161	41,625 mg/mL	41,625mg/mL	41,625mg/mL	325 µg/mL	2,601 mg/mL
PH 156	33,375 mg/mL	-	33,375mg/mL	261 µg/mL	4,172 mg/mL
PH 179	50 mg/mL	25 mg/mL	50 mg/mL	391 µg/mL	3,125 mg/mL

Fonte: O autor.

A seguir, temos o Quadro 3 apresentando a relação das amostras testadas em função dos microrganismos que foram utilizados para o teste, em valores de títulos.

Quadro 3: Valores expressos em títulos de diluição das amostras de compostos sintéticos testados no MIC.

Código	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>
PH 302	-	1:2	-	1:2	1:2
PH 308	-	-	-	-	1:4
PH 180 ¹	1:2	-	1:2	1:2	1:2
PH 160	1:2	1:2	1:2	1:2	1:256
PH 307	1:4	1:2	1:8	1:4	1:128
PH 154	1:4	1:4	1:4	1:2	1:128
PH 153	1:8	1:8	1:8	1:4	1:128
PH 304	1:2	1:2	1:8	1:4	1:128
PH 155	1:8	1:4	1:4	1:32	1:128
PH 152	1:4	1:4	1:2	1:64	1:16
PH 151	1:8	1:8	1:16	1:64	1:64
PH 303	-	-	-	1:64	1:16
PH 180	-	1:2	1:2	1:128	1:32
PH 161	1:2	1:2	1:2	1:256	1:32
PH 156	1:2	-	1:2	1:256	1:16
PH 179	1:2	1:4	1:2	1:256	1:32

Fonte: O autor.

Os valores foram calculados de acordo com a concentração inicial para o teste de cada amostra, conforme Quadro 2 e seu respectivo título de diluição, ou fator de diluição.

Para a Prospecção Química utilizou-se inicialmente o método de Concentração Inibitória Mínima (MIC), para análise da possível atividade antifúngica descrita na literatura em função da concentração de inibição de crescimento mínimo. Algumas observações sugeriam que o mecanismo de ação desses compostos sintéticos poderia atuar sobre o crescimento ou multiplicação de bactérias e, portanto, tendo ação antibacteriana. Neste sentido, adotou-se também o uso de cepas bacterianas. Os valores das concentrações foram medidos em valores de títulos e tendo como base a concentração inicial, foram calculadas todas as concentrações inibitórias mínimas.

Esses compostos foram hibridizados para que juntos possuíssem duplas ações, melhorando a performance da atividade antifúngica. A parte da molécula inibidora da Acetolactato Sintase (ALS) faz com que as proteínas fúngicas e microbianas não consigam se formar, pois há comprometimento na formação de aminoácidos ramificados. A enzima Acetolactato Sintase (ALS), também chamada Acetohidroxitobutirato Sintase (AHAS), é a primeira enzima da rota de síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada: valina, leucina e isoleucina. (Vidal 2002).

Pelo fato de que esta enzima pode ser encontrada em plantas, fungos e bactérias, todos que forem submetidos ao tratamento destes compostos poderão estar susceptíveis à ação proveniente deste mecanismo de inibição. Portanto, é correto afirmar que parte da atividade antibacteriana encontrada nestes compostos advém deste mecanismo de inibição, que os análogos obtiveram após ensaio, uma vez que a atividade da outra parte da molécula hibridizada está mais relacionada a danos na parede celular.

A parte da molécula destruidora de parede celular advém dos análogos de 8-hidroxiquinolina. Segundo Silva (2019), que produziu primeiramente através da síntese descrita no trabalho, os derivados que posteriormente foram hibridizados, os derivados de 8-hidroxiquinolinas possuem uma capacidade de quelar metais. Para descoberta de mecanismos de ação a autora testou algumas técnicas, que ainda assim, não se observou claramente o mecanismo de ação desses derivados, porém a atividade antifúngica através de danos à parede celular foi observada.

Os resultados mostram leve eficiência destes compostos contra bactérias e alta eficiência contra fungos, pois com sua dupla ação antimicrobiana os análogos puderam, *in vitro*, impedir seu crescimento e multiplicação.

5.0 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram a eficiência da prática da Química Sintética em desenvolver compostos que possuem atividades biológicas bem específicas sem a necessidade da busca implacável e destruidora dos recursos naturais. Com alta eficiência na inibição do crescimento de espécies fúngicas e potencial antimicrobiano também observado neste estudo, com dosagens bem baixas, esta classe de compostos dá um salto de importância e relevância ainda maior na pesquisa por compostos antimicrobianos. Neste sentido, tem-se a necessidade da realização de mais testes adicionais para análise de outras categorias de informações sobre estes compostos,

como o seu comportamento físico-químico em organismos de alta complexidade metabólica, uma vez que mostraram-se bastante promissores.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Andrade, S. F. et al. **Sulfonamidas derivadas de 8-hidroxiquinolina, processo de síntese, composição farmacêutica e uso**. INPI, BR 10 2017 014674 0.
- 2- Pavão A. S. **Medicamentos sintéticos: substâncias químicas milagrosas a serviço da saúde humana**. Rio Claro, SP, 2011.
- 3- Garcia, M. D. et al. **Comprehensive understanding of acetohydroxyacid synthase inhibition by different herbicide families**. PNAS, E1091-E1100, 2017.
- 4- Lee, Y.-T. et al. Sulfonylureas Have Antifungal Activity and Are Potent Inhibitors of *Candida albicans* Acetohydroxyacid Synthase. **J. Med. Chem.**, 56, 210-219, 2013.
- 5- Oliveira, T. L.: LIMA, *et.al.* Atividade Antifúngica de Extratos Isolados de *Streptomyces* spp. Obtidos em Solos Paraibanos Contra Leveduras do Gênero *Candida* spp. Biofar, **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 9, n. 1, p. 51-58, 2013.
- 6- Pippi, B. et al. Evaluation of 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Hits for Antifungal Drug Design. **Medical Mycology**, 00, 1–11, 2017.
- 7- Riss, T. L.; *et. al.* **Cell Viability Assays. 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al., editors. Assay**
- 8- Silva N. M. Determinação da atividade antifúngica e mecanismo de ação de derivados de 8-hidroxiquinolina sobre diferentes gêneros de leveduras e fungos filamentosos. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2019.
- 9- Vidal R. A., Winkler L. M. Resistência de plantas daninhas: seleção ou indução à mutação pelos herbicidas inibidores de acetolactato sintase (ALS). **Pesticidas R. Ecotoxicol e Meio Ambiente, Curitiba**, 2002.
- 10- Viegas-Júnior, C. et al. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. **Curr. Med. Chem.**, 14, 1829-1852, 2007.
- 11- Wendisch, V. F. **Amino Acid Biosynthesis – Pathways, Regulation and Metabolic Engineering**. Ed. Springer, vol. 5, p. 129, Alemanha, 2001.

CAPÍTULO III

Revisão Estruturada através de Mapeamento Sistemático sobre o Cenário da Bioprospecção na Amazônia

Mapeamento Sistemático das produções sobre bioprospecção na Amazônia entre o período de 2010-2020

Systematic mapping of productions on bioprospecting in the Amazon between the period 2010-2020

Mapeo sistemático de producciones sobre bioprospección en la Amazonía entre el período 2010-2020

Recebido: 17/03/2022 | Revisado: 25/03/2022 | Aceito: 02/04/2022 | Publicado: 09/04/2022

João Lucas da Silva Rufino

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

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: jjoao_lucas2018@outlook.com

Maxwel Adriano Abegg

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

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: maxabegg@ufam.edu.br

Resumo

A Amazônia possui um potencial grande quando se observa o contexto da Sustentabilidade. Muito desta propensão ao Desenvolvimento Sustentável advém da grande parcela de biodiversidade que compreende este espaço Amazônico. Neste sentido acaba sendo perceptível a necessidade de haver pesquisas científicas voltadas para exploração sustentável dos recursos naturais amazônicos. Nesta revisão estruturada objetivou-se analisar os dados de artigos científicos para responder ao questionamento “Qual o cenário da bioprospecção no Contexto Amazônico?”. Aplicou-se a técnica PICo para organização das strings de busca, Snowballing para busca de estudos secundários e Grounded Theory de Strauss para análise dos resultados e geração indutiva de teoria dentro de um recorte temporal de 10 anos, entre os anos de 2010 e 2020. Os resultados desta Revisão indicam um cenário, aparentemente, ainda pouco explorado em relação a temática Bioprospecção na Amazônia, bem como a Bioprospecção de Fungos Amazônicos. Observa-se um cenário desafiador e uma percepção de que questões que envolvem o tema “sustentabilidade” estão pouco difundidas entre as interdisciplinaridades das áreas que compõem as Ciências Ambientais.

Palavras-chave: Bioprospecção; Amazônia; Fungos.

Abstract

The Amazon has great potential when looking at the context of Sustainability. Much of this propensity for Sustainable Development comes from the large portion of biodiversity that comprises this Amazonian space. In this sense, the need for scientific research aimed at sustainable exploitation of Amazonian natural resources ends up being perceptible. This structured review aimed to analyze data from scientific articles to answer the question “What is the scenario of bioprospecting in the Amazon Context?”. The PICo technique was applied to organize the search strings, snowballing to search for secondary studies and Strauss's Grounded Theory to analyze the results and inductive theory generation within a time frame of 10 years, between 2010 and 2020. The results of this Review indicate a scenario, apparently, still little explored in relation to the theme Bioprospection in the Amazon, as well as the Bioprospection of Amazonian Fungi. There is a challenging scenario and a perception that issues involving the theme "sustainability" are not widespread among the interdisciplinarity of the areas that make up Environmental Sciences.

Keywords: Bioprospecting; Amazon; Fungi.

Resumen

La Amazonía tiene un gran potencial cuando se mira en el contexto de la Sostenibilidad. Gran parte de esta propensión al Desarrollo Sostenible proviene de la gran porción de biodiversidad que comprende este espacio amazónico. En este sentido, termina siendo perceptible la necesidad de investigaciones científicas orientadas a la explotación sostenible de los recursos naturales amazónicos. Esta revisión estructurada tuvo como objetivo analizar datos de artículos científicos para responder a la pregunta “¿Cuál es el escenario de la bioprospección en el contexto amazónico?”. Se aplicó la técnica PICo para organizar las cadenas de búsqueda, Snowballing para buscar estudios secundarios y Grounded Theory de Strauss para analizar los resultados y generación de teoría inductiva en un marco temporal de 10 años, entre 2010 y 2020. Los resultados de esta Revisión indican un escenario, al parecer, aún poco explorado en relación al tema Bioprospección en la Amazonía, así como la Bioprospección de Hongos Amazónicos. Hay un escenario desafiante y una percepción de que las cuestiones que involucran el tema "sostenibilidad" no están muy difundidas entre las interdisciplinariedades de las áreas que componen las Ciencias Ambientales.

Palabras clave: Bioprospección; Amazonia; Hongos.

1. Introdução

A diversidade biológica e variação genética, diferença entre ecossistemas que abrigam diferentes espécies, compreendem a biodiversidade. A atividade exploratória humana tem diminuído rapidamente a biodiversidade mundial, portanto a preocupação com este recurso natural é crescente. O Brasil faz parte de uma importante frente neste cenário, uma vez que é detentor da maior parte de biodiversidade do mundo. Os seres vivos possuem um papel importante com os serviços ambientais, tais como: regulação climática, ciclagem de nutrientes, polinização, formação de solos, fornecimento de água, entre outros cujo valor financeiro entraria na ordem de centenas de trilhões de dólares ao ano (Balmford *et al.*, 2002; Constanza *et al.*, 1997;).

O desmatamento é uma prática muito comum para a realização da agropecuária, e a retirada da cobertura vegetal provoca a redução da biodiversidade, extinção de espécies animais e vegetais, desertificação, erosão, redução dos nutrientes do solo; contribuindo para o aquecimento global, entre outros danos (Zamberlan., 2014). Agregar valor para regiões com florestas em pé, pode ser uma alternativa mais efetiva de proteção do bioma Amazônico.

Uma das maneiras de extrair valor econômico da biodiversidade é a bioprospecção, 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).

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 relação Amazônia e Desenvolvimento Sustentável é mais estreita do que se pode imaginar. O berço da biodiversidade possui características ímpares que levam a muitas possibilidades de exploração sem a necessidade de comprometer o ecossistema. Valois A. C. C., 2003, através da Embrapa já dizia à época que:

haveriam amplas possibilidades de utilização sustentável da Amazônia, considerando o ordenamento territorial perante os inúmeros ecossistemas existentes da região. Apresenta-se uma visão geral sobre os limites geográficos da Amazônia Legal, suas condições climáticas, edáficas e de vegetação, além de enfatizar a importância do zoneamento agroecológico. Considera-se os recursos genéticos da vasta biodiversidade, agricultura, exploração florestal, pecuária e transferência e adoção de tecnologia com fulcros de desenvolvimento regional, levando em conta os diversos nichos ecológicos da Amazônia.

Desta forma, pesquisas direcionadas a exploração dos recursos naturais, sem comprometê-los, no contexto Amazônico são interessantes, neste cenário. Neste sentido, observa-se a necessidade de contemplar esses dados observacionais para avaliarmos este cenário. Dentro desta pesquisa, o necessário seria observar os trabalhos publicados relacionados a Bioprospecção em um contexto Amazônico.

Para melhor resposta desta questão adotou-se a técnica de Mapeamento Sistemático da Literatura, que é descrita por Dermeval D. *et al* 2017 como uma ferramenta que pode ser utilizada quando não é necessário responder com profundidade questões específicas, mas sim uma visão geral mais ampla de determinada área. Pode-se utilizar quando há poucas evidências do tópico de pesquisa disponíveis.

Para análise de dados utilizou-se a técnica de Teoria Fundamentada em Dados (TFD) (Stol; Ralph., *et al* 2016), que visa trazer a compreensão das experiências e interações de pessoas inseridas em um determinado contexto social, buscando evidenciar estratégias desenvolvidas diante de situações vivenciadas.

Este trabalho tem como objetivo analisar o cenário da Bioprospecção dentro do Contexto Amazônico. Por conseguinte, a seguinte questão de pesquisa definida neste trabalho é:

“Como está o cenário da Bioprospecção no Contexto Amazônico?”

Esta questão permite analisar o cenário de pesquisas sobre Bioprospecção de Recursos Amazônicos com o propósito de caracterizá-lo quanto a origem da pesquisa (motivação), materiais biológicos utilizados, quanto a utilização de conhecimento popular de povos tradicionais da Amazônia bem como as oportunidades e desafios da execução da bioprospecção do ponto de vista dos pesquisadores de Ciências Ambientais dentro das publicações disponíveis na literatura técnica.

A questão principal desta pesquisa está dividida em duas partes, podendo assim permitir o melhor entendimento sobre o objetivo desta busca sistemática.

Q1: “Como está o cenário da Bioprospecção no Contexto Amazônico?”

Q2: Como está o cenário da bioprospecção com fungos Amazônicos?”

2. Metodologia

2.1 Estratégia de Busca

Para proceder a identificação dos artigos disponíveis na literatura técnica, conduziu-se o estudo procurando artigos primários que mostrem os desafios enfrentados pelos pesquisadores dentro do cenário da Bioprospecção no Contexto Amazônico.

Para além disso, utilizou-se o PICO (Santos., *et al*, 2007), adaptado para esta pesquisa, para organizar as *strings* de pesquisa. Esta *string* de pesquisa está disponível no Quadro 1. As plataformas Capes, Scielo, Google Acadêmico e Pubmed foram utilizadas como máquinas de busca.

Quadro 1 - String de Busca.

String	
P	Ciências Ambientais
I	Bioprospecção, Microbiologia, Amazônia
C	Não aplicado
O	Não Aplicado

Fonte: Autores.

2.2 Primeiro procedimento de seleção

Um pesquisador deverá realizar o seguinte procedimento de seleção:

1 Executar a *string* de pesquisa

2 Aplicar os critérios de inclusão com base no título do artigo

3 Aplicar os critérios de inclusão com base no resumo do artigo

4 Aplicar os critérios de inclusão com base no Texto Completo do Artigo, e; Depois de terminar a seleção da Scopus, use os artigos incluídos definidos para:

5 Aplicação da Técnica de *Snowballing* (Baldin; Munhoz., 2011) (*backward* e *forward*) nas listas de referências do conjunto final de artigos selecionados. *Snowballing* é um método de pesquisa para estudos secundários, que usam uma lista de referências de trabalhos ou citações como entrada.

a. Aplicar os critérios de inclusão com base no título do artigo

b. Aplicar os critérios de inclusão com base no resumo do artigo

c. Aplicar os critérios de inclusão com base no Texto Completo do Artigo

2.3 Critérios de inclusão

- 1 O Artigo deve estar no contexto de Ciências Ambientais
- 2 O artigo deve relatar um estudo primário ou secundário
- 3 O Artigo deve relatar um estudo baseado em evidências fundamentado em métodos empíricos (experimentações, estudos de casos, etc).
- 4 O Artigo deve fornecer dados suficientes para responder ao menos uma das perguntas norteadoras deste estudo.
- 5 Serão considerados somente Artigos escritos nos idiomas inglês e em português.
- 6 Os artigos selecionados estão dentro do recorte temporal de 10 anos (2010 – 2020)
- 7 As palavras chaves para pesquisa serão: Bioprospecção, Amazônia e Fungos.

2.4 Critérios de exclusão

- 1 Publicações Duplicadas/autoplágio;
- 2 Cadastro de anais/pôsteres; e
- 3 Artigos não revisados por pares

2.5 Segundo procedimento de seleção

Após finalizar a leitura dos títulos, resumo e texto completo de cada artigo selecionado e avaliá-lo de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. Dois leitores avaliarão cada estudo. O critério de aceitação dar-se-á da seguinte forma:

- 1 Todos os leitores aceitam os artigos: o estudo estará incluído.
- 2 Um leitor aceita o artigo e o outro exclui: o estudo é excluído.
- 3 Se um leitor está em dúvida sobre o artigo e ele aceita: o estudo é discutido.
- 4 Se um leitor está em dúvida sobre o artigo e o outro exclui: o estudo é excluído.
- 5 Todos os leitores excluem o artigo: o estudo é excluído.

2.6 Procedimento de extração e análise

Neste Protocolo, as informações foram retiradas dos artigos e então analisadas baseada no método de Teoria Fundamentada nos Dados (TFD) de Strauss, ou *Grounded Theory (GT)* (Stol; Ralph., *et al*, 2016). O objetivo desta técnica é a geração indutiva de teoria através de testes ou validação de teoria existente (dados), tornando-se adequado para investigar questões como “o que está acontecendo por aqui?”. Neste sentido, corrobora-se com as questões norteadoras para este estudo, que se objetiva analisar o cenário da bioprospecção na Amazônia bem como da bioprospecção de fungos amazônicos.

Neste Protocolo, as coletas e análises de dados deram-se de forma simultânea, para investigação profunda e seleção das publicações que compor-se-iam este protocolo através de uma codificação inicial. Seguiu-se para uma codificação focalizada, onde esses dados foram avaliados para a melhor percepção e seleção dos dados mais importantes para esta pesquisa. Como terceira etapa de codificação de dados, realizou-se a codificação axial, para entendimento e estabelecimento da relação entre os dados dos códigos extraídos dos trabalhos pesquisados. Por fim, uma codificação teórica em que há relação dos dados obtidos e integração à teoria elaborada e coesa. O quadro 2 mostra os dados que serão extraídos dos artigos selecionados.

Quadro 2 – Formulário de Extração.

Título	<i>Título do artigo</i>
Abstract	Abstract do artigo
Fonte de publicação	Conferência, jornal ou simpósio em que o artigo foi publicado
Ano	Ano da publicação do artigo
Tipo de estudo	Estudo primário ou secundário identificado no artigo
Contexto	Tipo de evidência
Cenário no contexto amazônico	Descreve os desafios da prática de execução da Bioprospecção no Contexto Amazônico
Cenário com a utilização de fungos	Descreve a utilização de fungos amazônicos para este tipo de estudo

Fonte: Autores.

2.7 Procedimento de síntese

Neste Protocolo, o formulário de extração (Quadro 2) fornece uma forma sintetizada de representar os dados extraídos.

3. Resultados e Discussão

Os resumos dos resultados obtidos estão descritos nos Quadros 3 e 4, respectivamente.

Quadro 3 - Passo a passo da execução dos Strings de busca.

Atividade	Data de Execução	Resultados	Número de artigos selecionados
Primeira rodada (Título, Proceedings, duplicatas, etc)	25/10/2021	305 artigos	305 artigos
Segunda rodada (Título)	25/10/2021	305 artigos	15 artigos
Terceira rodada (abstract)	10/11/2021	15 artigos	10 artigos
Quarta rodada (leitura cheia)	14/12/2021	10 artigos	8 artigos
Rodada Snowballing	16/12/2021	0 artigos	0 artigos
Total		305	8

Fonte: Autores.

Quadro 4 - Conjunto final de artigos.

Id	Title	Year	Source
1	Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: An assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induced by <i>Bothrops jararaca</i> venom.	2015	Capes
2	<i>Connarus favosus</i> Planch: An inhibitor of the hemorrhagic activity of <i>Bothrops atrox</i> venom and potential antioxidant and antibacterial agent	2016	Capes
3	Standardization and anti-inflammatory activity of aqueous extract of <i>Psittacanthus plagiophyllus</i> Eichl (Loranthaceae)	2017	Capes
4	The potential of aqueous extracts of <i>Bellucia dichotoma</i> Cogn. (Melastomataceae) to inhibit the biological activities of <i>Bothrops atrox</i> venom: A comparasion of specimens collected in the states of Pará and Amazonas, Brazil.	2017	Capes
5	Assessment of the anti-snakebite properties of extracts of <i>Aniba fragans</i> Ducke (Lauraceae) used in folk medicine as complementary treatment in cases of envenomation by <i>Bothrops atrox</i>	2018	Capes
6	Production of thermostable B-glucosidase and CMCase by <i>Penicillium</i> sp. LM101 isolated from the Amazon region	2018	Scopus
7	Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production	2014	Scopus
8	Cultivable cellulolytic fungi isolated from the gut of Amazonian aquatic insects	2020	Scopus

Fonte: Autores.

Os resultados desta Revisão indicam um cenário, aparentemente, ainda pouco explorado em relação a temática Bioprospecção na Amazônia, bem como a Bioprospecção de Fungos Amazônicos. Este fato, possivelmente deve-se a recente preocupação com este tema de pesquisa, bem como com o fato de que muitos cientistas brasileiros pesquisam, entretanto não

publicam seus trabalhos de Bioprospecção em revistas científicas revisados por pares, o que acaba entrando em contraste com o cenário brasileiro, pois este país, de dimensões continentais, é reservatório da maior fatia de biodiversidade do planeta. Pode-se inferir também ao baixo investimento de capital financeiro em pesquisas desta natureza, com recentes cortes orçamentários para pesquisa, que corroboram para a não exploração sustentável de produtos de origem biológica. Também pode-se inferir que o tema “bioprospecção” ainda não está bem difundido entre as diversas áreas que compõem as Ciências Ambientais, diminuindo o alcance que este tema poderia ter, dentro de pesquisas, fazendo com que menos pesquisadores adotem estes métodos como estratégia de exploração sustentável. No Gráfico 1, pode-se observar com os resultados obtidos a mostra de trabalhos ao longo dos últimos 10 anos publicados sobre Bioprospecção na Amazônia e Bioprospecção de Fungos Amazônicos.

Gráfico 1 - Artigos por ano.



Fonte: Autores.

3.1 Resumo dos Resultados.

A bioprospecção é um processo de busca sistemática em um organismo, seja ele de origem vegetal, fúngica, microbiana ou animal, que é composta por várias etapas, muitas vezes descritas em trabalhos acadêmicos, sem se referenciar diretamente ao termo “bioprospecção”. Tendo em vista este sentido, mesmo tratando-se de um conjunto de etapas, pode-se inferir o tema quando a análise de algumas etapas deste processo for realizada.

Nesta seção, apresentam-se os principais resultados obtidos a partir dos artigos selecionados respondendo às questões de pesquisa. Realizou-se uma análise dos dados por método de teoria fundamentada em dados (GT).

Q1: Como está o cenário da Bioprospecção no Contexto Amazônico?

Em um cenário regado a conhecimento popular, habitado por populações tradicionais, conhecidos como povos da Amazônia, cercada por florestas e muitas espécies vegetais e animais, somado às grandes distâncias e dificuldades logísticas, levam a Região Amazônica como celeiro para descobertas de substâncias com potenciais biotecnológicos, muitas vezes sendo base para estudos que utilizem conhecimento popular como ponto de partida. Neste sentido observa-se que 5 dos 8 estudos selecionados durante as etapas de buscas partem do princípio do uso dos recursos naturais por povos tradicionais da Amazônia.

A picada de cobra é um evento comum na Região Amazônica, entretanto seu tratamento torna-se dificultoso devido às condições logísticas da região, tanto para a vítima desta fatalidade, quanto para inserção dos antídotos nos sistemas de saúde; há de se salientar também a subnotificação dos casos. Tendo em vista o não acesso aos tratamentos com antídotos pacientes passam a se tratar em casa através do conhecimento popular com uso de plantas medicinais. Nesta perspectiva a avaliação da eficácia de extratos de plantas, utilizadas em virtude do conhecimento popular, bem como sua composição através de

determinação de Perfil Fitoquímico e determinações das suas atividades biológicas tornam-se relevantes para que nos próximos passos em pesquisa sejam incrementadas tecnologias para fabricação de produtos biotecnológicos de origem natural.

Os autores Moura *et al* (2015), Silva *et al* (2016), Moura *et al* (2017), e Moura *et al* (2018) retratam dados de experimentações realizadas com extratos vegetais para tratamento de picadas de cobra (*Bothrops jararaca venom*) nas proximidades de Santarém-PA, na região Oeste do estado. Muitas dessas espécies são conhecidas por nome popular, formando uma barreira que dificulta o acesso a espécie correta antes de proceder a análise. Ao que se observa destas pesquisas, os pesquisadores utilizam material vegetal para produção dos extratos, para posterior análise, inferindo a bioprospecção como segundo plano, sem a relevância adequada. Os autores prosseguem na realização de uma busca sistemática por um produto com potencial biotecnológico, realizando etapas da bioprospecção, com análise e discussão técnica objetiva aos dados sem relacioná-los ao contexto ambiental, de onde origina-se o produto pesquisado.

As análises são promissoras, quando na pesquisa de Moura *et al* (2015) os extratos de *Bellucia dichotoma*, *Connarus favosus*, *Plathymentia reticulata* and *Philodendron megalophyllum* foram capazes de inibir a atividade hemorrágica do veneno da espécie de cobra citada acima. Na pesquisa de Silva *et al* (2016) o extrato de *Connarus favosus* mostrou-se eficaz para inibir a atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops* bem como atividade antioxidante e antimicrobiana. Na pesquisa de Moura *et al* (2017) o extrato de *Bellucia dichotoma Cogn* e na pesquisa de Moura *et al* (2018) o extrato de *Aniba fragrans Ducke*, mostraram-se eficazes para inibir atividades biológicas do veneno de *Bothrops*.

Gastrite e desordens inflamatórias do estômago fazem parte da realidade da população ribeirinha e isolado nas comunidades ao longo da região amazônica. Para tratamentos desta natureza, há a tradição de consumir, na forma de chás (extratos aquosos), espécies de *Psittacanthus plagiophyllum Eichl*. A análise descrita por Bezerra *et al* (2017) também foi promissora, tendo como resultado fortes evidências que sustentem o uso dessa espécie para tratamentos desta natureza.

Já 3 dos 8 estudos baseiam-se em estudos anteriores com espécies fúngicas de mesmo gênero ou família que obtiveram dados promissores ou informações descritas pela literatura. A Região Amazônica possui características climáticas peculiares. Possui presença de umidade e calor, tornando o local propício para desenvolvimento de uma diversidade imensa de espécies fúngicas. Os fungos possuem um metabolismo que evoluiu através do tempo, sendo um agente decompositor do meio ambiente, capaz de produzir inúmeras enzimas para as mais diversas aplicações, assim como outros produtos resultantes do seu metabolismo. Esses produtos metabólicos, como enzimas ou substâncias corantes podem ser direcionados para aplicação na indústria gerando ganhos financeiros. A pesquisa de Celestino *et al* (2014) é o único de todos os trabalhos selecionados que faz menção direta ao termo de “Bioprospecção”.

Q2: Como está o cenário da Bioprospecção com fungos Amazônicos?

Microrganismos estão em abundância quando se refere a natureza. Fungos possuem grandes capacidades em produções de enzimas e substâncias metabólicas com aplicações em diversos setores como na biotecnologia, saúde, cosméticos, alimentícia, etc. Baseando-se em informações descritas na literatura, a busca por novas espécies pode ser guiada pela busca por substâncias com variadas atividades biológicas.

Nas pesquisas de Rosa *et al* (2018) e Montefusco (2020) é determinado a atividade celulolítica das enzimas produzidas pelas espécies de fungos estudadas, *Penicillium* sp (artigo 6), *Cladosporium*, *Gliocephalotrichum*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Talaromyces*, *Trichoderma* e *Umbelopsis* (artigo 8), tanto os coletados da decomposição de materiais vegetais, bem como os extraídos da microbiota do intestino de insetos Aquáticos Amazônicos. Na pesquisa de Celestino *et al* (2014) é descrito como bioprospecção parte de um processo de estudo de espécies fúngicas extraídas de amostras de solos amazônicos com potencial de produção de pigmentos que possuem grandes aplicações nas indústrias e trazem uma gama de possibilidades e colorações diferentes.

Mesmo que nas 3 pesquisas o destaque para as vantagens na utilização de fungos para produção de produtos biotecnológicos seja evidente, em partes ainda há a falta de relação entre a pesquisa realizada com a busca sistemática que tratar-se-á a bioprospecção, tendo apenas o autor Celestino *et al* (2014) como referência mais alinhada com este tema. Se tratar de buscas por compostos biológicos com potenciais biotecnológicos, no contexto amazônico, dentro das alternativas de desenvolvimento sustentável já são complexas, afunilar a busca para tratar especificamente de fungos amazônicos inseridos neste contexto torna a busca ainda mais escassa. Com a execução das strings de busca pouco se destaca, na literatura, sobre a execução deste tipo de trabalho, tornando mais fácil encontrar subsídios de informação que reflitam o quão relevante são as pesquisas desta natureza do que propriamente realizá-las.

3.2 Formulários de Extração

Abaixo apresentam-se os dados extraídos dos artigos selecionados, conforme o Quadro 5.

Quadro 5 – Formulários de extração.

<i>Paper 1</i>	
Título	Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: An assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induced by <i>Bothrops jararaca</i> venom.
Abstract	Ethnopharmacological relevance: The poor distribution and limited availability of antivenoms in Brazil have led to greater use of plants to treat snakebites. Very often such plants are the only alternative available to riverside communities. Materials and methods: Direct questionnaire-based interviews were conducted with members of the Cucurunã, São Pedro and Alter do Chão communities in Santarém, Pará, Brazil. For each of the 12 most frequently mentioned species aqueous extracts were prepared and the phytochemical profiles determined by thin layer chromatography. The concentrations of phenolic compounds (tannins and flavonoids) in the aqueous extracts were determined by colorimetric assays. To assess inhibition of the hemorrhagic activity of <i>Bothrops jararaca</i> venom, solutions containing the venom mixed with aqueous extracts in the ratios 1:12 and 1:48 were tested (w/w). SDS-PAGE and Western blot were used to assess the action of the extracts on <i>Bothrops jararaca</i> venom. Results: In all, 24 plants belonging to 19 families were mentioned in the survey as being used to treat snakebites. Leaves (84%), seeds (60.9%) and inner bark (53%) were cited as the most frequently used parts in folk remedies, which were usually prepared in the form of a decoction (62.5%), tincture (45%) or maceration (22.5%). Hemorrhage induced by <i>Bothrops jararaca</i> venom was completely inhibited by aqueous extracts of <i>Bellucia dichotoma</i> , <i>Connarus favosus</i> , <i>Plathymenia reticulata</i> and <i>Philodendron megalophyllum</i> , which had a high phenolic content and contained condensed and hydrolyzable tannins. The results of SDS-PAGE showed that some venom protein bands were not visible when the venom was preincubated with the extracts that had completely inhibited hemorrhagic activity of the venom. Western blot showed that the extracts did not have any enzymatic action on the proteins in the venom as it failed to detect low-molecular-weight bands, which are indicative of possible enzymatic cleavage. Conclusions: Traditional use of plants to treat snakebites is a common practice in the western region of Pará, Brazil. Our findings show that some plant extracts were able to inhibit snake venom-induced hemorrhage in vitro. In vivo studies are being carried out to validate the traditional use of these species to treat snakebites.
Fonte de publicação	Journal of Ethnopharmacology – Science Direct
Ano	2015
Tipo de estudo	Estudo Primário – Estudo Experimental
Contexto	A pesquisa descrita neste artigo retrata uma alternativa para tratamento de pacientes com risco de adentrarem em quadros de hemorragia sob efeitos do veneno de <i>Jaracaca bothrops</i> .
Cenário no contexto amazônico	<p>According to official estimates, snakebites affect around 240,000 people worldwide and account for 20,000 deaths. However, if undernotification is taken into consideration, these figures could reach 1,841,000 and 94,000, respectively. In light of these data, the World Health Organization granted snakebite envenomation neglected-disease status in 2009.</p> <p><i>Bothrops jararaca</i> is the species that causes the greatest number of snakebites in the Southeast of Brazil. Envenomation by snakes of the genus <i>Bothrops</i> causes immediate local effects such as pain, edema, hemorrhage and myonecrosis, as well as systemic reactions, most notably coagulant and hemorrhagic effects. Hemorrhage is one of the most serious symptoms of envenomation by snakes from genus <i>Bothrops</i> and is induced by metalloproteinases.</p> <p>In the Amazon region, the use of plant preparations to treat snakebites is quite common and indeed very often the only option. Some medicinal plants are a source of bioactive compounds with the potential to directly inhibit some of the activities induced by snake venom. Many of these plants have been studied in order to validate their use in popular medicine or to isolate and characterize these bioactive components.</p> <p>This study therefore sought not only to recover and preserve traditional knowledge about the use of plants in the treatment of snakebites in the western region of Pará, Brazil, but also to evaluate the extent to which aqueous extracts of such plants can inhibit the hemorrhagic activity induced by <i>Bothrops jararaca</i> venom as well as to determine the phytochemical profile of these extracts by thin layer chromatography.</p>
Cenário com a utilização de fungos	Este artigo não trabalha com Fungos Amazônicos.
<i>Paper 2</i>	
Título	<i>Comarus favosus</i> Planch: An inhibitor of the hemorrhagic activity of <i>Bothrops atrox</i> venom and potential antioxidant and antibacterial agent

Abstract	Ethnopharmacological relevance: The plant species <i>Connarus favosus</i> is used in folk medicine in the west of Pará state, Brazil, to treat snakebites. Aim of the study: To investigate the potential of the aqueous extract of <i>Connarus favosus</i> (AECf) to inhibit hemorrhagic and phospholipase A2 activities induced by <i>Bothrops atrox</i> venom (BaV) and to determine the antioxidant and antimicrobial potentials of the extract. Materials and methods: AECf was analyzed phytochemically for phenolics (condensed tannins and hydrolyzable tannins) by colorimetry. Antioxidant activity was evaluated by quantitative assays using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and Fe3 ⁺ /phenanthroline. Antimicrobial activity was evaluated by the minimal inhibitory concentration test, and cytotoxicity was evaluated using human fibroblast cells (MRC5). Inhibition of BaV-induced hemorrhagic activity was assessed after oral administration of the extract using pre-treatment, post-treatment and combined (BA plus AECf) treatment protocols. Inhibition of indirect hemolysis caused by phospholipase A2 (PLA2) was investigated in vitro. Interaction between AECf and BaV was investigated by SDS-PAGE electrophoresis, Western blot (Wb) and zymography. Results: The phytochemical profile of AECf revealed ten secondary metabolite classes, and colorimetry showed high total phenolic and total (condensed and hydrolyzable) tannin content. AECf exhibited high antioxidant and antimicrobial potentials. The IC ₅₀ for the cytotoxic effect was 51.91 (46.86–57.50) mg/mL. Inhibition of BaV-induced hemorrhagic activity was significant in all the protocols, and inhibition of PLA2 activity was significant with the two highest concentrations. The BaV/AECf mixture produced the same bands as BaV by itself in SDS-PAGE and Wb although the bands were much fainter. Zymography confirmed the proteolytic activity of BaV, but when the venom was pre-incubated with AECf this activity was blocked. Conclusion: AECf was effective in reducing BaV-induced hemorrhagic activity when administered by the same route as that used in folk medicine and exhibited antioxidant and antimicrobial potentials
Fonte de publicação	Journal of Ethnopharmacology – Science Direct
Ano	2016
Tipo de estudo	Estudo Primário – Estudo Experimental
Contexto	A pesquisa descrita neste artigo relata uma avaliação antihemorrágica, antioxidante e antibacteriana de extratos de <i>Connarus favosus</i> como alternativa de tratamento para pacientes picados por cobra <i>Bothrops atrox</i> na Região Amazônica
Cenário no contexto amazônico	Snake envenomation has been considered a tropical neglected disease and a serious public health problem by the World Health Organization. People living in the North of Brazil were involved in the highest number of accidents in the period 2001–2012. The majority of victims were between 20 and 39 years old, and mortality was found to increase with age. There are many venomous snakes in the Amazon region, where most accidents are attributed to the species <i>Bothrops atrox</i> , which is popularly known as jararaca do norte, jararaca do rabo branco, surucucurana and jipoboia. The venom of <i>Bothrops</i> spp. contains a mixture of proteins that can have enzymatic activity, such as phospholipase A2 and metalloproteinases, as well as other organic compounds that induce severe local tissue damage characterized by edema, blisters, bleeding and necrosis of skeletal muscle. Studies have shown that a variety of plants are used in folk medicine to treat snakebites in the belief that their anti-snakebite properties enable them to be used as a supplement to serum therapy or as an alternative medicine when antivenom is not available. Many of these plants have been correctly identified taxonomically, but their effects when used in folk medicine have never been scientifically proven because the populations that use them only mention them by their common names, which may vary between different geographic regions, making development in this field of study slow and difficult. Some of the plants used in folk medicine belong to the genus <i>Connarus</i> sp., whose members are popularly known for their antisnakebite properties, including anti-inflammatory, antipyretic, antibacterial, anti-edematogenic and anti-hemorrhagic activities. <i>Connarus favosus</i> Planch. (Connaraceae) is an endemic species found in the North, Northeast and Midwest of Brazil. In the North it is found in the states of Amazonas and Pará. In folk medicine, the inner bark of <i>C. favosus</i> is commonly used in the form of a tincture or decoction to treat venomous snakebites.
Cenário com a utilização de fungos	Este artigo não trabalha com Fungos Amazônicos.
Paper 3	
Título	Standardization and anti-inflammatory activity of aqueous extract of <i>Psittacanthus plagiophyllus</i> Eichl. (Loranthaceae)
Abstract	Ethnopharmacological importance: The hemiparasitic species <i>Psittacanthus plagiophyllus</i> Eichl. (Loranthaceae), also known as erva de passarinho, is used in folk medicine in the Santarém region in the state of Pará, Brazil, to treat gastritis and a variety of inflammatory disorders. In view of the lack of pharmacological studies on this species in the literature and the fact that it is used constantly by the local population, this study sought to standardize the extract of the leaves of <i>P. plagiophyllus</i> (AEPp) and to assess its anti-inflammatory potential in in vivo tests. Material and methods: Quality control and standardization of AEPp were performed following the 5th edition of the Brazilian Pharmacopeia. To assess the in vivo anti-inflammatory activity of AEPp, the carrageenan-induced and dextran-induced rat paw edema models were initially used. To investigate the effect of AEPp on carrageenan-induced leukocyte recruitment and exudate production, the air pouch inflammation model was used. In addition, the antioxidant activity of AEPp was assessed in vitro by the DPPH radical scavenging method. Results: The chromatographic profile of AEPp indicated the presence of flavonoids, coumarins and hydrolyzable and condensed tannins. Measurement of phenolics revealed the following percentages in the extract: 12.62 ± 0.18% total phenolics, 5.39 ± 0.01% total tannins, 12.54 ± 0.24% hydrolyzable tannins, 8.37 ± 0.32% condensed tannins and 1.23 ± 0.02% total flavonoids. In 500 and 1000 mg/kg doses (p.o.) AEPp had significant edema-inhibiting activity (p < 0.01) in both the models used, suggesting that the extract may act in vascular and cell events in the inflammatory response and exert an inhibitory effect on mediators responsible for edema. In all the doses tested [250, 500 and 1000 mg/kg (p.o.)], AEPp inhibited total leukocyte and neutrophil migration and reduced the amount of exudate in the air pouch in a dose-dependent manner. Both effects were statistically significant (p < 0.01). The extract also reduced the DPPH radical (maximum reduction 93.13 ± 1.71% at a concentration of 75 µg/mL), indicating that it has antioxidant activity. AEPp, therefore, exhibited considerable in vivo anti-inflammatory activity and in vitro antioxidant activity. This may be due to its high phenolics content. Conclusion: These findings provide evidence to support the use of <i>P. plagiophyllus</i> in folk medicine to treat inflammatory disorders.
Fonte de publicação	Journal of Ethnopharmacology – Science Direct
Ano	2017

Tipo de estudo	Estudo Primário – Estudo Experimental
Contexto	Em esta pesquisa descrita neste artigo é relatado a padronização do processo de extração aquosa bem como resultados de testes para atividade antiinflamatória de erva de passarinho, popularmente utilizada por ribeirinhos, próximos a Santarém-PA, para tratamento de gastrite e distúrbios inflamatórios.
Cenário no contexto amazônico	Among the Loranthaceae in Brazil, the genus <i>Psittacanthus</i> Mart. is the second most commonly found and includes species that hold promising potential for use in pharmacology. In various ethnobotanical surveys carried out to date, medicinal properties were cited for the species of this family, some scientifically proven, such as glucose-lowering, vasodilatory, cytotoxic and antitumor, antioxidant, antidiabetic and antibacterial effects. <i>P. plagiophyllus</i> is native to Brazil, although it is not endemic, and is found in the North and Northeast of the country. In the savannah in the Alter do Chão district in Santarém, PA, Brazil, the only host plant of <i>P. plagiophyllus</i> is the cashew tree <i>Anacardium occidentale</i> (Anacardiaceae). <i>P. plagiophyllus</i> leaves are used in folk medicine in this region as decoctions and infusions to treat inflammation and stomach problems, such as gastritis and stomach ulcers. In light of this use, preliminary studies were carried out with extracts of leaves of this species. The findings of these studies indicate that the extracts have gastroprotective and edema-inhibiting potential without inducing acute toxicity in rats. One of the major challenges associated with the study of medicinal plants is the difficulty involved in standardizing and controlling the quality of herbal drugs, which, like any other type of medicine, should meet certain basic quality requirements to ensure they are effective and safe to use. The rule as far as plant extracts are concerned has been to use standardized extracts, which consist of high quality herbal preparations with relatively constant levels of reference compounds, and apply rigorous quality control throughout the production process, from cultivation of the crop to production of the end product. The advantage of standardization is that it not only ensures the quality, efficacy and reliability of the phytomedicine because of the more uniform, stable active ingredients, but also increases the yield during the extraction process. In light of the anti-inflammatory potential of <i>P. plagiophyllus</i> and the importance of identifying herbal anti-inflammatory drugs, as well as the importance of standardization and quality control in studies of medicinal plants, this study sought to produce a standardized extract of <i>P. plagiophyllus</i> leaves and elucidate, at least partly, the mechanisms involved in its anti-inflammatory action.
Cenário com a utilização de fungos	Este artigo não trabalha com Fungos Amazônicos.
Paper 4	
Título	The potential of aqueous extracts of <i>Bellucia dichotoma</i> Cogn. (Melastomataceae) to inhibit the biological activities of <i>Bothrops atrox</i> venom: A comparison of specimens collected in the states of Pará and Amazonas, Brazil.
Abstract	Ethnopharmacological importance: The effectiveness of aqueous extract of <i>Bellucia dichotoma</i> Cogn. (Melastomataceae) specimens collected in Santarém, PA, against some biological activities of <i>Bothrops atrox</i> venom (BaV) has been scientifically proven. Here, we analyzed the components and assessed the anti-snakebite potential of aqueous extracts of bark of <i>B. dichotoma</i> collected in Manaus, AM, (AEBd-MAO) and Santarém, PA, (AEBd-STM), both in Brazil. Materials and methods: The phytochemical profiles of the aqueous extracts were identified using thin layer chromatography (TLC), and the concentrations of phenolics were determined by colorimetric assay. The inhibitory potential of the extracts was tested against the phospholipase A2, coagulant and gelatinolytic activities of BaV in vitro and its defibrinating and edema-inducing activities in vivo. Interaction between BaV and the extracts was investigated using SDS-Page electrophoresis and Western blotting. Extract cytotoxicity and antioxidant potential were assessed using the human fibroblast cell line MRC-5 and the DPPH assay in cell culture, respectively. Results: While there was no difference between the phytochemical profiles of the extracts, AEBd-MAO had higher concentrations of total phenolics, total tannins and hydrolysable tannins. The extracts inhibited 100% of the phospholipase and coagulant activity of BaV when pre-incubated. Without pre-incubation, however, there was no reduction in phospholipase activity, although significant inhibition of coagulant activity was observed. In the doses used in folk medicine, without pre-incubation, both extracts inhibited 100% of the coagulant activity of BaV. In vivo, the extracts were unable to inhibit the defibrinating activity of the venom but were effective in inhibiting its edema-inducing activity. In the profiles of the extracts pre-incubated with BaV, not all the protein bands revealed by SDS-PAGE and Western blot were observed. Both extracts had a high antioxidant potential and neither had a cytotoxic effect. Conclusion: Although the concentrations of phenolics in each extract were different, the anti-snakebite potential was similar for the concentrations of extract tested. Our findings are of importance for the quality control of this raw material, which, once tested in accordance with Brazilian National Health Surveillance Agency recommendations, may be suitable for use as a phytomedicine to complement treatment of the local effects induced by <i>Bothrops</i> venoms.
Fonte de publicação	Journal of Ethnopharmacology – Science Direct
Ano	2017
Tipo de estudo	Estudo primário – Estudo experimental
Contexto	O estudo descreve alguns experimentos realizados com a utilização de extrato aquoso de <i>Bellucia dichotoma</i> , utilizada pela medicina tradicional dos povos da Amazônia no tratamento de picadas de cobra do gênero <i>Bothrops atrox</i> e outras atividades biológicas.
Cenário no contexto amazônico	<p><i>Bothrops atrox</i> snakebite produces severe local tissue damage, which includes symptoms such as pain, swelling, hemorrhage and necrosis, as well systemic effects. The proteins that make up <i>Bothrops</i> venoms belong to a limited number of protein families. The most abundant, which are commonly associated with the clinical symptoms of envenomation, are L-amino acid oxidase (LAO), C-type lectin-like (CLECL) proteins, metalloproteinases (SVMs), serinoproteases (SVSPs) and phospholipases (PLA2s).</p> <p>Despite the Brazilian Ministry of Health's strategy of distributing immunotherapeutic agents to State Departments of Health, in remote locations envenomation due to snakebite is frequently treated with plant preparations based on folk medicine, which are used either to complement serum therapy or as an alternative medicine administered when antivenoms are not available.</p> <p>Many of the plants used in these preparations are well known, but the majority have yet to be studied to identify their anti-snakebite properties and validate their traditional use as they are known only by their popular names. Recognizing plants by their popular names is problematic because these vary from region to region, making scientific studies even more difficult. Other important factors that should be taken into consideration are environmental factors such as the climate, type of soil and geographic</p>

	<p>location of the collection site. These can influence the biosynthesis of secondary metabolites and are therefore reflected in the ability of these plants to inhibit the effects of venoms, highlighting the need for studies to compare the effects of a particular plant species collected in different locations.</p> <p><i>Bellucia dichotoma</i> Cogn. (Melastomataceae) is a native plant to the Amazon region and is found in four states in the north of Brazil: Acre, Amazonas, Amapá and Pará. An ethnopharmacological survey in communities in Western Pará found that its bark is used to treat snakebite victims.</p>
Cenário com a utilização de fungos	Este estudo não utiliza fungos
Paper 5	
Título	Assessment of the anti-snakebite properties of extracts of <i>Aniba fragrans</i> Ducke (Lauraceae) used in folk medicine as complementary treatment in cases of envenomation by <i>Bothrops atrox</i>
Abstract	<p>Ethnopharmacological relevance: Extracts of leaves and bark of <i>Aniba fragrans</i> are used as tea (decoction) to treat snakebites in communities in the Brazilian Amazon. The aqueous extract of the leaves of <i>A. fragrans</i> has been proven to be effective against <i>Bothrops</i> venom, but only when pre-incubated with the venom. This study sought to assess the potential of different types of extract of this species to inhibit the biological activities of <i>Bothrops atrox</i> venom (BaV) when used the same way as in folk medicine. The main classes of secondary metabolites and the concentrations of phenolics in the extracts were also determined.</p> <p>Materials and methods: Four types of extract of <i>A. fragrans</i> were prepared: aqueous extract of the leaf (AEL), aqueous extract of the bark (AEB), hydroalcoholic leaf extract (HLE) and extract of the residue from hydrodistillation of the leaf (ERHL). The phytochemical profiles of the aqueous extracts were determined using thin layer chromatography (TLC), and the concentrations of phenolics were measured by colorimetric assays. To investigate the potential of the extracts to inhibit the biological activities of BaV, <i>in vitro</i> tests for antiphospholipase and antifibrinolytic activities were performed. <i>In vivo</i> tests for antihemorrhagic and antifibrinolytic activities were also carried out, as well as antimicrobial tests for activity against the main bacteria found in the oral cavity of snakes. Interaction between the extracts and the proteins in BaV was assessed by electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot (WB). The cytotoxicity of the extracts was assessed in a strain of MRC-5 human fibroblasts. Results: Terpenoids, flavonoids and condensed and hydrolysable tannins were detected in all the extracts. Metabolites such as coumarins, fatty acids and alkaloids were present in some extracts but not in others, indicating different phytochemical profiles. Phenolics content varied between extracts, and there were more tannins in AEB and HLE. In the <i>in vitro</i> tests, the extracts inhibited the phospholipase and fibrinolytic activities of BaV in the two ratios of venom to extract used. HLE exhibited effective antimicrobial action as it inhibited growth of 11 of the 15 bacteria investigated, including <i>Morganella morganii</i>, the main bacteria described in the oral cavity of snakes. The extracts failed to inhibit the defibrinolytic activity of BaV, and only the <i>Bothrops</i> antivenom had a significant effect (96.1%) on this activity. BaV-induced hemorrhage was completely inhibited by AEL and AEB when the pre-incubation (venom:extract) protocol was used. When administered orally, as in folk medicine, both AEB and AEL produced significant inhibition of hemorrhagic activity (maximum inhibition 46.5% and 39.2%, respectively). SDS-PAGE and WB of the extracts pre-incubated with BaV showed that the main proteins in the venom had been precipitated by the extracts. None of the four extracts showed cytotoxic effects in the tests carried out with a human fibroblast cell line. Conclusion: In addition to being effective in reducing hemorrhage when administered orally, the extracts displayed a high antimicrobial potential against microorganisms involved in secondary infections at the site of the snakebite. Once the extracts have been tested in accordance with the appropriate regulations, this species could potentially be used to produce a phytomedicine for complementary treatment of the secondary infections due to bacteria that aggravate the local signs and symptoms after snakebite envenomation.</p>
Fonte de publicação	Journal of Ethnopharmacology – Science Direct
Ano	2018
Tipo de estudo	Estudo primário – Estudo experimental
Contexto	Este estudo descreve alguns experimentos realizados com os extratos de espécies de <i>Aniba fragrans</i> Ducke, popularmente utilizada na medicina tradicional dos povos da Amazônia para tratar picada de cobras da espécie <i>Bothrops atrox</i> , a fim de determinar a atividade anti envenenamento e outras propriedades biológicas.
Cenário no contexto amazônico	Snakebite envenomation is a serious worldwide public health issue and one of the twenty neglected tropical diseases considered a priority by the World Health Organization. A total of 27,181 cases of snakebite envenomation were reported in Brazil in 2013. The highest incidence of cases was observed in the Brazilian Amazon (52.6 cases/ 100,000 inhabitants). Victims of <i>B. atrox</i> envenomation can present with local clinical manifestations (pain, swelling and ecchymosis, sometimes accompanied by blisters and bleeding at the site of the bite) and systemic manifestations, including spontaneous bleeding and abnormal blood coagulation. <i>Bothrops</i> antivenom (BA), which is produced in Brazil, is prepared by immunizing equines with a pool of venoms from <i>Bothrops jararaca</i> , <i>B. jararacassu</i> , <i>B. moojeni</i> , <i>B. alternatus</i> and <i>B. neuwiedi</i> . BA is quite effective in reversing the systemic effects of the venom but not its local effects. Furthermore, most accidents occur in regions where the antivenom is not available, leading to complications due to local and systemic effects. Because of this, victims of snakebite envenomation in remote regions, particularly the Amazon, use regional medicinal plants in combination with serum therapy or as an alternative medicine when the recommended treatment (antivenom) is not available. However, rigorous studies that provide a basis for folk medicine treatments in envenomation are extremely scarce. Many plant species are used in folk medicine in the Amazon region to treat snakebite envenomation. An example is <i>Aniba fragrans</i> Ducke (Lauraceae), which belongs to a family of aromatic plants of great commercial value. The bark, leaves and inner bark of <i>A. fragrans</i> are used in the Amazon to prepare tea (decoction and infusion), tincture and poultices to treat victims of snakebite envenomation, particularly envenomation by <i>B. atrox</i> . Previous studies have demonstrated the potential of aqueous extract of <i>A. fragrans</i> to inhibit hemorrhage and edema formation induced by <i>B. atrox</i> and <i>B. jararaca</i> venom
Cenário com a utilização de fungos	Este estudo não utiliza fungos.
Paper 6	
Título	Production of thermostable B-glucosidase and CMCase by <i>Penicillium</i> sp. LM101 isolated from de Amazon region.
Abstract	Background: Cellulolytic enzymes of microbial origin have great industrial importance because of their wide application in

	<p>various industrial sectors. Fungi are considered the most efficient producers of these enzymes. Bioprospecting survey to identify fungal sources of biomass-hydrolyzing enzymes from a high-diversity environment is an important approach to discover interesting strains for bioprocess uses. In this study, we evaluated the production of endoglucanase (CMCase) and β-glucosidase, enzymes from the lignocellulolytic complex, produced by a native fungus. <i>Penicillium</i> sp. LMI01 was isolated from decaying plant material in the Amazon region, and its performance was compared with that of the standard isolate <i>Trichoderma reesei</i> QM9414 under submerged fermentation conditions. Results: The effectiveness of LMI01 was similar to that of QM9414 in volumetric enzyme activity (U/mL); however, the specific enzyme activity (U/mg) of the former was higher, corresponding to 24.170 U/mg of CMCase and 1.345 U/mg of β-glucosidase. The enzymes produced by LMI01 had the following physicochemical properties: CMCase activity was optimal at pH 4.2 and the β-glucosidase activity was optimal at pH 6.0. Both CMCase and β-glucosidase had an optimum temperature at 60°C and were thermostable between 50 and 60°C. The electrophoretic profile of the proteins secreted by LMI01 indicated that this isolate produced at least two enzymes with CMCase activity, with approximate molecular masses of 50 and 35 kDa, and β-glucosidases with molecular masses between 70 and 100 kDa. Conclusions: The effectiveness and characteristics of these enzymes indicate that LMI01 can be an alternative for the hydrolysis of lignocellulosic materials and should be tested in commercial formulations.</p>
Fonte de publicação	Eletronic Journal of Biotechnology – Science Direct
Ano	2018
Tipo de estudo	Estudo primário – Estudo experimental.
Contexto	Este estudo descreve um experimento realizado com fungos da espécie <i>Penicillium</i> sp, para produção de Enzimas celulolíticas com aplicações econômicas, dentro dos mais diversos setores industriais.
Cenário no contexto amazônico	<p>Cellulases are enzymes capable of acting on cellulosic materials, promoting hydrolysis. Various microorganisms, including fungi and bacteria, produce a complex of cellulolytic enzymes. Fungi are considered the most efficient producers of these enzymes. They naturally produce cellulases and other accessory proteins, including oxidoreductases, which are required for the complete saccharification of lignocellulose.</p> <p>However, other species (particularly filamentous fungi) have been reported as alternative enzyme sources. Among these fungi are the genera <i>Aspergillus</i>, <i>Penicillium</i>, and <i>Trichoderma</i>. Various <i>Penicillium</i> spp. isolates have been investigated for their efficiency of cellulase production, similar or superior to that of standard lineages <i>Penicillium citrinum</i> is abundantly found in the soil, being more common in tropical regions. It has been isolated from the roots, stems, and leaves of coffee plants, cereals, and tropical spices.</p>
Cenário com a utilização de fungos	<p>Cellulolytic enzymes in general have been studied since the second world war, when American soldiers were stationed in the South Pacific realized the deterioration of their objects' cotton base, and later, as a result of various studies led by Dr. Reesei, a yeast strain identified as <i>Trichoderma viride</i> was isolated and was determined be the responsible agent for degrading cellulose materials.</p> <p>Cellulases are enzyme complexes that are classified according to the site of hydrolysis of the cellulose fiber. For example, endoglucanase hydrolyzes cellulose in amorphous regions (i.e., accessible regions in the cellulosic fiber); exoglucanase hydrolyzes the reducing end of the fibers; and β-glucosidase completes the cellulose hydrolysis and releases glucose from cellobiose, cellodextrins, and other oligosaccharides. Various microorganisms, including fungi and bacteria, produce a complex of cellulolytic enzymes. Fungi are considered the most efficient producers of these enzymes.</p> <p>The main industrial sectors using cellulases are the textile, industrial food, detergent, cellulose pulp and paper, agriculture, livestock, and bioconversion sectors. In these industrial processes, enzymes can be exposed to extreme pH and temperature conditions. Acid cellulose is more adequate to degrade feedstock cellulose in the bioconversion industry, where biomass undergoes acid pre-treatment. The ability to work in an acidic pH environment is also a requirement for enzymes used in the textile industry in the finishing step where they act on cellulolytic fibers. Moreover, alkaline and halophilic enzymes are mainly used in detergents. The widespread use of cellulolytic enzymes and the increased need to replace fossil fuels probably will make cellulases very valuable enzymes. It is true if ethanol, butanol, or any other product derived from fermentation becomes a mainstream fuel.</p> <p>Enzyme hydrolysis is an essential component in the process of obtaining ethanol from biomass, and its viability is associated with high conversion efficiency at low production costs. High specificity, low inhibition by its hydrolysis products, and high stability are some of the desirable characteristics for an enzyme to be considered commercially viable. The interests and prospecting for cellulolytic enzymes has been growing steadily. This is true for industrial saccharification processes for ethanol production. The optimization of polysaccharide biomass conversion into fermentable sugars involves the use of enzyme cocktails that allow greater profitability. Within this scenario, the species of filamentous fungus genus <i>Penicillium</i> stand out as great producers of cellulases and are targeted for their enzymes, which are part of the efficient enzyme blends.</p>
Paper 7	
Título	Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production
Abstract	<p>The aim of this study was to isolate fungi able to produce pigments. Fifty strains were isolated from the Amazon soil by the conventional technique of serial dilution. Submerged fermentation was performed in Czapeck broth in order to select strains able to synthesise pigments. Five strains were able to produce pigments and were identified by sequencing the rDNA (ITS regions). These fungi were identified as <i>Penicillium sclerotiorum</i> 2AV2, <i>Penicillium sclerotiorum</i> 2AV6, <i>Aspergillus calidoustus</i> 4BV13, <i>Penicillium citrinum</i> 2AV18 and <i>Penicillium purpurogenum</i> 2BV41. <i>P. sclerotiorum</i> 2AV2 produced intensely coloured pigments and were therefore selected for chemical characterisation. NMR identified the pigment as sclerotiorin. In this work, the influence of nutrients on sclerotiorin yield was also studied and it was verified that rhamnose and peptone increased production when used separately. These results indicate that Amazonian fungi bioprospecting is a viable means to search for new sources of natural dyes.</p>
Fonte de publicação	Process Biochemistry – Science Direct
Ano	2014
Tipo de estudo	Estudo primário – Estudo experimental
Contexto	Este estudo descreve um processo de bioprospecção de fungos de solos amazônicos produtores de pigmentos.
Cenário no contexto	Fungi are present in almost every environment on earth, with the greatest diversity found in tropical regions that have a hot

amazônico	and humid climate, which favours fungal multiplication. Among the tropical biomes, the Amazon rainforest contains the richest biodiversity, with a large number of plants, animals and microorganisms that are not well known. The soil of this forest, contrary to what one might imagine, is poor in nutrients, and the maintenance of this rich forest is ensured the innumerable microbial diversity present in the soil, allowing the forest's animals and plant components to feed by recycling organic matter. Soil fungi are metabolically very active and are able to produce many substances of economic value, including enzymes of industrial interest [6], metabolites with pharmacological activity and pigments. They're collected from the surface (1–3 cm depth) of the forest located at the Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas, Brazil (Latitude-South 03° 09' 39'' and Longitude West 59° 98' 77'').
Cenário com a utilização de fungos	Soil fungi have been widely isolated from nature for their ability to produce pharmacologically active molecules. These microorganisms have also been noted to produce natural pigments that could be used in the dye industry, given the variety and intensity of colours produced by different strains of environmental fungi and the great value to natural colourants. Dyes derived from natural sources have been increasingly used by pharmaceutical, textile and food industries due to the dyes lower toxicities to the environment and to man when compared to synthetic dyes. The majority of the pigments produced by fungi are quinones, flavonoids, melanins and azaphilones, which belong to the aromatic polyketide chemical group and have been widely described for medicinal uses and potential use as dyes. Despite the Amazon rainforest being a home to a great diversity of microorganisms, there are few published studies that explore the ability of these fungi to produce pigments.
Paper 8	
Título	Cultivable cellulolytic fungi isolated from the gut of Amazonian aquatic insects
Abstract	Filamentous fungi have been targeted by bioprospecting studies because they are effective producers of extracellular enzymes that can potentially be used by the bioindustry. In this study, we isolated filamentous fungi from the guts of Amazonian aquatic insect larvae to evaluate their cellulolytic activity. We collected 69 larvae of shredder insects of three genera: Phylloicus (Trichoptera: Calamoceratidae), Triplectides (Trichoptera: Leptoceridae) and Stenochironomus (Diptera: Chironomidae) in ten streams from a protected area in the central Brazilian Amazon. Production of mycelia was elaborated in PDA (Potato Dextrose Agar) medium. The isolates were transferred to a synthetic medium with carboxymethyl cellulose, and Congo red was used to determine the enzymatic index. The hydrolysis halo, indicating the production of cellulases, was observed in 175 fungal isolates (70% of the total), of which 25 had an enzymatic index ≥ 2.0 and belonged to seven fungal genera. The fungal taxa Cladosporium, Gliosphaeria, Penicillium, Pestalotiopsis, Talaromyces, Trichoderma and Umbelopsis were isolated from guts of Phylloicus, Triplectides and Stenochironomus, which are traditionally used in biotechnological applications. Our results indicate the cellulolytic potential of fungi associated with the guts of aquatic Amazonian insects.
Fonte de publicação	Acta Amazônica
Ano	2020
Tipo de estudo	Estudo primário – Estudo experimental
Contexto	Este estudo descreve a análise de atividade celulolítica de enzimas extracelulares produzidas por espécies de fungos extraídos do intestino de insetos aquáticos da Amazônia.
Cenário no contexto amazônico	In the Amazon region, where insect diversity is one of the highest in the world, knowledge on fungus-insect systems and cellulase-producing fungi associated with aquatic insects is still incipient study of the gut mycobiota of aquatic insects can lead to the discovery of metabolic processes and interactions with potential biotechnological applications.
Cenário com a utilização de fungos	Cellulases produced by fungi are widely used in industry, and the demand for efficient microorganisms has increased over time. Cellulases are currently employed in the production of food, animal feed, second generation ethanol, fruit and vegetable juices, paper, wine and textiles as well as in pulp extraction, starch processing, breweries, laundry and agriculture. Fungal enzymes are particularly advantageous when compared to animal or plant equivalents, as their production is less costly since the enzymes are secreted as complexes that work in synergy. Moreover, fungal enzymes have different physicochemical characteristics (e.g., thermostable enzymes of thermophilic organisms), and they are easier to produce on a large scale. In general, microorganisms participate in the digestive processes of insects that have diets with nutritional deficiency, such as insects that feed on phloem or on complex molecules like cellulose. Their capacity to degrade cellulose, in particular, is high and widely distributed among different taxa. In freshwater environments, an elaborate symbiosis occurs in aquatic shredder insects. These insects feed on allochthonous organic matter (decaying wood and leaves) only after it has been conditioned, i.e., colonized by microorganisms, which convert this tissue into a more palatable food through extracellular enzymes. This study was to investigate the cellulase activity of filamentous fungi isolated from the gut of aquatic shredder insects, expecting to identify new cellulolytic enzymes in poorly studied species of Amazonian insects.

Fonte: Autores.

4. Conclusão

Como pôde-se observar, aparentemente, a bioprospecção é mais facilmente aplicável do que discutível, uma vez que os estudos descrevem etapas do processo sem utilizar ou referenciar a este termo (bioprospecção), por meio de revisão da literatura, por exemplo. Tratando-se de um dos berços da biodiversidade no planeta, a Região Amazônica deveria ter destaque em trabalhos de bioprospecto, entretanto ao executar as strings de busca poucos resultados se encaixam nos filtros de seleção deste protocolo, como já justificadas em momentos anteriores deste texto. Em relação à bioprospecção de fungos amazônicos, foco deste estudo, demonstra ser ainda mais dificultosa e complexa de ser executada devido as várias etapas necessárias pra condução do estudo, como coleta, triagem, cultivo, extração e caracterização do extrato, bem como, ao aplicar o protocolo de

busca, novamente, poucos trabalhos foram identificados sobre essa temática. Tratando-se da bioprospecção observa-se um cenário desafiador e uma percepção de que questões que envolvem o tema “sustentabilidade” são pouco difundidas entre as interdisciplinaridades das áreas que compõem as Ciências Ambientais. Espera-se que, no futuro, com a difusão maior deste tema dentro das interdisciplinaridades mais produções científicas possam ser publicadas para enriquecimento da literatura.

Referências

- Baldin N., & Munhoz E. M. B. (2011). Snowball (Bola de neve): Uma técnica metodológica para pesquisa em educação ambiental comunitária. Congresso Nacional de Educação. 331-341.
- Balmford, A. *et al* (2002). Economic Reasons for Conserving Wild Nature. *Science*. 297, 950-953.
- Bezerra A. N. S. *et al* (2017) Standardization and anti-inflammatory activity of aqueous extract of *Psittacanthus plagiophyllu Eichl* (Loranthaceae). *Journal of Ethnopharmacology, Science Direct*. 234-240.
- 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.
- Derneval D., Coelho J. A. P. M., *et al* (2017) Mapeamento Sistemático e Revisão Sistemática da Literatura em Informática na Educação. Cap 3. UFAL
- 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].
- Montefusco E. L. B. *et al*. (2020) Cultivable cellulolytic fungi isolated from the gut of Amazonian aquatic insects. *Acta Amazônica*. 346-35.
- Moura V. M. *et al*. (2015) Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: An assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induces by *Bothrops jararaca* venom. *Journal of Ethnopharmacology, Science Direct*. 224-232
- Moura V. M. *et al* (2017) The potential of aqueous extracts of *Bellucia dichotoma* Cogn (Melastomataceae) to inhibit the biological activities of *Bothrops atrox* venom: A comparison of specimens collected in the states of Pará and Amazonas, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology, Science Direct* 168-177
- Moura V. M. *et al*. (2018) Assessment of the anti-snakebite properties of extracts of *Aniba fragans* Ducke (Lauraceae) used in folk medicine as complementary treatment in cases of envenomation by *Bothrops atrox*. *Journal of Ethnopharmacology, Science Direct*. 350-358
- Posada L. F. *et al* (2016) Bioprospecção de bactérias aeróbias formadoras de endosporos com potencial biotecnológico para promoção do crescimento de bananeiras. *Scientia Horticulturae, Science Direct*. 81-90.
- Priyanka A., & Pandey A. (2020) Bioprospecção de bactérias que promovem o crescimento de plantas endofíticas isoladas do Himalaia (*Taxus wallichiana* Zucc.). Instituto Nacional do Meio Ambiente do Himalaia. *Microbiological Research, Science Direct*. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126536>
- Rosa P. S. S. *et al*. (2018) Production of thermostable B-glucosidase and CMCase by *Penicillium sp* LM101 isolated from the Amazon region. *Electronic Journal of Biotechnology, Science Direct*. 84-92
- 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. *SciELO*. 229-224.
- Santos C. M. C. *et al*. (2007) A estratégia PICo para a construção da pergunta de pesquisa e busca de evidências. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*. Vol 15. <https://doi.org/10.1590/S0104-11692007000300023>
- Silva T. P. *et al*. (2016) *Connarus favosus* planch: An inhibitor of the hemorrhagic activity of *Bothrops atrox* venom and potential antioxidant and antibacterial agent. *Journal of Ethnopharmacology, Science Direct*. 166-175
- Stol K. J., Raplh P. *et al*. (2017) Grounded Theory in Software Engineering Research: A critical review and guidelines. *ResearchGate*. <http://dx.doi.org/10.1145/2884781.2884833> 120-131.
- Valois A. C. C. (2003) Benefícios e Estratégias de utilização Sustentável da Amazônia. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)*. (21a ed.),
- Zamberlan J. F. *et al*. (2014) Produção e manejo agrícola: impactos e desafios para sustentabilidade ambiental. *Eng. Sanit Ambient*. Edição especial. 95-100.

3.0 CONCLUSÃO GERAL

Tratando-se de exploração sustentável a região Amazônica ganha imenso destaque devido a sua flora e fauna ainda inexplorada. Cuidar dos recursos naturais, preservando-os, e obter produtos tecnológicos a partir destes recursos é uma missão do Desenvolvimento Sustentável. A biotecnologia está aliada a bioprospecção e ao desenvolvimento sustentável uma vez que, com o uso da tecnologia, pode-se produzir ou obter produtos em um pequeno ambiente controlado, utilizando menos espaço físico, menor custo, melhor produção e conseqüentemente com menor degradação do meio ambiente, na bioprospecção quanto na prospecção química, tornando-se ótimas ferramentas para pesquisas de produtos biotecnológicos. Em virtude do cenário no contexto amazônico ser escasso de pesquisas desta natureza, todo trabalho realizado em torno desta temática torna-se relevante para construção do conhecimento sobre os recursos naturais amazônicos para que enfim este conhecimento sustente estudos futuros que possivelmente terão resultados bastante promissores.

4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAL

- 1- Ameen, M. Epidemiology of superficial fungal infections. **Clinics in Dermatology**, 28, 197–201, 2010.
- 2- Brown, G. D. et al., Hidden Killers: Human Fungal Infections. **Sci. Transl. Med.**, 4, 165rv13, 2012.
- 3- Carvalho G. O. Sustentabilidade e desenvolvimento sustentável: uma visão contemporânea. **Science Direct**, 2019.
- 4- Cunha, Manuela Carneiro da; ALMEIDA, Mauro. 2001. Populações indígenas, povos tradicionais e preservação na Amazônia. In: CAPOBIANCO, João Paulo et al.(Orgs.). Biodiversidade na Amazônia brasileira: avaliação e ações prioritárias para a conservação, uso sustentável e repartição de benefícios. São Paulo: ISA, **Estação Liberdade**. p.184-193.
- 5- Denning, D. W.; Hope, W. W. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. **Trends in Microbiology**, 18, 195-204, 2010.
- 6- Disponível em ><https://www.dinamicambiental.com.br/blog/meio-ambiente/arco-desmatamento-amazonia/>< Acessado em 4/06/2021.
- 7- Disponível em ><https://imazon.org.br/a-floresta-habitada-historia-da-ocupacao-humana-na-amazonia/><Acessado em 4/06/2021.

- 8- Enoch, D. A. et al. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. **Journal of Medical Microbiology**, 55, 809–818, 2006.
- 9- Foster, K. W. et al. Epidemiologic surveillance of cutaneous fungal infection in the United States from 1999 to 2002. **J. Am. Acad. Dermatol.**, 50, 748-752, 2004.
- 10- Fuentefria, A. M. et al. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. **Lett. Appl. Microbiol.**, 66, 2-13, 2017.
- 11- Garber, G. An Overview of Fungal Infections. **Drugs**, 61, 1-12, 2001.
- 12- Hay, R. Superficial fungal infections. **Medicine**, 45, 707-710, 2017.
- 13- Hogan, Daniel J. et al. Migração e meio ambiente no Centro-Oeste. Campinas, **SP: Nepo/Unicamp**, 2002.
- 14- Lewindsohn, T. M.; PRADO, P. I. Síntese do conhecimento atual da biodiversidade brasileira. In: LEWINSOHN, T. M. (Org.). Avaliação do Estado do Conhecimento da Biodiversidade Brasileira. **Brasília: MMA**, 2006. p. 21-109. v. 1.
- 15- Loureiro V. R. Amazônia, uma história de perdas e danos, um futuro a (re)construir. **São Paulo** 2002.
- 16- Mavor, A. L. et al. Systemic Fungal Infections Caused by Candida Species: Epidemiology, Infection Process and Virulence Attributes. **Curr. Drug Targets**, 6, 863-874, 2005.
- 17- Miceli, M. H. et al. Emerging opportunistic yeast infections. **Lancet Infect. Dis.**, 11, 142–51, 2011.
- 18- Pimentel V. *et al.* Biodiversidade Brasileira como fonte de inovação farmacêutica: uma nova esperança? **Revista do BNDES**, Junho 2015.
- 19- Saccaro Júnior, Nilo L. A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada: Brasília**, 2011