

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO FUNGOS FILAMENTOSOS DE SOLO DE MINA DE FERRO E ESTUDO DE CRESCIMENTO MICELIAL.

Beatriz Lacerda Ferreira¹, Patrícia de Almeida Nóbrega², Irlon Maciel Ferreira³

Universidade Federal do Amapá/Laboratório de Síntese Orgânica e Biocatálise Aplicada,
Universidade Campus Marco Zero do Equador, Rodovia Juscelino Kubitschek de Oliveira Km 02,
68902-280, Bairro Zerão, Macapá, AP, Brazil,

¹beatrizferreira.ap@gmail.com, ²patriciabiotec@gmail.com, ³irlon.ferreira@gmail.com

Resumo

Os fungos são microrganismos que apresentam uma ampla diversidade, e desenvolvem funções primordiais para manutenção dos ecossistemas, contribuindo para ciclos biogeoquímicos e são parte vital das ligações de cadeias alimentares como decompositores. A utilização dos fungos filamentosos é considerada um método de produtividade sustentável para processos de biorremediação. Por tanto, o estudo visa o isolamento e identificação de fungos filamentosos a partir de amostras de solo de mina de ferro, e analisar o crescimento desses microrganismos em meio enriquecido com fármaco ibuprofeno, um anti-inflamatório não esteroide. As cepas das culturas dos fungos foram isoladas e identificadas por técnicas micromorfológica e macromorfológica. O crescimento micelial radial foi avaliado em placas de Petri contendo ibuprofeno, bem como a cinética e taxa de crescimento específico de fungos filamentosos isolados do solo de mina de ferro. O estudo identificou diferentes espécies de fungos filamentosos com capacidade de resistência a altas concentrações de ibuprofeno.

Palavras-chave: Biodegradação; Ibuprofeno; Fungos de solo amazônico.

Área do Conhecimento: Ciências Exatas e da Terra

Introdução

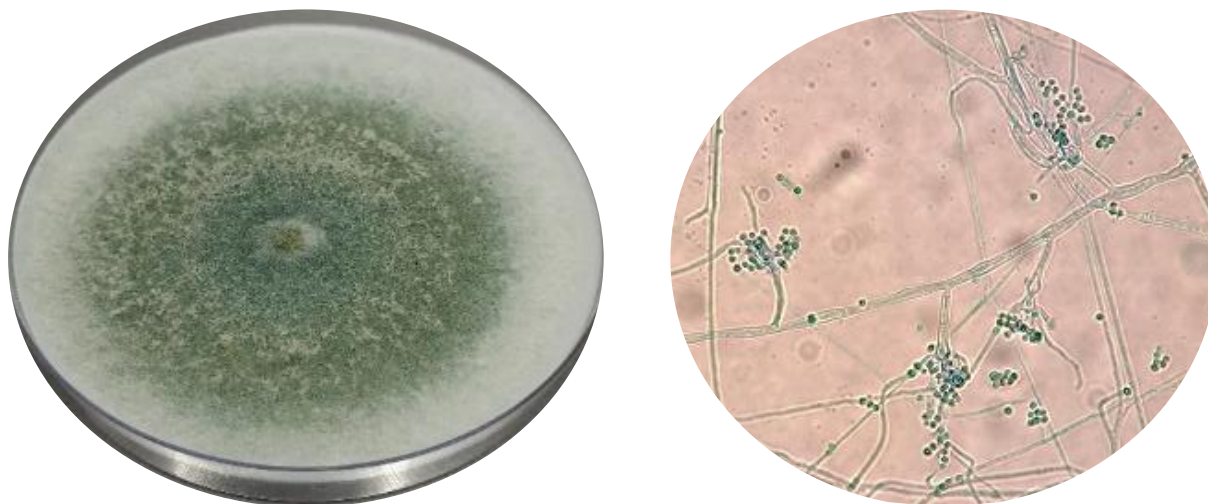
O consumo e o aumento na produção de medicamentos, aumentam os resíduos advindo de medicamentos, que ao serem expostos ao descarte incorreto são nocivos à saúde humana e ao meio ambiente. Atualmente os problemas ambientais e suas consequências quanto a qualidade de vida propiciou diversas discussões no qual buscam alternativas para o descarte correto de medicamentos, visando garantir a efetividade e segurança no tratamento efluentes que contenham este resíduo (GLASSMEYER, et al., 2009). A utilização de microrganismos, especialmente os fungos filamentosos, é considerado um método de produtividade sustentável em processos de biorremediação, quando comparado ao métodos físico-químicos convencionais uma vez que diferentes fungos exibem potencial de crescimento quando cultivados em ambiente contendo substrato farmacêutico (COSTA, et al., 2015).

Estima-se que dos fungos existentes, apenas 5% ainda tenham sido descritos pela comunidade científica. Os fungos são microrganismos que apresentam uma ampla diversidade, e desenvolvem funções primordiais para manutenção dos ecossistemas, contribuindo para ciclos biogeoquímicos e são parte vital das ligações de cadeias alimentares como decompositores (Figura 1).

Os microrganismos participam do processo de autopurificação dos ecossistemas, pois podem degradar poluentes por vias metabólicas e/ou co-metabólicas. A biodegradação é considerada o processo mais importante para a eliminação da maioria das substâncias xenobióticas, incluindo as drogas, portanto são importantes degradadores de substâncias orgânicas, incluindo produtos farmacêuticos, e fornecem produtos como nutrição para outros organismos na cadeia alimentar (CARACCILO et al., 2015).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

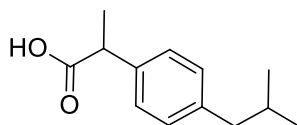
Figura 1 - Placa de Petri contendo meio de cultura (Extrato Malte, pH 5) do fungo *Trichoderma sp.* isolado do solo de mineração.



Fonte: Autor

O Ibuprofeno (**Figura 2**) ou ácido 2(4isobutilfenil) propiônico, surgiu na busca de drogas seguras, ingressou na Inglaterra no ano de 1967, e posteriormente, no ano de 1974, foi o primeiro composto de ácido propiônico a ser utilizado nos Estados Unidos como medicamento com propriedade terapêutica anti-inflamatória não esteroidal, porém comparada a outros fármacos, possui atividade anti-inflamatória fraca, entretanto, seus efeitos adversos no organismo são apontados como baixo. Também é frequentemente utilizado para o alívio de dor e febre (KAMTOR, 1979, p. 877; REN, et al., 2021, p.3).

Figura 2 - Estrutura Ibuprofeno



Fonte: Autor

Diferentes biocatalisadores foram propostos para a biodegradação de Ibuprofeno, a busca por novas cepas com propriedades únicas continua através do uso de diferentes perspectivas sobre novas informações e percepções para biorremediação aplicada. A degradação microbiana de Ibuprofeno tem recebido atenção da comunidade científica mundial devido ao seu alto consumo (RASTOGI et al., 2021).

Portanto, o presente estudo consiste em elucidar e sistematizar o isolamento e identificação de fungos filamentosos e a análise do crescimento racial desses microrganismos na presença de ibuprofeno. Assim, o artigo contribui para direcionar estudos futuros que também comprovam a importância dos fungos filamentosos em aplicações biotecnológicas, tais como os processos de biodegradação.

Metodologia

1 Isolamento dos Fungos

O isolamento dos fungos, ocorreu por meio da técnica de suspensão seriada, conforme Clark (1965) com modificações. De início foi preparada a solução mãe das amostras de solo coletadas do solo de mina de ferro localizado no município de Pedra Branca do Amapari – AP. Posteriormente 300 uL da amostra diluída foram distribuídas em placas de Petri contendo meio ágar sabouraud, previamente esterilizados em autoclave (Phoenix, modelo AV-75) pelo período de 15 minutos, em temperatura à

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

121°C, 1 atm, e clorafenicol. As placas foram mantidas em incubação em Estufa (B.O.D. LUCADEMA®, modelo LUCA-161/03) a (28°C), durante 5 dias para desenvolvimento dos microrganismos (CLARK, 1965; DESHMUKH & VEREKAR, 2014).

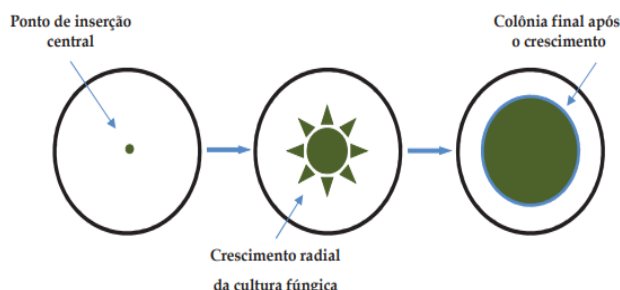
2 Identificação dos Fungos

A identificação da morfologia dos fungos foi realizado por observação macro e micromorfológica. As identificações iniciais foram baseadas nas observações características macromorfológica como cor, textura e bordas da colônia, e posteriormente as características micromorfológicas, utilizando a técnica do microcultivo para análise das hifas fúngicas da colônia do microrganismo, utilizando azul de lactofenol (0,5%), seguindo os métodos e critérios conforme Costa et al (2015). A captura das imagens foi realizada utilizando o microscópio óptico (OLYMPUS® BX41).

3 Estudo Crescimento Radial na Presença de Paracetamol e Ibuprofeno

O estudo do crescimento da cultura micelial radial conduziu-se conforme Costa (2015, p.31) com adaptações, na presença do Ibuprofeno, utilizando os fungos isolados. Para preparação do meio de cultura sólido adicionou-se 20 g de Extrato malte e 20g de ágar em 1000 mL de água destilada, ajustado para pH 5 em pHmetro (QUALXTRON®) utilizando solução ácida (HCl 10%). Posteriormente o meio de cultura foi esterilizado em autoclave pelo período de 15 minutos, em temperatura à 121°C, 1 atm.

Figura 3 - Experimento Crescimento Radial



Para cada microrganismo inoculado, realizou-se o estudo com placas de meio de cultura controle (Sem a presença do fármaco) e placas contendo os fármacos em solução Ibuprofeno (20, 60 e 100 ppm), solubilizadas em DMSO. Inserido-se um disco de 5 cm de micélio no centro de cada placa previamente vertida com meio de cultura (Esquema 1), em pH 5. Após a inoculação as placas foram mantidas por 6 dias incubadas, em uma temperatura de 28°C. O monitoramento do crescimento radial dos microrganismos foi realizado utilizando paquímetro para medir o diâmetro em posições perpendiculares a cada 24 horas por 6 dias.

Resultados

1 Identificação Fungos filamentosos

As análises macromorfológicas e micromorfológicas identificaram os seguintes gêneros: *Trichoderma* sp. *Penicillium* sp. *Talaromyces* sp. *Asrpegillus* sp. *Purpureocillium* sp. *Penicillium* sp. (Figura 3).

Figure 4 - Cepas de Fungo filamentosos de solo identificados.



A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições



Fonte: Autor.

2 Crescimento micelial radial

Avaliação de crescimento micelial com cepas de fungos filamentosos isolados do solo de mina de ferro, contendo ibuprofeno foram realizados. Os experimentos foram conduzidos por 7 dias, e o crescimento da colônia foi avaliado a cada 24 h. Os resultados para o crescimento micelial a partir das médias do diâmetro (cm) da placa de Petri se encontram na Tabela 1, apresentada pelas espécies fúngicas, meio de cultura testados (Controle, IBU 20 ppm). Foi realizado análise de variância (ANOVA) para todas as espécies testadas, sendo observado diferenças significativas entre os resultados obtidos ($p < 0,05$).

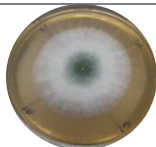
Tabela 1 - Crescimento micelial na presença de Ibuprofeno

Fungo	Meio Crescimento	Tempo (dias)		
		3	5	7
		Diâmetro colônia (cm)		
<i>Trichoderma sp.</i>	Malt 2%	7,2 ± 0,06	8	8
	MAIt 2% + IBU	3,3	7,65 ± 0,03	8
<i>Penicillium sp.</i>	Malt 2%	1,9	3,85 ± 0,03	5,65 ± 0,03
	MAIt 2% + IBU	0,85 ± 0,03	1,8 ± 0,06	3,1 ± 0,03
<i>Talaromyces sp.</i>	Malt 2%	1,6	2,9 ± 0,06	4,3 ± 0,06
	MAIt 2% + IBU	0,4	1,3	2,2
<i>Asrpegillus sp.</i>	Malt 2%	2,15 ± 0,03	4,85 ± 0,03	6,7 ± 0,06
	MAIt 2% + IBU	0,6	1,85 ± 0,03	2,7 ± 0,1
<i>Purpureocillium sp.</i>	Malt 2%	0,5 ± 0,06	1	1,45 ± 0,03
	MAIt 2% + IBU	0,25 ± 0,03	0,55 ± 0,03	0,75 ± 0,03
<i>Penicillium sp.</i>	Malt 2%	1,3 ± 0,06	2,8	4,6
	MAIt 2% + IBU	0,95 ± 0,03	2 ± 0,06	3,3 ± 0,1

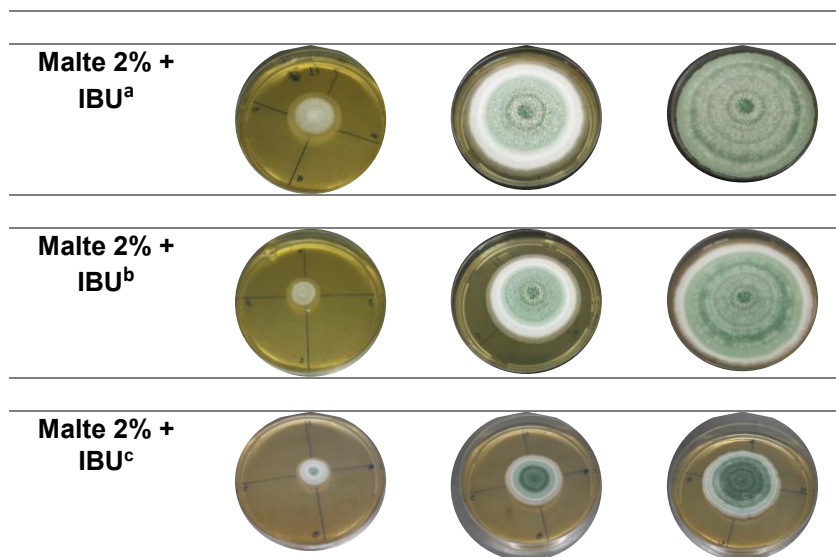
Fonte: Autor.

Nos experimentos, a cepa *Trichoderma sp.* (Tabela 2) demonstrou crescimento semelhante ao grupo controle, ao atingir 7,65 ± 0,03 cm de diâmetro no quinto dia na presença do ibuprofeno. O fungo *Penicillium sp* foi o segundo que apresentou pouca interferência de crescimento nas concentrações de ibuprofeno quando comparado ao controle.

Tabela 2 - Análise crescimento micelial *Trichoderma sp.*

Meio de Crescimento	Tempo (dias)		
	3	5	7
Malte 2%			

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições



^a Concentração 20 ppm; ^b Concentração 60 ppm; ^c Concentração 100 ppm

Fonte: Autor

Os resultados obtidos propõem que os fungos podem utilizar o próprio anti-inflamatório como fonte de carbono para a indução do seu crescimento micelial, sugerindo que esses microrganismos são fortes agentes em processos biotecnológicos de biorremediações.

Discussão

As características morfológicas dos fungos filamentosos são normalmente descritas tanto a nível macroscópico como microscópico. Com a morfologia macroscópica, características mais robustas podem ser descritas, como cor, textura, relevo granular ou micelial, que podem se agregar ou se dispersar livremente. Através da morfologia microscópica, propriedades mais específicas, como frequência de ramificação, tamanho das hifas e segregação, podem ser verificadas (MCINTYRE, 2021).

O solo vem sendo amplamente estudado com diferentes finalidades, como o isolamento e identificação de espécies de microrganismos tais como os fungos filamentosos. Gêneros de *Thichorema* e *Aspergillus* foram identificados em amostras de solo no sul da Índia (VIVEKANANDHAN et al, 2020). O fungo do gênero *Penicillium* isolado do solo também foi relatado por Zang et al (2021). O gênero *Talaromyces* isolado do solo foi estudado por Dramaie et al (2020). As espécies *Aspergillus ustus* e *Purpureocillium lilacinum* também foram encontradas em solo contaminado (BENGUENAB & CHIBANI, 2021).

Para todos os fungos submetidos ao crescimento radial em meio sólido na presença do medicamento, foi observado o processo de conidiogênese, a diminuição da produção e retardo na produção dos esporos, porém todos os microrganismos apresentaram crescimento, pois as condições para esporulação são geralmente mais específicas do que aquelas para crescimento vegetativo (SEKIGUCHI & GAUCHER, 1977).

Conclusão

Esses resultados sugerem que o solo é um ambiente promissor para o isolamento de novas espécies de microrganismos. Os fungos avaliados neste estudo podem ter potencial para serem aplicados em processos de biorremediação em ambientes contaminados com fármacos anti-inflamatórios, uma vez que os fungos são extraídos do próprio ambiente, não causa danos ao ecossistema. Portanto o desenvolvimento de alternativas que visam reduzir a poluição causada pelo descarte inadequado de medicamentos, é importante na busca da manutenção do meio ambiente.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Referências

- BENGUENAB, A. & CHIBANI, A. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by filamentous fungi (*Aspergillus ustus* and *Purpureocillium lilacinum*) isolated from used engine oil contaminated soil. **Acta Ecologica Sinica**. 2020.
- CARACCILO, A. B; TOPP, E; GRENNI, P. Pharmaceuticals in the environment: Biodegradation and effects on natural microbial communities. A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 2015.
- CAVALCANTIL, M. A. D. Q; OLIVEIRA, L. G. D; FERNANDES, M. J; LIMA, D. M. Filamentous fungi isolated from soil in districts of the Xingó region, Brazil. **Research Gate**, 2006.
- CLARK, F. E. Agar-Plate Method for Total Microbial Count. **Agricultural Research Service**, USDA. Colorado. 1965.
- COSTA, T. M. et al. Avaliação da Velocidade Específica de Crescimento Radial de Fungos em Óleo Vegetal Residual. **Revista de Estudos Ambientais**. pp 29-40, 2015.
- DESHMUKH, S. K; VEREKAR, S. A. Isolation of keratinophilic fungi from selected soils of Sanjay Gandhi National Park, Mumbai (India). **Journal de Mycologie Medicale**. 2014.
- DRAMAE, A; et al. Heptacyclic oligophenalenones from the soil fungus *Talaromyces bacillisporus* BCC17645. **Tetrahedron**. 2020.
- GLASSMEYER, S. T. et al. Disposal practices for unwanted residential medications in the United States. **Environment International**. pp. 566-572, 2009.
- KANTOR, T. G. Ibuprofen. **American College Of Physicians**. pp. 877-882, New York. 1979.
- MCINTYRE, M.; MÜLLER, C.; DYNESSEN, J.; NIELSEN, J. Metabolic Engineering of the Morphology of *Aspergillus*. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.73, p.103-128, 2001.
- RASTOGI, A., TIWARI, M. K., GHANGREKAR, M. M. A review on environmental occurrence, toxicity and microbial degradation of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs). **J Environ Manage**. 2021.
- REN, Z. et al. Ibuprofen Degradation using a Co-doped carbono matrix derived from peat as a peroxymonosulphate activator. **Environmental Research**. 2021.
- SEKIGUCHI, J; GAUCHER, G.M. Conidiogenesis and secondary metabolism in *Penicillium urticae*. Appl. Environ. **Microbiol**. 33, 147–158. 1977.
- VIVEKANANDHAN, P; BEDINI, S; SHIVAKUMAR, M. S. Isolation and identification of entomopathogenic fungus from Eastern Ghats of South Indian forest soil and their efficacy as biopesticide for mosquito control. **Parasitology International**. 2020.
- ZANG, Y; et al. Multioxidized aromatic polyketides produced by a soil-derived fungus *Penicillium canescens*. **Phytochemistry**. 2021.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amapá* (FAPEAP); conceder nº. 88887.568501/2020-00, a *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) nº. 88881.716142/2022-01 pelo apoio financeiro. Beatriz L. Ferreira e Irlon M. Ferreira agradece as bolsas financiadas pela *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) nº. 88887.637671/2021-00 (PDPG) e 88881.716142/2022-01 (PROCAD-AMAZONIA-DRI), respectivamente.