

Diversidade da microbiota de fungos da própolis in natura

Diversity of in natura propolis fungal microbiota

DOI: 10.34188/bjaerv4n4-122

Recebimento dos originais: 20/08/2021

Aceitação para publicação: 25/09/2021

Mariza Alves Ferreira

Doutora em Ciências Agrárias pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, UFRB, Brasil

Instituição: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia/ Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas/ Cruz das Almas -BA, Brasil

Endereço: Rua Rui Barbosa, 710, Centro - Cruz das Almas - BA - CEP: 44.380-000

E-mail: marizaufbr@yahoo.com

Rodrigo Arthur Fonseca Costa

Doutor em Agrobiotecnologia pela Universidade de Salamanca, USAL, Espanha

Instituição: Instituto Politécnico de Bragança/ Centro de Investigação de Montanha/ Bragança, Portugal

Endereço: Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5300-253, Bragança, Portugal.

E-mail: rodlion2000@msn.com

Aline Simões da Rocha Bispo

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Brasil

Instituição: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia/ Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas / Cruz das Almas -BA, Brasil

Endereço: Rua Rui Barbosa, 710, Centro - Cruz das Almas - BA - CEP: 44.380-000

E-mail: alinesimoesbispo@gmail.com

Altino Branco Choupina

Doutor em Biotecnologia, Universidade Técnica de Lisboa, ULisboa, Portugal

Instituição: Instituto Politécnico de Bragança/ Departamento de Biologia e Biotecnologia
Endereço: Escola Superior Agrária, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855, Bragança, Portugal

E-mail: albracho@ipb.pt

Norma Suely Evangelista-Barreto

Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil

Instituição: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia/ Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas-CCAAB/ Cruz das Almas -BA

Endereço: Rua Rui Barbosa, 710, Centro - Cruz das Almas - BA - CEP: 44.380-000

E-mail: nsevangalista@ufrb.edu.br

Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

Doutor em Entomologia pela Universidade de São Paulo, USP, Brasil

Instituição: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia/ Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas-CCAAB/ Cruz das Almas -BA

Endereço: Rua Rui Barbosa, 710, Centro - Cruz das Almas - BA - CEP: 44.380-000

E-mail: calfredo@ufrb.edu.br

Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho

Doutora em Ciências pela Universidade do Minho, UMINHO, Portugal
Instituição: Instituto Politécnico de Bragança/ Centro de Investigação de Montanha/ Bragança,
Portugal
Endereço: Escola Superior Agrária, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855
Bragança, Portugal
E-mail: leticia@ipb.pt

Geni da Silva Sodré

Doutora em Entomologia pela Universidade de São Paulo, USP, Brasil
Instituição: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia/ Centro de Ciências Agrárias
Ambientais e Biológicas-CCAAB/ Cruz das Almas -BA
Endereço: Rua Rui Barbosa, 710, Centro - Cruz das Almas - BA - CEP: 44.380-000
E-mail: geni@ufrb.edu.br

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo realizar a identificação dos fungos encontrados na própolis produzido por *Apis mellifera* L. da Baía do Iguape, Brasil. Para tanto, foram utilizadas técnicas morfológicas, bioquímicas e moleculares, sendo averiguado o perfil de restrição gerado por espaçador interno transcrito (ITS1 e ITS4). O tamanho dos produtos de PCR foi analisado quanto ao perfil de restrição obtidos com endonuclease (HhaI, HaeIII e HinfI) por espécie. Foram identificadas dezesseis espécies de fungos filamentosos: *Flavodon flavus*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium* sp., *Coniothyrium sidae*, *Didymella* sp., *Paecilomyces variotii*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium citrinum*, *Fusarium incarnatum*, *Penicillium chermesinum*, *Phoma* sp., *Stagonosporopsis valerianellae*, *Phoma medicaginis*, *Paraphoma fimeti* e *Stagonosporopsis cucurbitacearum*; e seis espécies de leveduras: *Candida tropicalis*, *Candida guiliermondii*, *Candida famata*, *Kodomala ohmeri*, *Trichosporon asahiu* e *Cryptococcus laurentii*. *Stagonosporopsis cucurbitacearum* e leveduras pertencentes ao gênero *Candida* foram os microrganismos de maior ocorrência nas amostras da própolis provenientes da Baía do Iguape, Brasil.

Palavras-chave: ITS, endonucleases, *Stagonosporopsis cucurbitacearum*, *Candida* sp.

ABSTRACT

This study aimed to identify the fungi found in propolis produced by *Apis mellifera* L. from Baía do Iguape, Brazil. For this purpose, morphological, biochemical and molecular techniques were used, and the defined profile generated by an internal transcribed spacer (ITS1 and ITS4) was investigated. The size of the PCR products was analyzed for the endonuclease selection profile (HhaI, HaeIII and HinfI) by type. Sixteen species of filamentous fungi were identified: *Flavodon flavus*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium* sp., *Coniothyrium sidae*, *Didymella* sp., *Paecilomyces variotii*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium citrinum*, *Fusarium incarnatum*, *Penicillium chermesinum*, *Phoma* sp., *Stagonosporopsis valerianellae*, *Phoma medicaginis*, *Paraphoma fimeti* e *Stagonosporopsis cucurbitacearum*; and six yeast species: *Candida tropicalis*, *Candida guiliermondii*, *Candida famata*, *Kodomala ohmeri*, *Trichosporon asahiu* e *Cryptococcus laurentii*. *Stagonosporopsis cucurbitacearum* and yeasts belonging to the *Candida* genus were the most common microorganisms in propolis from Baía do Iguape, Brazil.

Keywords: ITS, endonucleases, *Stagonosporopsis cucurbitacearum*, *Candida* sp.

1 INTRODUÇÃO

Os produtos apícolas apresentam compostos químicos que lhes conferem propriedades biológicas de interesse tanto para as indústrias farmacêuticas quanto de alimentos. A própolis é uma substância resinosa coletada pelas abelhas em diversas fontes vegetais, constituída por compostos químicos, aminoácidos e substâncias inorgânicas, despertando interesse para os estudos sobre seu potencial biológico (SIRIPATRAWAN; VITCHAYAKITTI, 2016).

Vários estudos relatam as propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral da própolis (CHEN et al., 2018; FRANCHIN et al., 2018; SEIBERT et al., 2019; SANTOS et al., 2019), as quais têm atraído muito a atenção dos pesquisadores a explorar seu potencial, principalmente na medicina e indústria alimentícia. De fato, estes estudos são realizados nos extratos da própolis, havendo, portanto, carência de estudos que evidenciem suas características *in natura*.

Sabe-se que fungos filamentosos e leveduras são microrganismos de grande importância ecológica e agrônômica, visto que apresentam efeitos econômicos fundamentais para a utilização em processos biotecnológicos, com obtenção de biomoléculas que apresentem potencial para aplicação em diferentes segmentos industriais (agrícola, alimentícia, medicina e farmacêutica) (RAJA et al., 2017). Além disso, são microrganismos amplamente utilizados no controle biológico e processos de biorremediação e bioprospecção, que podem gerar a descoberta de novas espécies agronomicamente promissoras (HUMBER et al., 2016).

Em virtude disso, conhecer os fungos presentes na própolis, que podem ser oriundos dos solos, das plantas, das matérias primas, do processamento e armazenamento, se torna necessário, a fim de se estabelecer a sua biodiversidade e tipo de relação ambiental (ALMUHAYAWI, 2020). Para isso, a identificação é crucial, uma vez que há uma riqueza de informações sobre suas funções associadas a uma correta identificação (HOUBRAKEN; SAMSON, 2017).

As características morfológicas são de fundamental importância para a identificação dos fungos, relatando aspectos indispensáveis para a realização de uma classificação macro e microscópicas, além de definir sobre sua velocidade de crescimento (KIM et al., 2011). O mesmo não ocorre na identificação das leveduras, que deve ser realizada, principalmente, por características fisiológicas e/ou moleculares, visto que, sua morfologia não é diversificada, dificultando a distinção entre os gêneros (STUBIGER et al., 2016; MINAMI et al., 2003).

Com o avanço da biologia, as técnicas moleculares surgiram para possibilitar uma abordagem complementar e abrangente em relação às técnicas convencionais que englobam os métodos morfológicos e bioquímicos, permitindo elucidar características da variabilidade genética e taxonômica das espécies (DAS et al., 2014). Assim, a utilização do espaçador interno transcrito

(ITS) para amplificação e sequenciamento do DNA ribossomal, representa uma ferramenta útil na identificação de vários grupos de espécies de fungos, auxiliando na inferência do potencial biotecnológico destes microrganismos, pois apresenta vasta descrição nos bancos de dados públicos (SCHOCH et al., 2012).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi identificar a microbiota fúngica da própolis in natura proveniente de *Apis mellifera* L. da Baía do Iguape, Bahia, Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DOS FUNGOS

As coletas de própolis de *Apis mellifera* foram realizadas mensalmente ao longo de um ano, em três apiários situados no entorno da Baía do Iguape, Bahia, Brasil (12° 45' S; 38° 53' W), somando 36 amostras. Isolados de fungos filamentosos foram transferidos para placas de Petri contendo meio Sabouraud Dextrose 50%. Estes isolados foram preservados, em duplicata, pelo método de Castellani (1963). Para o cultivo dos isolados de leveduras foi utilizado o meio Ágar DG-18 (Dichloran Glycerol) e conservados em água e glicerol, no freezer.

Após ativar em meio sólido, os fungos foram agrupados de acordo com suas características macroscópicas, evidenciadas na cor da colônia (frente e verso), textura da superfície (frente e verso) e aspecto da borda, condições de crescimento e aspectos visíveis do desenvolvimento; e características microscópicas como o comprimento e forma dos conidióforos, textura e tamanho dos conídios. Desta forma, dos 97 isolados, foram selecionados dezesseis tipos de fungos filamentosos e seis tipos de leveduras.

A identificação das leveduras foi realizada com o kit API 20C AUX (BioMérieux). Após cultivo em meio YEPD durante 48 horas, procedeu-se a preparação dos testes conforme indicado no protocolo do fabricante. Após preenchimento das cúpulas com a suspensão, as galerias foram incubadas a 27°C e os resultados observados após 24, 48 e 72 horas de incubação. Os resultados foram interpretados de acordo com a turbidez de cada cúpula e a identificação foi obtida a partir de um perfil numérico constituído por sete algarismos, a partir da base de dados (V4.0) do programa *apiweb*.

2.2 EXTRAÇÃO DO DNA

As extrações de DNA foram efetuadas em tubos Eppendorf de 1,5 mL. As leveduras foram cultivadas em 10 ml de meio YPD líquido a 28°C com agitação de 180 rpm durante 48 horas. O volume total foi centrifugado a 4700 rpm durante 10 minutos e ressuspensão em 0,5 ml de água ultrapura estéril. O volume foi transferido para um tubo Eppendorf e, novamente, centrifugado

durante 5 segundos. Foram adicionados 0,2 ml de solução de extração de leveduras (2% Triton X - 100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 Mm Tris HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) com 0,2 ml de fenol - clorofórmio e 0,3 g de esferas de vidro (0,5 mm). Foi agitado em vortex durante 5 ciclos de três minutos (vortex-gelo).

Após adicionados 0,2 ml de TE, efetuou-se uma centrifugação durante 5 minutos. Em seguida, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, sendo adicionado 1 ml de etanol 100%, a mistura ocorreu, manualmente, por inversão. O material foi centrifugado durante 2 minutos e ressuspenso em 0,4 ml de TE pH 8,0. Foi adicionado 30 µg de RNase e incubado durante 5 minutos a 37 °C. Após limpeza do RNA, a mistura foi incubada durante 30 minutos em temperatura de -80°C, adicionado 10 µl de acetato de sódio 4M e 1 ml de etanol 100%. Foi misturado manualmente por inversão e em seguida centrifugado durante 2 minutos. O precipitado foi lavado com 0,5 ml de etanol 70%. Por fim, foi ressuspenso em 30 µl de TE.

Para os fungos filamentosos foi utilizada a técnica de extração do DNA genômico com nitrogênio líquido. Após crescimento em meio BDA durante 6 dias, foi realizada a extração dos micélios. O processo de extração consistiu na utilização de uma solução de lise: Tris-HCL 200 mM; EDTA 25 mM; NaCl 250 mM e SDS 0,5 (p/v); seguido de uma desnaturação de proteínas com fenol/clofórmio/álcool-isoamílico (25:24:1) e precipitação do DNA por lavagem com etanol (100% e 70%) a -20°C, sendo o sedimento de DNA posteriormente dissolvido em água ultrapura autoclavada.

2.3 CONDIÇÕES DA PCR - POLYMERASE CHAIN REACTION

As condições de PCR foram: desnaturação inicial a 95°C; 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, hibridação a 55,5°C durante 2 minutos e extensão a 72°C durante 2 min; e extensão final a 72°C durante 10 minutos, utilizando 100 ng de DNA genômico, 0,5 mM de cada iniciador, 10 mM desoxinucleótidos, MgCl₂ 1,5 mM, 0,3 µl de Taq polimerase, e tampão Buffer (10X).

2.4 QUANTIFICAÇÃO DE DNA

Para a quantificação do DNA foi realizada uma leitura a 260 nm em espectrofotômetro. Este método baseia-se na quantidade de radiação absorvida pelas bases nucleotídicas constituintes de DNA, segundo a lei de Lambert -Beer:

$$A = c.L\varepsilon$$

Sendo A - absorvância da solução; c - concentração solução; L - percurso ótico atravessado pela radiação (1 cm); ε – absortividade específica ($9,6 \times 10^3 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

As leituras das densidades óticas foram efetuadas a dois comprimentos de ondas, 260 nm e 280 nm. Sendo assim, o grau de pureza do DNA foi calculado através da razão entre os valores de absorvância (A_{260}/A_{280}). Após a obtenção das leituras foram efetuados os cálculos baseados na equação descrita acima, obtendo - se a concentração final de DNA de 80 ng / μ l.

2.5 VISUALIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO POR GEL DE AGAROSE

A visualização e separação dos fragmentos de DNA foram realizadas mediante eletroforese em gel de agarose (0,8%) p/v. Os géis foram preparados com TAE 1X (Tris acetato 40 mM pH 8.0 e EDTA 1 mM) com greenSafe, durante 40 minutos a uma intensidade de corrente de 80V. Após a irradiação do gel por ultravioleta visualizou - se o tamanho de intensidade das bandas pretendidas por comparação com o marcador molecular (1KB). As purificações dos produtos PCR foram feitas por meio do Kit comercial PCR Clean - UP System (Promega®).

2.6 PRIMERS E DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

A região de interesse foi amplificada utilizando aparelho termociclador UNO II Biometra® Thermocycler. Os pares de primers usados para amplificação da região ITS foram ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGAT ATGC-3').

Os produtos de PCR (cerca de 0,5 - 1,0 mg) foram digeridos com as enzimas de restrição endonucleases de *Hha*I, *Hae*III e *Hinf* I (Promega, Madison, Wis), as amostras foram incubadas a 37°C durante 16 horas. Os fragmentos foram separados em 1.5% e 3% de géis de agarose, respectivamente, com 1 x TAE (Tris-ácido acético-EDTA). A dimensão dos fragmentos foi estimada em pares de bases por comparação com o marcador de tamanhos de 100 bp Ladder (Promega) no programa NEBcutter, versão 2.0.

2.7 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISES FILOGENÉTICAS

As sequenciações completas dos nucleotídeos foram realizadas no Laboratório 314 do serviço de sequenciação de DNA, na Universidade de Salamanca (USAL), Salamanca - Espanha. As sequências de nucleotídeos foram alinhadas no programa BioEdit (*European Bioinformatics Institute*, EBI). A sequência final do fragmento foi analisada pelo programa FASTA (PEARSON e LIPMAN, 1988) disponibilizado na web pelo European Bioinformatics Institute (EBI) e nas bases de dados da EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*). O alinhamento das sequências e a árvore filogenética foram geradas no programa Mega 7.0 (KUMAR et al., 2016), a construção da árvore seguiu o método Neighbor-joining (SAITOU; NEI, 1987) utilizando a técnica da Máxima Probabilidade Composta (TAMURA et al. 2004).

Para a análise descritiva das sequências utilizou-se o programa DnaSP v.5.1 (LIBRADO; ROZAS, 2009) com número de haplótipos mitocondriais (h), o índice de diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (π) e diferenças nucleotídicas (k).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme listados na Tabela 1, foram identificadas 16 espécies de fungos filamentosos e 06 espécies de leveduras, isoladas da própolis (n=36). Os fungos filamentosos estiveram distribuídos em espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Stagonosporopsis*, *Coniothyrium*, *Didymella*, *Flavodon*, *Fusarium*, *Paecilomyces* e *Paraphoma*. Relativamente às leveduras, foram identificadas três espécies distintas do gênero *Candida*, além dos gêneros *Kodoma*, *Trichosporon* e *Cryptococcus*.

Após o alinhamento foi obtida uma matriz de 751pb, com frequência nucleotídica média de Timina = 31,45%, Adenina = 26,74%, Citosina = 20,34% e Guanina = 21,47%. A diversidade haplotípica (Hd) foi considerada alta, com valor médio de 1,000; a diversidade nucleotídica (π) foi 0,33383 e o número médio de diferenças nucleotídicas foi (K) 83,79167. Para os testes de neutralidade o D de Tajima (TAJIMA 1989) apresentou valor de -0,63164 ($P > 0,10$). O teste de Fu e Li, valor de -0,31087, estatisticamente não significativos ($P > 0,10$).

Dados obtidos no GenBank a partir das sequências nucleotídicas, permitem constatar que a espécie *Stagonosporopsis cucurbitacearum* esteve presente em aproximadamente 25% das amostras analisadas, além de ter sido encontrado em todos os apiários avaliados. Segundo Stewart et al. (2015), *S. cucurbitacearum* (syn. *Didymella bryoniae*), é um patógeno causador do crestamento gomoso em hastes e folhas, causando a podridão negra dos frutos em cucurbitáceas. Trata-se de um fungo de ocorrência mundial que infecta vários tipos de cucurbitáceas, incluindo melancia (*Citrullus lanatus*), pepino (*Cucumis sativus*), mamão (*Carica papaya*) e melão (*Cucumis melo*) (STEWART et al., 2015).

Fatores como estresse devido à escassez de água e seca, baixa fertilidade das plantas e sua alta densidade no campo, presença de ervas daninhas e o aumento da temperatura do ambiente contribuem para o desenvolvimento dos fungos e conseqüentemente, das toxinas e metabólitos (MEHRABAN et al., 2019). Esses fungos, provenientes do meio ambiente, desempenham um papel importante nos ecossistemas, promovem a fixação do carbono, decompõem a matéria-orgânica e promovem interação com plantas vasculares.

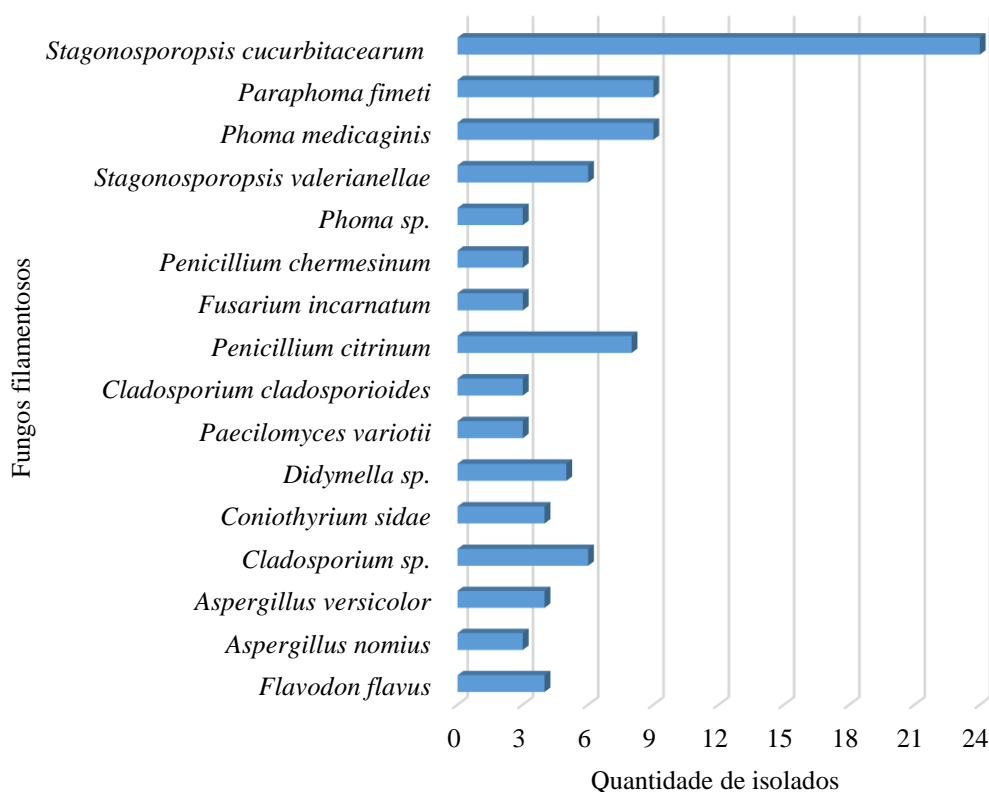
Muitas espécies podem ser utilizadas no biocontrole, e seus metabólitos secundários e enzimas de importância biotecnológica são requisitados na medicina e na agricultura (DRESCH et al., 2019).

Tabela 1. Resultados obtidos com a sequenciação da região ITS para os fungos filamentosos isolados da própolis proveniente da Baía do Iguape, Brasil, seguida do tamanho em pares de bases (pb) dos produtos de PCR.

TIPO	ESPÉCIE	GenBank	pb
1	<i>Flavodon flavus</i>	KF856505	531
2	<i>Aspergillus nomius</i>	DQ323036	493
3	<i>Aspergillus versicolor</i>	KC460863	508
4	<i>Cladosporium</i> sp.	HQ006134	646
5	<i>Coniothyrium sidae</i>	KF251149	484
6	<i>Didymella</i> sp.	DQ092504.1	475
7	<i>Paecilomyces variotii</i>	FJ895878	538
8	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	KR673902	504
9	<i>Penicillium citrinum</i>	JF343217	542
10	<i>Fusarium incarnatum</i>	AB975330	540
11	<i>Penicillium chermesinum</i>	KM405640	525
12	<i>Phoma</i> sp.	HQ637319	483
13	<i>Stagonosporopsis valerianellae</i>	KP128007	488
14	<i>Phoma medicaginis</i>	KF060273	553
15	<i>Paraphoma fimeti</i>	KJ701533	548
16	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>	KM246252	482

A quantidade de isolados obtidos dentro de cada espécie dos fungos filamentosos são exibidas na Figura 1, onde as espécies *Phoma medicaginis*, *Paraphoma fimeti* e *Phoma* sp. estiveram presentes em quantidades, também, consideráveis (21%). O gênero *Phoma* (Pleosporales) inclui mais de 2000 espécies que estão agrupadas em nove seções, ou seja, *Phoma*, *Heterospora*, *Paraphoma*, *Peyronellaea*, *Phyllostictoides*, *Sclerophomella*, *Plenodomus*, *Macrospora* e *Pilosa*, de acordo com suas características morfológicas. No Brasil este patógeno está bastante relacionado às manchas das folhas do cafeeiro. A seção *Paraphoma* é altamente polifilética dentro da ordem Pleosporales e inclui os gêneros *Coniothyrium* (Coniothyriaceae), *Paraphoma*, *Setophoma* (haeosphaeriaceae), *Pyrenochaeta* e *Pyrenochaetopsis* (Cucurbitariaceae) (CHEN et al., 2015; GRUYTER et al., 2013; GRUYTER et al., 2010). Os compostos ativos de espécies de *Phoma* apresentam grande potencial para a indústria de alimentos, cosméticos e farmacêuticos (HUSSAIN et al., 2014).

Figura 1. Quantidade de isolados obtidos dentro de cada espécie de fungo filamentososo isolado da própolis proveniente da Bafa do Iguape, Brasil.



O fungo *Cladosporium cladosporioides* foi observado em 3.1% dos isolados analisados. Diversos fungos endofíticos apresentam potencial de síntese para metabólitos bioativos que podem ser utilizados como potencial terapêutico na formulação de novos fármacos antimicrobianos (SETO et al., 2005). Khan et al. (2016), relatam a ação antibacteriana de metabólitos extraídos do *Cladosporium cladosporioides* endofíticos da *Rauwolfia serpentina* no controle da *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus megaterium*.

Paecilomyces variotii também ocorreu em 3.1% dos isolados obtidos da própolis. Pertencente ao Filo Ascomycota, membro da família Trichocomaceae, pode ser encontrado em alimentos, no ar, em madeira, e no solo; é um fungo importante, também, na produção de tanase e fitase, que são enzimas utilizadas para alimentação animal. A estirpe de *P. variotii*, por meio da fermentação em estado sólido, é promissora na produção de biodiesel no Brasil, utilizando resíduos da mamona (MADEIRA et al., 2011).

Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* somaram 18.52% dos isolados encontrados nas amostras analisadas. Algumas espécies destes fungos apresentam importância econômica por serem produtores de diversos metabólitos e enzimas de considerável valor na indústria biotecnológica (HOUBRAKEN et al., 2014), que exercem função biológica benéfica para a indústria farmacêutica

e ambiental, todavia algumas espécies são patogênicas. Algumas espécies de *Aspergillus* têm potencial para a produção de aflatoxinas, causando preocupação aos produtores, processadores e comerciantes, devido às perdas econômicas nos produtos infestados. *Aspergillus nomius*, foi constatado em 3.0% das amostras, sendo uma espécie produtora de aflatoxinas, uma substância cancerígena e maléfica à saúde humana.

Nesse estudo, a ocorrência do *Penicillium citrinum* foi de 8.2%, e do *Penicillium chermesinum* foi de 3.1%. Por ser um fungo mesófilo *P. citrinum* ocorre em todo o mundo, sendo produtor de citrinina, uma micotoxina com ação nefrotóxica, usualmente utilizada na inibição do crescimento de bactérias (HOUBRAKEN et al., 2010).

Na própolis avaliada, *Aspergillus versicolor* e *Fusarium incarnatum* estavam presentes em 4.12 % e 3.1% dos isolados, respectivamente. Estudos sobre a tolerância a fenol de estirpes fúngicas de *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Graphium* spp., relatam que estas apresentaram elevadas taxas de degradação (SANTOS; LINARDI, 2004). Karatay e Donmez (2014), constataram que *A. versicolor* pode tolerar altas concentrações de fenol, apresentando eficiência de remoção de 41.6% em 144 horas de incubação, sugerindo que essa espécie, apresenta potencial para biorremediação.

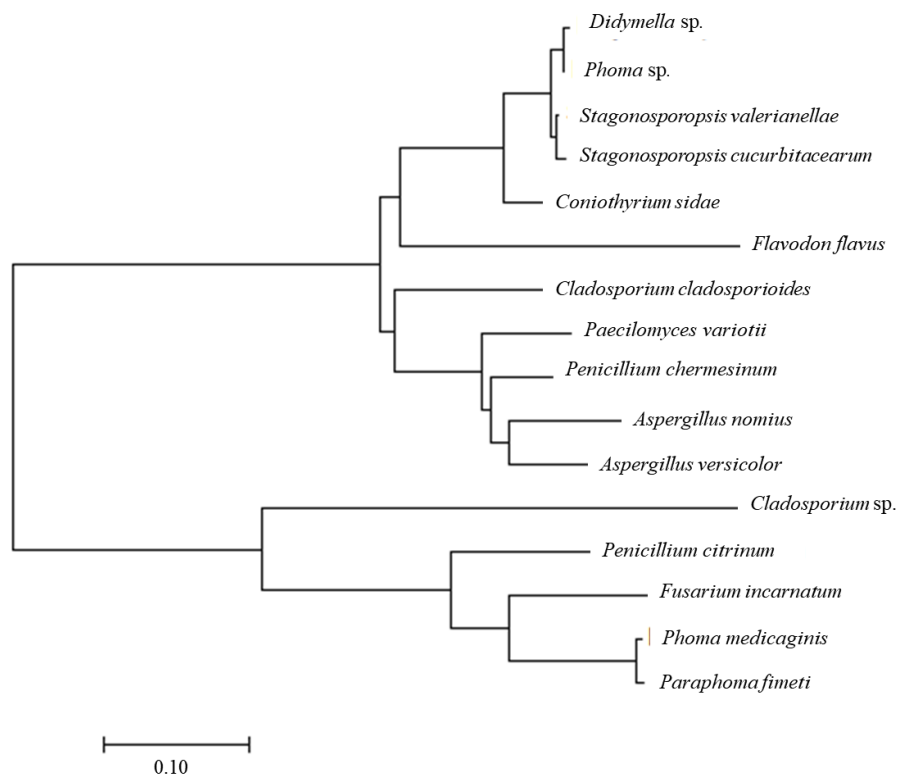
Para confirmação dos resultados foi realizado o perfil das endonucleases de restrição *HhaI*, *Hae III* e *HinfI* nas sequências de nucleotídeos obtidas dos fungos filamentosos e conferidos de acordo com o banco de dados NEBcutter (VINCZE et al., 2003). Os 16 produtos de PCR obtidos por amplificação da sequenciação das regiões ITS, apresentaram de 475 a 646 pb, sendo clivados com as enzimas *HhaI*, *HaeIII* e *HinfI*. Foram considerados os fragmentos com tamanho acima de 100 pb, constatando-se de 2 a 3 clivagens/enzima de restrição (Tabela 2). A enzima *HaeIII* não clivou os fungos *Flavodon flavus*, *Coniothyrium sidae*, *Didymella* sp., *Cladosporium cladosporioides*, *Phoma* sp., *Stagonosporopsis valerianellae* e *Stagonosporopsis cucurbitacearum*.

Tabela 2. Tamanho dos pares de bases (pb) dos produtos de PCR e os fragmentos de restrição obtidos a partir da análise 5.8S-ITS das espécies e fungos filamentosos isolados da própolis proveniente da Baía do Iguape, Brasil.

Espécie	AP (bp)	Fragmentos de Restrição		
		HhaI	HaeIII	HinfI
<i>Flavodon flavus</i>	531	416+115	ND	206+177+148
<i>Aspergillus nomius</i>	493	183+183+126	294+199	244+241
<i>Aspergillus versicolor</i>	508	249+177	352+156	273+118+117
<i>Cladosporium sp.</i>	646	293+247+106	398+248	448+353
<i>Coniothyrium sidae</i>	484	241+193	ND	212+147+123
<i>Didymella sp.</i>	475	213+140+104	ND	202+149+124
<i>Paecilomyces variotii</i>	538	295+243	281+162	287+251
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	504	263+241	ND	262+242
<i>Penicillium citrinum</i>	542	320+181	252+203	371+171
<i>Fusarium incarnatum</i>	540	263+249	189+161+132	357+183
<i>Penicillium chermesinum</i>	525	182+193+151	351+175	270+256
<i>Phoma sp.</i>	483	241+229	ND	212+149+123
<i>Stagonosporopsis valerianellae</i>	488	239+186	ND	210+156+123
<i>Phoma medicaginis</i>	553	183+172+155	310+243	374+179
<i>Paraphoma fimeti</i>	548	183+172+154	287+262	371+178
<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>	482	239+179	ND	210+149+123

Na Figura 3 são relatadas as relações evolutivas, expressas a partir da árvore filogenética Neighbor-Joining gerada a partir dos dados de sequenciação identificados com o auxílio do GenBank. Os fungos *Flavodon flavus* e *Cladosporium sp.* apresentaram seções isoladas dos demais, demonstrando pouca similaridade filogenética entre suas sequências nucleotídicas.

Figura 3. Árvore filogenética deduzida do alinhamento das sequências da região ITS dos fungos filamentosos isolados da própolis proveniente da Baía do Iguape, Brasil, construída no programa MEGA 7.0 (A história evolutiva foi inferida usando o método de Máxima Probabilidade Composta Neighbor-Joining com a soma do comprimento da ramificação = 2.05998283. Codon posições incluídas foram 1 + 2 + 3 + Noncoding)



Didymella sp. e *Phoma* sp., apresentaram-se em diferentes posições de agrupamento em relação a *Phoma medicaginis* e *Paraphoma fimeti*, o que sugere haver diferenças filogenéticas e/ou evolutivas entre estas espécies. Em 2009, a família Didymellaceae foi introduzida como tal, incluindo, o gênero *Didymella* e os membros de *Phoma* relacionados a sua forma assexuada. O gênero *Phoma* apresenta uma grande diversidade de espécies podendo ser encontrado no solo, no ar, nas plantas e nos animais, inclusive em seres humanos (CHEN et al., 2015).

A identificação das leveduras isoladas da própolis foi efetuada, por meio da análise bioquímica. Devido a rapidez e ao baixo custo dos kits de identificação para leveduras, esse método é bastante utilizado em diagnósticos clínico, industrial e para controle de qualidade (CARVALHO et al., 2010).

Para leveduras foi possível observar a presença de *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida famata*, *Kodomaia ohmeri*, *Trichosporon asahiu* e *Cryptococcus laurentii*. *Candida* é um gênero que pode ser facilmente encontrada no corpo do homem e de animais, colonizando a pele e mucosas dos tratos digestivo e urinário, bucal e genital, sendo a *C. albicans*, a mais relatada, seguida de *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (HORN et al., 2009; PANIZO et al., 2009).

Há poucos relatos de pesquisas sobre identificação de fungos isolados da própolis para posterior investigação como promotores de substâncias que possam contribuir para a saúde humana e animal. Uma pesquisa realizada em 2013, relatou a existência de vinte e dois isolados, que após identificação foram testados para a produção de metabólitos antimicrobianos. O autor identificou as espécies: *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Bipolaris hawaiiensis*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium purpurogenum*, *Pestalotiopsis palustris*, *Tetracoccosporium paxianum* e *Trichoderma koningii*. Ressaltando que a própolis é uma fonte promissora de fungos, que produzem agentes ativos contra bactérias particularmente, responsáveis por intoxicações alimentares relevantes (SOUZA et al., 2013).

4 CONCLUSÃO

O fungo filamentosso *Stagonosporopsis cucurbitacearum* e as leveduras pertencentes ao gênero *Candida* foram os microrganismos de maior ocorrência nas amostras da própolis provenientes da Baía do Iguape, Brasil.

A diversidade de fungos existentes na própolis remete a importância de estudos detalhados quanto ao potencial dessas espécies de microrganismos na produção de substâncias com princípios bioativos benéficos, para incrementar a produção de metabólitos de importância biotecnológica.

Conflitos de Interesse: "Os autores não declaram conflito de interesses."

REFERÊNCIAS

- ALMUHAYAWI, M. S. Propolis as a novel antibacterial agent. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 11, p.3079-3086, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.016>
- CARVALHO, M.; MEIRINHOS, S.; ESTEVINHO, L. M.; CHOUPINA, A. Yeast species associated with honey: different identification methods. **Archivos de Zootecnia**, p. 103 - 113, 2010.
- CASTELLANI, A. The “water cultivation” of pathogenic fungi. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.66, p. 283 - 284, 1963.
- CHEN, Q.; JIANG, J. R.; ZHANG, G. Z.; CAI, L.; CROUS, P. W. Resolving the Phoma enigma. **Studies in Mycology**, v.82, p. 137-217, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.10.003>
- CHEN, Y. W.; YE, S. R.; TING, C.; YU, Y. H. Antibacterial activity of propolis from Taiwanese green propolis. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.26, n. 2, p. 761-768, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.10.002>
- DAS, S.; DASH, H. R.; MANGWANI, N.; CHAKRABORTY, J.; KUMARI, S. Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v.103, p. 80-100, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.05.013>.
- DRESCH, F.; LANA, D. F. D.; MACIEL, M. J.. Avaliação das comunidades fúngicas encontradas em amostras de solo: uma revisão sistemática da literatura. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, v.10, n.6, p.67-76, 2019. DOI: <http://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2019.006.0007>
- FRANCHIN, M.; FREIRES, I. A.; LAZARINI, J. G.; NANI, B. D.; CUNHA, M. G.; COLÓN, D. F.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.153, p.49-55, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.050>
- GRUYTER, J. D.; WOUDEBERG, J. H. C; AVESKAMP, M. M.; VERKLEY G. J. M; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Systematic reappraisal of species in Phoma section Paraphoma, Pyrenochaeta and Pleurophoma. **Mycologia**, v.102, n.5, p.1066 – 1081, 2010. <https://doi.org/10.3852/09-240>.
- GRUYTER, J. D.; WOUDEBERG, J. H. C.; AVESKAMP, M. M.; VERKLEY, G. J. M.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Redisposition of Phoma-like anamorphs in Pleosporales. **Studies in Mycology**, v.75, n.1, p.1-36, 2013. <https://doi.org/10.3114/sim0004>
- HORN, D. L.; NEOFYTOS, D.; ANAISSIE, E. J.; FISHMAN, J. A.; STEINBACH, W. J.; OLYAEI, A. J.; MARR, K. A; PFALLER, M. A.; CHANG, C. H.; WEBSTER, K. M. Epidemiology and outcomes of candidemia 41 in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. **Clinical Infectious Diseases**, v.48, n.12, p.1695 - 1703, 2009. <https://doi.org/10.1086/599039>
- HOUBRAKEN, J. A. M. P.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. **Fungal Diversity**, v.44, p.117-133, 2010. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0047-z>

HOUBRAKEN, R. P. de V.; SAMSON, R. A. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Advances in Applied Microbiology**, v.86, p.199 - 249, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800262-9.00004-4>

HUSSAIN, H.; KOCK, I.; AHMED, A.H.; AHMED, K.A.R.; ABBAS, G.; GREEN, I.R.; SHAH, A.; BADSHAH, A.; SALEEM, M.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.J.; KROHN, K. Antimicrobial chemical constituents from endophytic fungus *Phoma* sp. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.7, n.9, p. 699-702, 2014. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60119-X](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60119-X).

HUMBER, R. A. Seeking stability for research and applied uses of entomopathogenic fungi as biological control agents, **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v.19, p. 1019 - 1025, 2016.

KARATAY, S. E.; DONMEZ, G. An economical phenol bioremoval method using *Aspergillus versicolor* and agricultural wastes as a carbon source. **Ecological Engineering**, v.73, p. 224 - 328, 2014.

KHAN, I. H.; SOHRAB, H.; RONY, S. R.; TAREQ, F. S.; HASAN, C. M.; MAZID, A. Cytotoxic and antibacterial naphthoquinones from an endophytic fungus, *Cladosporium* sp. **Toxicology Reports**, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2016.10.005>

KIM, J. Y.; YEO, S. H.; BAEK, S. Y.; CHOI, H. S. Molecular and morphological identification of fungal species isolated from Bealmijang Meju. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, p. 1270–1279, 2011. <https://doi.org/10.4014/jmb.1105.05013>

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v.33, n.7, p.1870 - 1874, 2016. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.

MADEIRA, J. V. Jr.; MACEDO, J. A.; MACEDO, G. A. Detoxification of castor bean residues and the simultaneous production of tanase and phytase by solid-state fermentation using *Paecilomyces variotii*. **Bioresource Technology**, v.102, n.15, p.7343 - 7348, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.099>

MINAMI, M.; KTA, M.; NAKAYA, T.; YAMAMOTO, T.; KURIYAMA, H.; IMANISHI, J. The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication in vitro. **Microbiology and Immunology**, v.47, n.9, p. 681 - 684, 2003. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2003.tb03431.x>.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP version 5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v.25, n.11, p.1451-1452, 2009. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>

MEHRABAN, A.; NASR, R.; ESLAMI, M.; AMROLLAHI, H. Molecular and morphological identification of fungi isolated from sour cherry, plum and apple fruit leather in Iran. **Gene Reports**, v.17, 100500, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2019.100500>

PANIZO, M. M.; REVIKINA, V.; DOLANDE, M.; SELGRAD, S. *Candida* spp. in vitro susceptibility profile to four antifungal agents. Resistance surveillance study in Venezuelan strains. **Medical Mycology**, v.47, n.2, p.137-143, 2009. <https://doi.org/10.1080/13693780802144339>

RAJA, H. A.; MILLER, A. N.; PEARCE, C. J.; OBERLIES, N. H. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 3, p. 756–770, 2017. [https://doi.org/ 10.1021/acs.jnatprod.6b01085](https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085)

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, n.4, p.406 – 425, 1987. [https://doi.org/ 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454).

SANTOS, V. L.; LINARDI, V. R. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents - identification and degradation potential. **Process Biochemistry**, v.39, p.1001-1006, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00201-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00201-2)

SANTOS, D. A.; MUNARI, A.M.; S. O.S.; S. FROZZA, T., BARCELLOS, J. A. P.; HENRIQUES, M., ELY, R. M. Brazilian red propolis extracts: study of chemical composition by ESI-MS/MS (ESI+) and cytotoxic profiles against colon cancer cell lines. **Biotechnology Research and Innovation**, v.3, n.1, p.1-11, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.biori.2019.02.001>

SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHNDORF, S; ROBERT, V.; SPOUGE J. L.; LEVESQUE, C. A.; CHEN, W. C. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v.109, n. 16, p. 6241-6246, 2012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>

SEIBERT, J. B.; BAUTISTA-SILVA, J. P.; AMPARO, T. R.; PETIT, A.; PERVIER, P.; ALMEIDA, J. C. S.; AZEVEDO, M. C.; SILVEIRA, B. M.; BRANDÃO, G.C.; SOUZA, G. H. B.; TEIXEIRA, L.F.M.; SANTOS, O. D. H. Development of propolis nanoemulsion with antioxidant and antimicrobial activity for use as a potential natural preservative. **Food Chemistry**, v. 287, p.61-67, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.078>

SETO, Y.; KOGAMI, Y.; SHIMANUKI, T.; TAKAHASHI, K.; MATSUURA, H.; YOSHIHARA, T. Production of phleochrome by *Cladosporium phlei* as stimulated by diketopiperadines of *Epichloe typhina*, **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 69, n.8, p.1515 - 1519, 2005. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.1515>

SIRIPATRAWAN, U.; VITCHAYAKITTI, W. Improving functional properties of chitosan films to be used as active food packaging by incorporation with propolis. **Food Hydrocolloids**, v.61, p. 695-702, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.001>

SOUZA, G. G.; PFENNING, L. H.; DE MOURA, F.; SALGADO, M.; TAKAHASHI, J. A. Isolation, identification and antimicrobial activity of propolis-associated fungi. **Natural Product Research**. v.27, n. 18, p.1705-1707, 2013. <https://doi.org/10.1080/14786419.2013.771348>.

STEWART, J. E.; TURNER, A. N.; BREWER, M. T. Evolutionary history and variation in host range of three *Stagonosporopsis* species causing gummy stem blight of cucurbits. **Fungal Biology**, v.119, n.5, p.370-382, 2015. [https://doi.org/ 10.1016/j.funbio.2014.12.008](https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.12.008).

STUBIGER, G.; WUCZKOWSKI, M.; MANCERA, L.; LOPANDIC, K.; STERFLINGER, K.; BELGACEM, O. Characterization of yeasts and filamentous fungi using MALDI lipid phenotyping. **Journal of Microbiological Methods**, v.130, p. 27 - 37, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.08.010>.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, n.3, p. 585-595, 1989. <https://doi.org/10.1093/genetics/123.3.585>.

TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**, v.101, v.30, p. 11030 - 11035, 2004. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>

VINCZE, T.; POSFAI, J.; ROBERTS, R. J. NEBcutter: um programa para clivar ADN com enzimas de restrição. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n.13, p. 3688 - 3691, 2003. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg526>