



## Otimização do crescimento e estudo da viabilidade de *Colletotrichum acutatum* e *C. nymphaea*

**Aluno:** Matheus Reis Pinto de Andrade

**Orientador:** Prof. Juliano Lemos Bicas (DCA/FEA)

### RESUMO

Estudos recentes têm demonstrado a potencial aplicação do *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum nymphaea* em processos biotecnológicos na biotransformação de monoterpenos, como limoneno e pineno, e também já foi reportado o uso de *C. acutatum* na biotransformação de trans-anetol. Por outro lado, o gênero *Colletotrichum* é também um gênero fúngico contendo diversas espécies fitopatógenas, causadoras de antracnose e ferrugem em diversas plantas. Sendo assim um gênero de grande importância na produção agrícola responsável por causar prejuízo na produção de diversos produtos. Desse modo, os fungos *C. nymphaea* e *C. acutatum* representam fungos de grande interesse biotecnológico e tal como importante seu controle na produção agrícola. Desta forma é de grande interesse otimizar seu crescimento para sua aplicação em biotransformações, tal como desenvolver um método para quantificar sua viabilidade celular para estudar sua resistência a fungicidas. Portanto, esse projeto teve como objetivo principal avaliar e otimizar o crescimento dos fungos *C. nymphaeae* e *C. acutatum* e desenvolver uma metodologia de avaliação da sua viabilidade celular.

O primeiro experimento realizado foi uma avaliação da padronização do inóculo por espectrofotometria, onde a avaliação foi feita a partir da coleta de esporos dos fungos em meio sólido YM, por meio da adição de 4 mL de solução salina 0,85% na placa, seguido de raspagem com alça de platina para retirada e

coleta desses esporos. A suspensão de esporos resultante foi coletada, sem filtração ou centrifugação, e analisada por espectrofotometria. Ao obter valores de absorvância a 600nm próximos aos pré-definidos (0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00), usando diferentes concentrações dessa solução, estas foram analisadas em câmara de Neubauer para contagem de esporos em cada suspensão. Sendo assim, foi possível estimar quão preditível é a correlação entre valor de absorvância e contagem de esporos.

Figura 1. Relação de valores de absorvância com quantidade de esporos em solução *C. acutatum*.

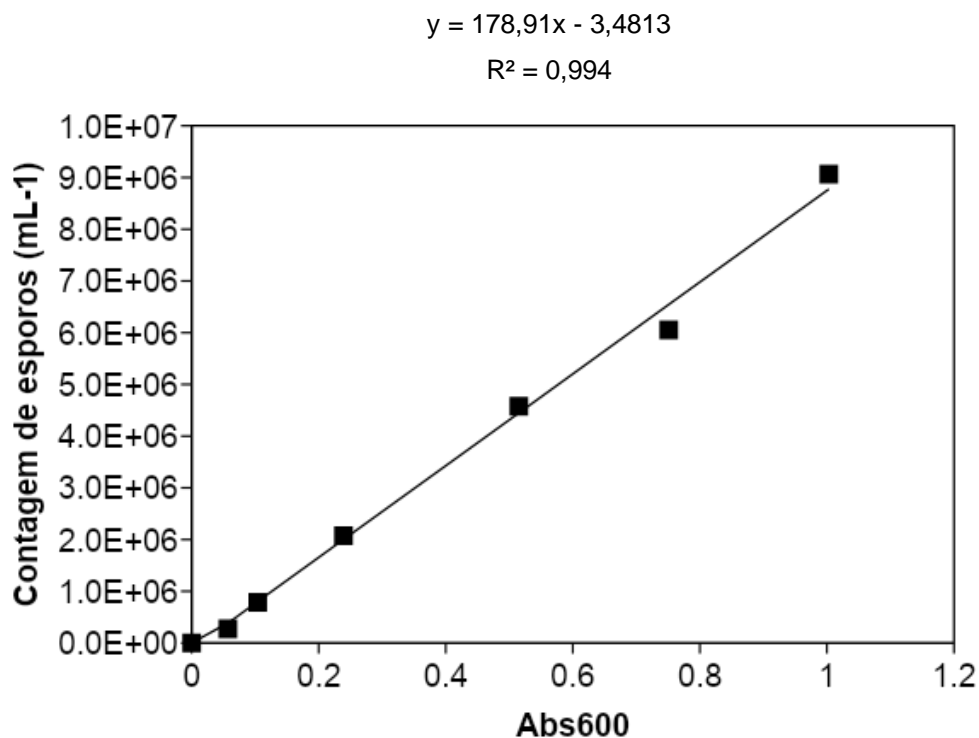
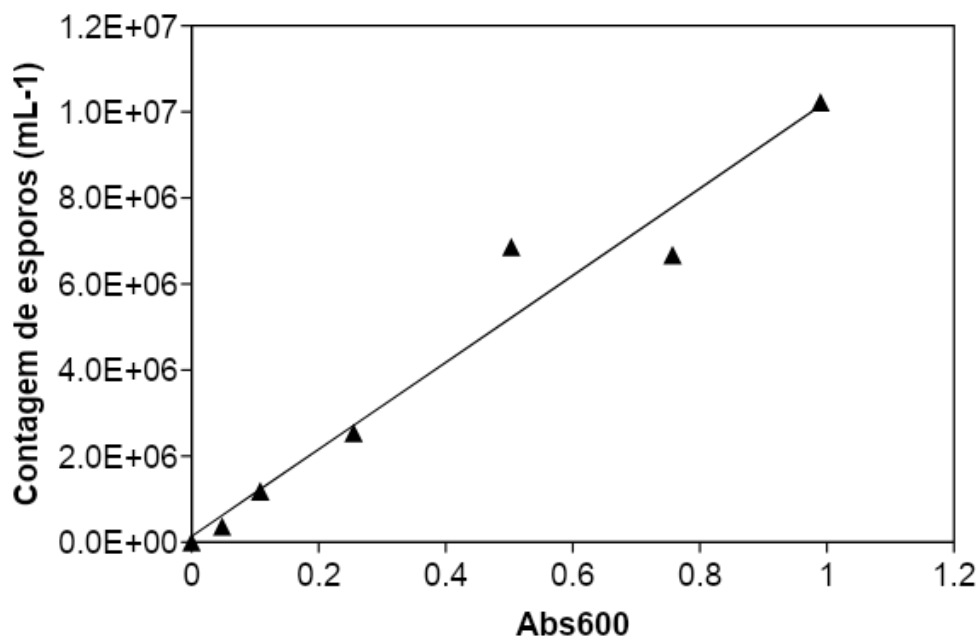


Figura 2. Relação de valores de absorvância com quantidade de esporos em solução *C. nymphaea* C864.

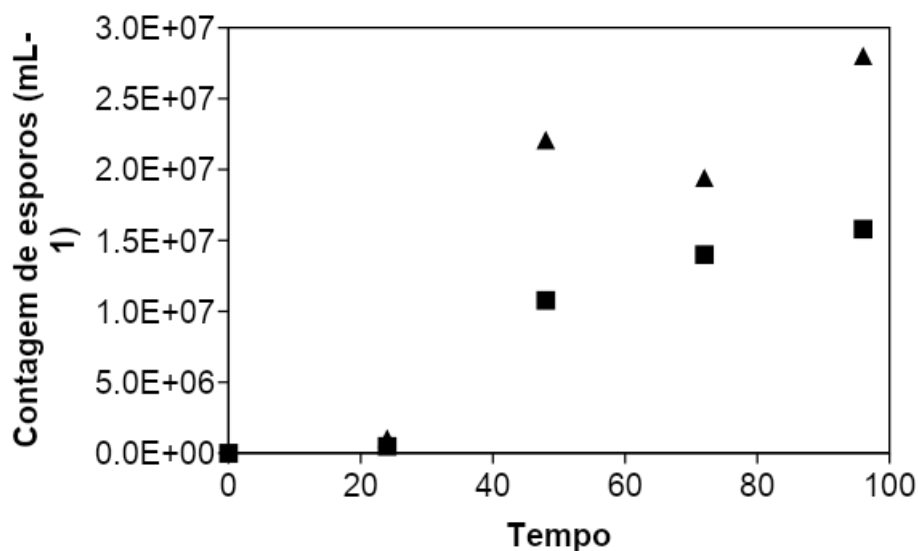
$$y = 200,45x + 3,9173$$
$$R^2 = 0,9463$$



Os resultados (Figuras 1 e 2) comprovaram a correlação linear prevista entre os valores de absorbância a 600 nm e contagem de esporos, sendo que a correlação foi melhor para *C. acutatum* do que para *C. nymphaea*. Para ambos os casos a curva foi semelhante, o que era esperado, dado que os dois fungos são próximos em termos filogenéticos. Os valores obtidos foram importantes para construção de uma curva padronizada, possibilitando a próxima etapa do projeto, ou seja, a determinação do número de esporos ao longo do crescimento fúngico em placa.

Em seguida, foi feita uma avaliação experimental da cinética da produção de esporos e crescimento do *C. acutatum* e *C. nymphaea* em meio sólido. A partir dos resultados obtidos no experimento de avaliação da padronização do inóculo por espectrofotometria, determinou-se número de esporos durante o crescimento do fungo em placa ao longo do tempo. Os esporos foram coletados de placas que continham as duas espécies de fungos, usando o mesmo procedimento do experimento citado anteriormente. A coleta destes esporos foi realizada 24, 48, 72 e 96 horas após o início do período de incubação, observando então a quantidade de esporos produzidos na medida em que o fungo crescia e se desenvolvia nas placas com o passar dos dias. Assim que coletados, a solução salina com os esporos foi avaliada por espectrofotometria e a absorbância foi convertida em concentração de esporos por meio do uso das curvas obtidas anteriormente (Figuras 1 e 2).

Figura 3. Cinética de produção de esporos e crescimento em meio sólido para *C. acutatum* (■) e *C. nymphaea* (▲)



Os resultados (Figura 3) demonstraram bom crescimento de ambas as espécies em meio sólido e indicam que a maior produção de esporos ocorre entre 24 e 48h de crescimento. Após este período há uma tendência à estabilização. A partir de 48h, a espécie *C. nymphaea* C864 apresentou um decaimento no valor de contagem na análise de 72 horas, para novamente aumentar após 96h. Acredita-se que este fato ocorreu devido a frutificação de esporos que culminaram no desenvolvimento de um micélio fúngico (não coletado), que futuramente produzira mais esporos, como foi confirmado na análise de 96 horas, onde notou-se um crescimento intenso na produção de esporos devido ao alto valor de absorvância resultante da solução coletada na placa. É possível também que este comportamento seja resultado de um erro experimental (de contagem).

Tinha-se planejado inicialmente mais dois experimentos, sendo eles a otimização do crescimento dos fungos *C. acutatum* e *C. nymphaea* em meio líquido e a avaliação da viabilidade celular durante o crescimento dos fungos *C. acutatum* e *C. nymphaea*, porém infelizmente, devido a pandemia de COVID-19 e consequentemente a paralização das atividades presenciais na universidade, incluindo os laboratórios de pesquisa, não foi possível concluir estas atividades.

