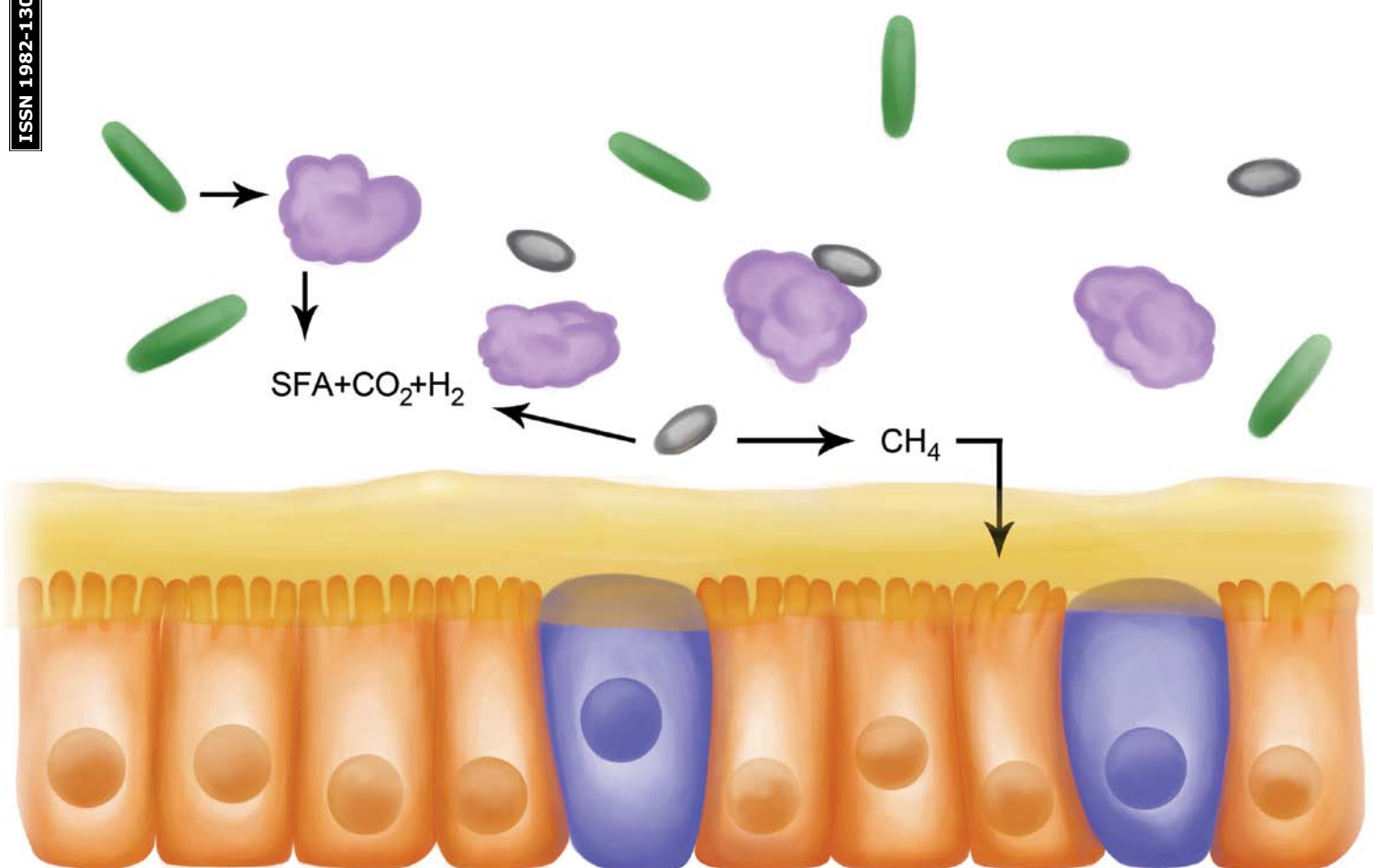


**A revista do
Microbiologista.**www.sbmicrobiologia.org.br

ISSN 1982-1301

Archea na mucosa humana



- Food particle
- M cells
- Enterocyte
- Mucus layer
- Archea
- Bacteria (fermentative)

**Destaque: As bactérias produtoras de
carbapenemases tipo NDM aterrissaram no Brasil**

Prezado Microbiologista,

É com grande satisfação que publicamos a 21ª edição da Revista Microbiologia in Foco. Continuamos com os objetivos iniciais selecionando temas abrangentes e de interesse na divulgação da Microbiologia.

A partir desta edição uma nova seção coordenada pela repórter Vanessa Vieira será acrescentada com entrevistas de personalidades no campo da Microbiologia e Educação, onde temas de relevância na área serão apresentados em uma linguagem jornalística.

Voltamos a enfatizar que esperamos e contamos com a colaboração ativa dos leitores sugerindo temas e encaminhando artigos para publicação.

Esperamos que a comunidade de microbiologistas continue a colaborar ativamente para que essa iniciativa possa alcançar o objetivo de divulgar a microbiologia nos mais diversos setores da comunidade brasileira.

Lembramos que a revista é de informação e divulgação e é composta de várias seções:

Seção 1: Ciência in foco: artigos de informação sobre temas relevantes

Seção 2: Resenhas: comentários sobre livros

Seção 3: Resumos comentados de trabalhos científicos relevantes

Seção 4: Homenagem a profissionais com destaque no desenvolvimento da Microbiologia

Seção 5: Ensino em Microbiologia

Seção 6: Departamento in Foco: Departamentos em destaque: Notícias de interesse da Microbiologia

Seção 7: Leitor in Foco: espaço aberto ao leitor

Seção 8: Empresas in Foco – Informes publicitários: espaço destinado a empresas

Seção 9: Entrevistas e comentários científicos de personalidades e estudos expostos na Microbiologia.

Agradecemos a todos que colaboraram com a edição número 21 da revista Microbiologia in Foco e contamos com a colaboração dos colegas para futuros artigos.



Adalberto Pessoa Junior
Presidente

Marina B. Martinez
Editora

Carlos P. Taborda
Editor

Ciência in Foco

ARCHAEA EM MUCOSAS HUMANAS 5

MICROBIOTA DO TRATO GASTROINTESTINAL DE CRIANÇAS COM FISSURA ENVOLVENDO O PALATO 11

UTILIZAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA BRASILEIRA PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA 19

Entrevistas e Opiniões

AS BACTÉRIAS PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES TIPO NDM ATERRISSARAM NO BRASIL 33

UMA SOLUÇÃO ECOLÓGICA CONTRA OS DANOS DO PETRÓLEO 35

É HORA DE RECICLAR OS CONHECIMENTOS 37

SELO DE QUALIDADE SBM 39

SBM IN FOCO 40

AGENDA IN FOCO 41

CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO E APERFEIÇOAMENTO EM MICROBIOLOGIA 42

FIQUE SÓCIO 43

Expediente

SBM in Foco
Revista da Sociedade Brasileira de Microbiologia

Ano 5, nº 21
São Paulo: SBM, 2013

Periodicidade Trimestral

Editores:

Carlos P. Taborda e Marina B. Martinez

Tiragem:

2000 exemplares - Circulação Nacional
Distribuição gratuita para sócios SBM

Diagramação:

Hermano Design Editorial
hermano@nextis.com

Responsabilidade autoral:

Todos os artigos assinados são de responsabilidade dos respectivos autores

Responsabilidade editorial:

Tífani Luri N. Hanashiro

ARCHAEA EM MUCOSAS HUMANAS



C. R. Taddei, F. Matarazzo, A. C. Ribeiro, M. Faveri, M. B. Martinez, M. P. A. Mayer

Archaea são organismos procariotos que constituem um dos ramos da árvore da vida composta também pelos domínios Bacteria e Eukarya. A existência de Archaea foi proposta por Woese em 1977 [1], porém, o terceiro domínio de vida foi estabelecido apenas após métodos moleculares mostrarem diferenças significativas em RNAs ribossomais, proteínas ribossomais e composição da superfície celular entre os membros Archaea, Bacteria e Eukarya [2,3].

Vários componentes dos processos informativos de Archaea são mais semelhantes aos seus homólogos eucarióticos que bacterianos [4]. Por exemplo, os genomas de Archaea codificam homólogos de quase todas as proteínas de replicação do DNA de Eukarya, mas apenas um homólogo de uma proteína de replicação do DNA de Bacteria [2].

Por outro lado, os lipídeos de Archaea são únicos para esse domínio, formados por cadeias laterais de isoprenóides ligados na porção de glicerol por ligação éter em vez de lipídeos de ésteres de glicerol como os encontrados em bactérias [5, 6]. Além disso, a parede celular de Archaea é fundamentalmente diferente da parede celular bacteriana. Estudos de estruturas de superfície de células de Archaea revelou a ausência de peptidoglicano [7], embora algumas cepas de Archaea possuam envelope celular formado por polímeros de pseudomureína, semelhante ao peptidoglicano bacteriano. Por outro lado, *Methano-*

sarcina spp possui metanocondroitina, semelhante à condroitina produzida por vertebrados. A superfície das células da maior parte de Archaea apresenta uma camada de proteína cristalina (S-layer), muitas vezes composta de uma única proteína ou glicoproteína, que está associada com a membrana citoplasmática. Em contraste, os membros da ordem Thermoplasmatales de Archaea, que vivem em condições extremas, não possuem uma parede celular [6, 8].

Desde que não há o peptidoglicano em Archaea, a susceptibilidade a antibióticos é bastante particular. Archaea metanogênicas são resistentes aos antibióticos cujo alvo é a síntese de RNA ou a ligação cruzada da subunidade peptídica da mureína, tais como penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos e glicopeptídeos nestes. Apesar dos lipídeos de membranas serem diferentes das bactérias, archaea são susceptíveis a antibióticos que inibem o ciclo de lipídios, tais como a bacitracina, cloranfenicol, lasalocida e monensina, que alteram a função da membrana [9].

Apêndices de superfície desempenham um papel importante na organização espacial das células durante a ligação inicial às superfícies, favorecendo o desenvolvimento de estruturas comunitárias maduras. Muito pouco se sabe sobre a morfologia e função de apêndices superficiais de Archaea, mas os membros deste domínio têm sido frequentemente detectados em comunidades

mistas em agregados [10] e biofilmes complexos [11-14]. Assim, é concebível que tais estruturas possam ter um papel no aumento da concentração de açúcares para o transporte mais eficiente para a célula [15], no movimento e co-agregação com outros microrganismos ou na aderência a superfícies bióticas e abióticas [6, 8].

Sinais de peptídeos de classe III, semelhantes aos que codificam pili bacteriano tipo IV, foram encontrados no genoma de vários membros de Archaea, indicando que as estruturas de superfície celular ainda não descritas, tais como archaeal pili pode estar presente na maioria dos membros deste domínio [16]. De fato, recentemente demonstrou-se que estruturas semelhantes aos pili de tipo IV estão envolvidas na formação do biofilme pelo termoacidófilo *Sulfolobus acidocaldarius* [17], e na agregação de *Methanothermobacter thermautotrophicus* com bactérias, conferindo uma transferência de H_2 mais eficiente [18].

Estruturas flagelares já foram descritas em Archaea, envolvidas com motilidade e adesão a outras células ou outras superfícies. Estas estruturas são semelhantes ao flagelo de bactérias, porém, não estão relacionados estruturalmente e quando ao modo de montagem do apêndice. Estruturalmente, flagelos de Archaea são mais finos e possuem coprimentos variáveis, quando comparados aos de bactéria [19].

Archaea são frequentemente deno-

minado como “extremófilos”, devido à sua presença em ambientes extremos, no que diz respeito aos valores de temperatura, pressão osmótica, de salinidade e de pH, representando geralmente 10% da microbiota total [20,21]. Esta terminologia foi considerada inadequada por novas pesquisas, as quais detectaram este domínio em uma vasta gama de habitats, incluindo as superfícies da mucosa de mamíferos.

Estes organismos podem ser fisiologicamente agrupados em: metanogênicos (anaeróbios estritos que produzem metano); halófilos (aeróbios estritos que vivem em ambientes com alta concentração de sal) e termoacidófilos (aeróbios que vivem em ambientes quentes e ácidos).

Archaea é constituído por quatro filos Euryarchaeota, Crenarchaeota, Kararchaeota e Nanoarchaeota. A principal Archaea detectada em seres humanos e animais pertencem ao filo Euryarchaeo-

ta, que inclui as cinco ordens conhecidas de metanogênicas (Halobacteriales, Methanobacteriales, Methanosarcinales, Methanomicrobiales e Methanococcales) [22]. O processo de metanogênese, definido pela produção de metano (CH_4) a partir de diferentes substratos (como metabólitos de bactérias, CO_2 , H_2 , acetato e formato) em ambiente anaeróbio, é exclusivamente relacionado aos organismos de Archaea [2, 22, 24]. Archaea metanogênicas são consideradas a única fonte biológica do metano [24].

O estudo do microbioma humano revelou que Archaea coloniza sítios distintos do organismo humano, organizada em comunidades complexas [25-28]. Este domínio é encontrado principalmente no intestino [13,14, 29-31] bem como na cavidade oral [11,12, 32-34]. No geral, a diversidade de archaea é limitada a poucos filotipos na microbiota humana (isto é, vagina, cólon, trato intestinal e cavidade oral) [22,35]. *Metha-*

nobrevibacter smithii é a Archaea mais prevalentes no intestino [35], seguido por *Methanospaera stadmanae*, enquanto *Methanobrevibacter oralis* é a espécie principal no interior da cavidade oral [12, 37]. No entanto, as recentes abordagens moleculares demonstraram que *Methanosarcina*, *Thermoplasma*, *Crenarchaeota* e *Archaea halofila* foram identificados no tracto gastrointestinal [9]. A família Halobacteriaceae constituída de Archaea halófilas aeróbicas e que requerem um ambiente hiper salino, foi detectada em densidade baixa quando comparada com a população em metanarchaea na microbiota intestinal [38, 39] e os autores relacionaram a sua presença a uma dieta com elevado consumo de sal.

A maior parte de archaea que habitam as superfícies mucosas humanas, como *M. smithii* e *M. oralis*, obtém energia apenas pela redução de CO_2 a metanum archaea metanogênica do inte, e são referidas como espécies redutoras de CO_2 obrigatórias [40]. Em comunidades complexas do intestino humano, o metano resultante é usado como uma fonte de carbono e de energia em algumas alfa e delta proteobactérias aeróbias [41,42], e pode ser detectado no ar exalado [40].

TABELA 1. PRODUÇÃO DE METANO A PARTIR DE DIFERENTES CLASSES DE SUBSTRATO [44]	
Componentes	Reação Metanogênica
Lipídeos	$\text{C}_{50}\text{H}_{90}\text{O}_6 + 24.5\text{H}_2\text{O} \rightarrow 34.75\text{CH}_4 + 15.25\text{CO}_2$
Carboidratos	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_4 + 3\text{CO}_2$
Proteínas	$\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_5\text{N}_4 + 14.5\text{H}_2\text{O} \rightarrow 8.25\text{CH}_4 + 3.75\text{CO}_2 + 4\text{NH}_4^+ + 4\text{HCO}_3^-$

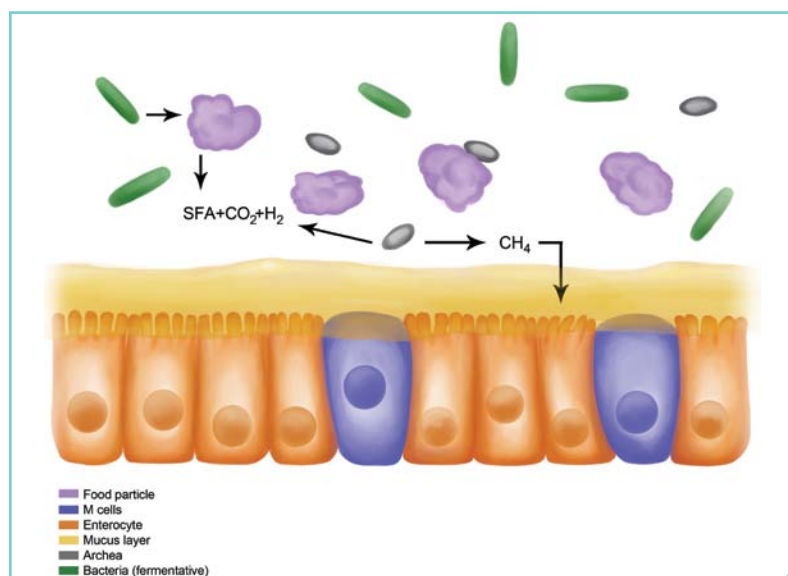


Figura 1 - No intestino, as partículas de alimentos são degradadas por bactérias fermentadoras, resultando na produção de bioprodutos como ácidos graxos de cadeia curta (SFA), CO_2 e H_2 . Desta forma, Archaea metanogênicas obtém energia reduzindo CO_2 a metano, com H_2 como doador primário de elétrons.

METABOLISMO DE ARCHAEA E INTERAÇÕES MICROBIANAS

A degradação dos materiais poliméricos, tais como polissacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos em CO_2 e CH_4 (Tabela 1) envolve uma comunidade microbiana complexa, na qual as capacidades metabólicas são combinadas [43]. A dependência mútua entre espécies que interagem pode ser tão extrema que nenhuma das espécies pode funcionar sem a atividade de seu parceiro e, juntos, os parceiros executam funções que nenhuma das espécies pode fazer sozinho.

A metanogênese ocorre no trato gastrointestinal e, possivelmente, na cavidade oral, tal como mostrado pela presença do metano no ar expirado. Bactérias fermentativas hidrolisam os substratos poliméricos, e fermentam os produtos de hidrólise em acetato e ácidos graxos de cadeia longa, CO_2 , H_2 e formato (Figura 1). O hidrogênio é um sub-produto

básico em ambientes anóxicos [44] e os metanogênicos podem reduzir o CO_2 em metano com H_2 como o doador primário de electrons [45]. O consumo de H_2 e CO_2 por metanógenos, ambos com outros grupos hidrogenotrópicos, como sulfato-redutoras e bactérias acetogênicas, fornece as condições para a posterior degradação do substrato pelos microrganismos envolvidos nos primeiros passos desta cadeia. Assim, a remoção dos produtos finais pelos metanógenos favorece o crescimento de bactérias de fermentação [46], enquanto que as altas pressões parciais de H_2 poderia reduzir o rendimento da fermentação [47].

O equilíbrio entre os membros de uma comunidade microbiana complexa também pode ser afetada por outras condições existentes como disponibilidade de nutrientes, pH e nível de O_2 . Por exemplo, quando outros receptores de elétrons além do CO_2 estão presentes, tal como O_2 , NO_3^- , Fe_2^+ , SO_4^{2-} , metanógenos são superados por bactérias tais como bactérias redutoras de sulfato, bactérias desnitrificantes e bacterianas redutoras de ferro. Este fenômeno ocorre provavelmente porque estes compostos são melhores receptores de elétrons, e as suas reduções são termodinamicamente mais favorável do que a redução de CO_2 em metano [43]. No entanto, parece que os organismos produtores de metano podem coexistir com bactérias redutoras de sulfato em níveis comparáveis de abundância no cólon humano [48] e da boca [34].

ARCHAEA EM HUMANOS

Desde que Archaea metanogênica estão envolvidas na cascata metabólica, elas são parte de um complexo biosistema. Células de Archaea, Bacteria e Eukarya coexistem em uma relação de simbiose em mucosas humana como o intestino [49] e boca [34]. Estudos mostram que Archaea também foram encontradas na vagina de mulheres com vaginose bacteriana [27], porém, não em líquido amniótico de mulheres grávidas em partos prematuros [50, 51].

Apesar de o intestino ser o maior órgão imune do corpo, contendo 80% das células humanas de anticorpos produtores [52], ele abriga pelo menos 500-1000

diferentes espécies bacterianas [36]. No entanto, o conhecimento da contribuição de archaea a este ambiente ainda está sendo definido.

Após o nascimento, o oxigênico presente no intestino do recém nascido favorece a colonização por bactérias aeróbias facultativas. Entre 7 a 10 dias após o nascimento, o oxigênio é consumido, permitindo o estabelecimento de bactérias anaeróbias [53]. Archaea metanogênicas, como *M. smithii*, foram primeiramente descritas em 1982 a partir da cultura de fezes humanas [25]. Elas podem estar presentes transitóriamente no intestino de lactentes [14, 54], possivelmente originárias da microbiota vaginal materna [27]. No entanto, elas se tornam parte da microbiota residente em crianças maiores de 27 meses de idade [55]. Este padrão de colonização parece não ter relação com a dieta oferecida à criança, mas sim com a contaminação ambiental a qual ela está exposta [9].

Arquéias metanogênicas podem ser detectados em cerca de 25-40% das crianças e 42-82% da população adulta [55,56], mas a sua prevalência pode ser maior. Na verdade, um estudo mais recente mostrou que 95,5% dos sujeitos estavam colonizados por *M. smithii*, sugerindo que este organismo pode ser utilizado como um indicador de contaminação fecal em água [9].

Assim, Archaea metanogênica pode compreender até 10% de todos os anaeróbios no cólon de adultos saudáveis [35] e pode desempenhar um papel de simbiote no intestino, evitando a acumulação de ácidos e outros produtos finais de bactérias [57]. Por outro lado, um papel na patogênese de archaea metanogênicas tem sido sugerida. A metanogênese no cólon leva à excreção de metano no ar expirado, e o aumento de expiração de metano tem sido associada com patologias malignas ou pré malignas do cólon [30], além de doença inflamatória do intestino (IBD) [58]. Outros estudos mostram uma relação entre o aumento da proporção de Archaea com doença inflamatória do intestino (ou doença de Crohn), síndrome do intestino irritável, o cancro colo-rectal e diverticulose [59, 60]. O mecanismo sublinhando a essas patologias ainda não foi revelado, mas a interação de bactérias simbióticas com

metanoarchaea pode perturbar a homeostase microbiana, afetando a proliferação ou atividade de bactérias probióticas [13, 58, 61, 62].

Estudos mostram que metanoarchaea no intestino pode melhorar a digestão de fibra e, assim, aumentar a ingestão de calorias, como mostrado num modelo de ratinho humanizado gnotobiótico [63]. Desta forma, a colonização por metanoarchaea pode ser útil em pacientes com desnutrição, mas prejudicial na obesidade.

A distribuição da microbiota oral é afetada por várias condições ambientais, incluindo o potencial redox e disponibilidade de nutrientes. Os primeiros colonizadores do biofilme dental são principalmente fermentadores facultativos anaeróbios, como *Actinomyces* e *Streptococcus*. Estas espécies consomem o O_2 e levar ao domínio as espécies fermentadores anaeróbicos secundários, como *Fusobacterium* e *Prevotella*. Esta sucessão microbiana afeta o habitat com uma nova queda no potencial redox e liberação do fluido gengival, que contém moléculas de acolhimento complexos que podem ser exploradas como principais fontes de nutrientes por anaeróbios proteolíticas [64]. Em seguida, as bactérias proteolíticas anaeróbias estritas, como *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* se sobrepõe aos colonizadores iniciais e induzem a destruição do tecido gengival [65].

Nosso grupo de pesquisa foi investigar uma possível interação entre Archaea e bactérias na doença periodontal. Como esperado, na cavidade oral foram detectados principalmente as metanogênicas no ambiente altamente anóxica do biofilme subgengival e em canais radiculares infectados [37, 66]. Sob estas condições, a produção de metano, pode, possivelmente, eliminar os produtos finais, reduzindo a concentração de H_2 e, possivelmente, favorecendo as bactérias fermentadoras. A presença de bactérias redutoras de sulfato na placa dental subgengival, que utiliza sulfato como receptor de elétrons, e, portanto, competes com metanógenos na maioria dos ambientes, já foi previamente associado com o aumento da proporção do patógeno periodontal *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. Denticola* [67].

Tanto as bactérias redutoras de sulfato e Archaea metanogênicas são degradadores terminais em complexos sistemas anaeróbios. Archaea metanogênicas também estão presentes em maior número e proporções na doença do que em sites de saúde de pacientes com periodontite agressiva [68], e co-existir com uma microbiota formada por bactérias sacarolíticas como *Capnocytophaga* sp., *Eubacterium notadum* e *Streptococcus constellatus*, além de bactérias proteolíticas como a *P. gingivalis* e *T. forsythia* [69]. Dados recentes não publicados relataram uma correlação positiva entre os níveis de Archaea e *Porphyromonas gingivalis* ($r = 0,75$, $p = 0,001$), bem como *Tannerella forsythia* ($r = 0,65$, $p = 0,01$) no biofilme subgingival de pacientes crônicos periodontite (Figura 2). Por outro lado, os sites periodontalmente saudáveis colonizados por Archaea apresentaram níveis inferiores dos *Actinomyces* benéficos e espécies de *Streptococcus*, enquanto que algumas espécies patogênicas periodontais foram encontradas em níveis significativamente mais elevados e as proporções em comparação com os locais não colonizados por esses microrganismos.

Uma associação positiva entre metanogênicos e *Synergites* spp, um grupo de bactérias anaeróbias que são em sua maioria ainda não-cultiváveis também já foi reportada [37, 70]. Assim, parece que arqueias metanogênicas bem como bactérias redutoras de sulfato podem co-existir na cavidade oral com os patógenos periodontais, e desempenham um papel como degradadoras terminais de componentes do hospedeiro, favorecendo a contínua cascata catabólica.

Apesar da associação de Archaea metanogênicas com a doença, os dados atuais ainda não elucidam o seu papel na doença e na saúde em seres humanos. Sua associação com a doença pode ser indireta. Ao utilizar-se de hidrogênio, metanogênicas podem apoiar o crescimento de bactérias anaeróbicas fermentativas, incluindo patógenos verdadeiros e oportunistas [22, 48]. Além disso, a capacidade de metanogênicas em transformar metais pesados ou metalóides em derivados voláteis de metilados, que são mais tóxicos do que os compostos originais, podem constituir um factor de virulência dirigida, aumentando o dano tecidual do hospedeiro [22, 71].

Membros do domínio Archaea são parte da microbiota residente em seres humanos e podem ser envolvidos em turnos microbianos observados em sites afetados, mas a relevância clínica de Archaea permanece ainda desconhecido.

REFERÊNCIAS

1. Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74:5088–5090.
2. Forterre P, Brochier C, Philippe H. Evolution of the archaea. Theor Popul Biol 2002; 61: 409–422.
3. Rother M, Metcalf WW. Genetic technologies for archaea. Curr Opin Microbiol 2005; 8: 745–751.
4. Gribaldo S, Brochier-Armanet C. The origin and evolution of archaea: a state of the art. Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci 2006; 361:1007–1022.
5. Kates M. Archaeobacterial lipids: structure, biosynthesis and function. Biochem Soc Symp 1992; 58: 51–72.
6. Albers S-V, Meyer BH. The archaeal cell envelope. Nat Rev Microbiol 2011; 9: 414–426.
7. Koch HG, Moser M, Müller M. Signal recognition particle-dependent protein targeting, universal to all kingdoms of life. Rev Physiol Biochem Pharmacol 2003; 146: 55–94.
8. Ellen AF, Zolghadr B, Driessen AMJ, Albers S-V. Shaping the archaeal cell envelope. Archaea 2010; 608243.
9. Dridi B, Raoult D, Drancourt M. Archaea as emerging organisms in complex human microbiomes. Anaerobe 2011; 17: 56–63.
10. Hulshoff Pol LW, de Castro Lopes SI, Lettinga G, Lens PNL. Anaerobic sludge granulation. Water Res 2004; 38: 1376–1389.
11. Kulik EM, Sandmeier H, Hinni K, Meyer J. Identification of archaeal rDNA from subgingival dental plaque by PCR amplification and sequence analysis. FEMS Microbiol Lett 2001; 196: 129–133.
12. Lepp PW, Brinig MM, Ouverney CC, Palm K, Armitage GC, Relman DA. Methanogenic archaea and human periodontal disease. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 6176–6181.

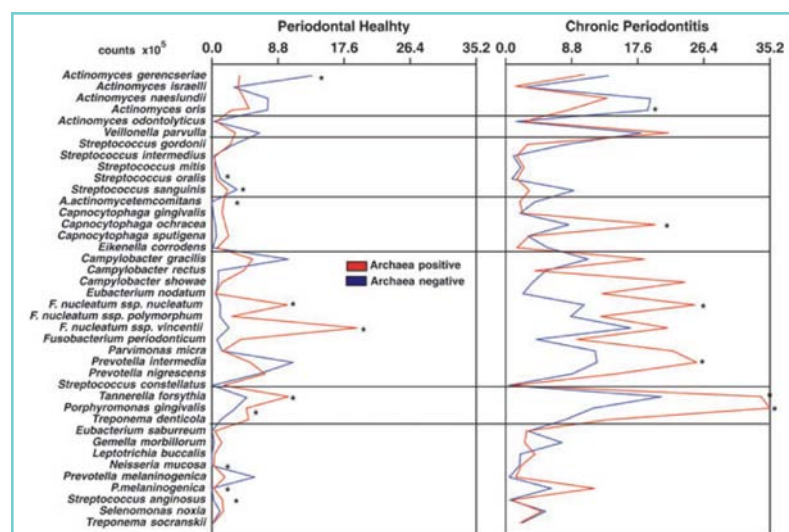


Figura 2 - Contagem média (x10⁵) de 40 espécies de bactérias em amostras de placa bacteriana subgingival de 15 pacientes com saúde periodontal (PH; painel esquerdo) e 15 pacientes com periodontite crônica (CHP; painel direito). Os níveis e proporções de archaea foram analisadas por PCR quantitativa e o perfil microbiano foi analisado por hybridização em checkerboard DNA-DNA em seis amostras / pacientes no grupo ChP e três amostras/paciente no grupo PH. A significância das diferenças entre os locais colonizados por archaea em cada grupo clínico foi avaliada com o teste de Wilcoxon (* $p < 0,05$).

13. Scanlan PD, Shanahan F, Marchesi JR. Human methanogen diversity and incidence in healthy and diseased colonic groups using *mcrA* gene analysis. *BMC Microbiol* 2008; 8: 79.
14. Dridi B, Henry M, El Khe'chine A, Raoult D, Drancourt M. High prevalence of *Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae* detected in the human gut using an improved DNA detection protocol. *PLoS ONE* 2009; 4: e7063.
15. Albers S-V, Szabo' Z, Driessen AJM. Protein secretion in the archaea: multiple paths towards a unique cell surface. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4: 537–547.
16. Szabo' Z, Stahl AO, Albers S-V, Kissinger JC, Driessen AJM, Pohlschroder M. Identification of diverse archaeal proteins with class iii signal peptides cleaved by distinct archaeal prepilin peptidases. *J Bacteriol* 2007; 189: 772–778.
17. Henche AL, Koerdt A, Ghosh A, Albers SV. Influence of cell surface structures on crenarchaeal biofilm formation using a thermostable green fluorescent protein. *Environ Microbiol* 2012; 14: 779–793.
18. Ishii Si, Kosaka T, Hori K, Hotta Y, Watanabe K. Coaggregation facilitates interspecies hydrogen transfer between *Pelotomaculum thermopropionicum* and *Methanothermobacter thermautotrophicus*. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 7838–7845.
19. Jarrell KF, Nair DB, Jones GM, Aizawa S-I, Chong JJP, Stark M, Logan SM, Vinogradov E, Kelly JF. Archaeal surface appendages: their function and the critical role of N-linked glycosylation in their assembly. *Proc. SPIE Instruments, Methods, and Missions for Astrobiology XIV* 2011; 81520O.
20. Hugenholtz P, Pitulle C, Hershberger KL, Pace NR. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J Bacteriol* 1998; 180: 366–376.
21. DeLong EF. Microbial community genomics in the ocean. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 459–469.
22. Horz H-P, Conrads G. Methanogenic archaea and oral infections—ways to unravel the black box. *J Oral Microbiol* 2011; 3: 11–12.
23. Sakai S, Imachi H, Hanada S, Ohashi A, Harada H, Kamagata Y. *Methanocella paludicola* gen. Nov., sp. Nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage 'rice cluster i', and proposal of the new archaeal order *Methanocellales* ord. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008; 58: 929–936.
24. Cavicchioli R. Archaea—timeline of the third domain. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9: 51–61.
25. Miller TL, Wolin MJ, Conway de Macario E, Macario AJ. Isolation of *Methanobrevibacter smithii* from human feces. *Appl Environ Microbiol* 1982; 43: 227–232.
26. Belay N, Johnson R, Rajagopal BS, Conway de Macario E, Daniels L. Methanogenic bacteria from human dental plaque. *Appl Environ Microbiol* 1988; 54: 600–603.
27. Belay N, Mukhopadhyay B, Conway de Macario E, Galask R, Daniels L. Methanogenic bacteria in human vaginal samples. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1666–1668.
28. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature* 2007; 449: 804–810.
29. McKay LF, Brydon WG, Eastwood MA, Housley E. The influence of peripheral vascular disease on methanogenesis in man. *Atherosclerosis* 1983; 47: 77–81.
30. Pique' JM, Pallares M, Cuso' E, Vilar-Bonet J, Gassull MA. Methane production and colon cancer. *Gastroenterology* 1984; 87: 601–605.
31. Weaver GA, Krause JA, Miller TL, Wolin MJ. Incidence of methanogenic bacteria in a sigmoidoscopy population: an association of methanogenic bacteria and diverticulosis. *Gut* 1986; 27: 698–704.
32. Ferrari A, Brusa T, Rutili A, Canzi E, Bivati B. Isolation and characterization of *Methanobrevibacter oralis* sp. Nov. *Curr Microbiol* 1994; 29: 7–12.
33. Yamabe K, Maeda H, Kokeguchi S et al. Distribution of archaea in Japanese patients with periodontitis and humoral immune response to the components. *FEMS Microbiol Lett* 2008; 287: 69–75.
34. Vianna ME, Holtgraewe S, Seyfarth I, Conrads G, Horz HP. Quantitative analysis of three hydrogenotrophic microbial groups, methanogenic archaea, sulfate-reducing bacteria, and acetogenic bacteria, within plaque biofilms associated with human periodontal disease. *J Bacteriol* 2008; 190: 3779–3785.
35. Duncan SH, Louis P, Flint HJ. Cultivable bacterial diversity from the human colon. *Lett Appl Microbiol* 2007; 44: 343–350.
36. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; 308: 1635–1638.
37. Vianna ME, Conrads G, Gomes BPFA, Horz HP. Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1274–1282.
38. Nam Y-D, Chang H-W, Kim K-H et al. Bacterial, archaeal, and eukaryal diversity in the intestines of Korean people. *J Microbiol* 2008; 46: 491–501.
39. Oxley APA, Lanfronconi MP, Wu'rdemann D et al. Halophilic archaea in the human intestinal mucosa. *Environ Microbiol* 2010; 12: 2398–2410.
40. Ferry JG. How to make a living by exhaling methane. *Annu Rev Microbiol* 2010; 64: 453–473.
41. Thauer RK, Shima S. Methane as fuel for anaerobic microorganisms. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1125: 158–170.
42. Thauer RK, Kaster A-K, Seedorf H, Buckel W, Hedderich R. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6: 579–591.
43. Liu Y, Whitman WB. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1125: 171–189.
44. Alves MM, Pereira MA, Sousa DZ et al. Waste lipids to energy: how to optimize methane production from long-chain fatty acids (LCFA). *Microb Biotechnol* 2009; 2: 538–550.
45. Stams AJM, Plugge CM. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7: 568–577.
46. Deppenmeier U. Redox-driven proton translocation in methanogenic archaea. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 1513–1533.
47. Schink B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997; 61: 262–280.
48. Chassard C, Scott KP, Marquet P et al. Assessment of metabolic diversity within the intestinal microbiota from healthy humans using

combined molecular and cultural approaches. *FEMS Microbiol Ecol* 2008; 66: 496–504.

49. Persson S, Edlund MB, Claesson R, Carlsson J. The formation of hydrogen sulfide and methyl mercaptan by oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 1990; 5: 195–201.
50. Conway de Macario E, Macario AJL. Methanogenic archaea in health and disease: a novel paradigm of microbial pathogenesis. *Int J Med Microbiol* 2009; 299: 99–108.
51. Hooper LV. Do symbiotic bacteria subvert host immunity? *Nat Rev Microbiol* 2009; 7: 367–374.
52. DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP et al. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS ONE* 2008; 3:e3056.
53. DiGiulio DB, Romero R, Kusanovic JP et al. Prevalence and diversity of microbes in the amniotic fluid, the fetal inflammatory response, and pregnancy outcome in women with preterm pre-labor rupture of membranes. *Am J Reprod Immunol* 2010; 64: 38–57.
54. Brandtzaeg P. Update on mucosal immunoglobulin A in gastrointestinal disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2010; 26: 554–563.
55. Vael C, Desager K. The importance of the development of the intestinal microbiota in infancy. *Curr Opin Pediatr* 2009; 21: 794–800.
56. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* 2007; 5:e177.
57. Stewart JA, Chadwick VS, Murray A. Carriage, quantification, and predominance of methanogens and sulfate-reducing bacteria in faecal samples. *Lett Appl Microbiol* 2006; 43: 58–63.
58. Hudson MJ, Tomkins AM, Wiggins HS, Drasar BS. Breath methane excretion and intestinal methanogenesis in children and adults in rural Nigeria. *Scand J Gastroenterol* 1993; 28: 993–998.
59. Samuel BS, Hansen EE, Manchester JK et al. Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 10643–10648.
60. Peled Y, Weinberg D, Hallak A, Gilat T. Factors affecting methane production in humans. *Gastrointestinal diseases and alterations of colonic flora. Dig Dis Sci* 1987; 32: 267–271.
61. Nakamura N, Lin HC, McSweeney CS, Mackie RI, Gaskins HR. Mechanisms of microbial hydrogen disposal in the human colon and implications for health and disease. *Ann Rev Food Sci Technol* 2010; 1: 363–395.
62. Roccarina D, Lauritano EC, Gabrielli M, Franceschi F, Ojetti V, Gasbarrini. The role of methane in intestinal diseases. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 1250–1256.
63. Kleessen B, Kroesen AJ, Buhr HJ, Blaut M. Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 1034–1041.
64. Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3380–3389.
65. Samuel BS, Gordon JI. A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:10011–10016.
66. Marsh PD, Devine DA. How is the development of dental biofilms influenced by the host? *J Clin Periodontol* 2011; 38 (suppl 11): 28–35.
67. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000 2005; 38: 135–187.
68. Vickerman MM, Brossard KA, Funk DB, Jesionowski AM, Gill SR. Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal species in symptomatic and asymptomatic endodontic infections. *J Med Microbiol* 2007; 56:110–118.
69. Langendijk-Genevaux PS, Grimm WD, Van der Hoeven JS. Sulfatereducing bacteria in relation with other potential periodontal pathogens. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 1151–1157.
70. Matarazzo F, Ribeiro AC, Feres M, Faveri M, Mayer MPA. Diversity and quantitative analysis of archaea in aggressive periodontitis and periodontally healthy subjects. *J Clin Periodontol* 2011; 38: 621–627.
71. Faveri M, Figueiredo LC, Duarte PM, Mesnik MJ, Mayer MPA, Feres M. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 739–749.
72. Michalke K, Schmidt A, Huber B et al. Role of intestinal microbiota in transformation of bismuth and other metals and metalloids into volatile methyl and hydride derivatives in humans and mice. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 3069–3075.

MICROBIOTA DO TRATO GASTRINTESTINAL DE CRIANÇAS COM FISSURA ENVOLVENDO O PALATO



Marcos Roberto Tovani Palone

Especialista em Odontopediatria, Mestrando em Ciências da Reabilitação no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo, Bauru, Brasil.

Thaieny Ribeiro da Silva

Mestra em Ciências da Reabilitação, Especialista em Odontopediatria, Doutoranda em Ciências da Reabilitação no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo, Bauru, Brasil.

Narciso Almeida Vieira

Doutor e Mestre em Doenças Tropicais, Especialista em Imunologia e Análises Clínicas, Especialista em Laboratório do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo, Bauru, Brasil.

Gisele da Silva Dalben

Doutora em Patologia Bucal, Mestra em Ciências da Reabilitação, Especialista em Odontopediatria, Cirurgiã-dentista do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo, Bauru, Brasil.

RESUMO

A cavidade bucal é a principal porta de entrada dos micro-organismos existentes no meio externo para o interior do corpo humano. A fissura labiopalatina é uma anomalia que causa perda de continuidade nos tecidos labiais, alveolares e palatinos da maxila, necessitando de procedimentos cirúrgicos para reabilitação estética. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi realizar uma revisão de literatura enfatizando as características principais e peculiares da microbiota do trato gastrointestinal de crianças com fissura no palato. A dificuldade de ingestão de nutrientes, aleitamento materno insuficiente, otites recorrentes, entre outras ocorrem com frequência em crianças com fissura envolvendo o

palato, influenciando na composição da microbiota do trato gastrointestinal. A associação da palatoplastia e o uso de antibiótico intensificam as mudanças nesta microbiota. Novas investigações devem ser realizadas para verificar quais fatores relacionados à malformação craniofacial, ao tratamento cirúrgico e o uso de antimicrobianos estariam implicados nas alterações da microbiota gastrointestinal descritas neste trabalho, bem como suas repercussões clínicas.

Palavras-chave: Fissura Palatina. Bactérias. Antimicrobianos.

1 INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é a principal porta de entrada dos micro-organismos exis-

tentes no meio externo para o interior do corpo humano. O alimento que penetra pela boca é triturado e misturado com a saliva em seu trajeto até o estômago e trato gastrointestinal. O ar inspirado passa pelo nariz e boca dirigindo-se para a traquéia e os pulmões. Micro-organismos que colonizam uma área da cavidade bucal têm uma probabilidade significativa de se espalhar em superfícies epiteliais contíguas aos locais vizinhos (47).

A partir do nascimento, o trato gastrointestinal do lactente, previamente estéril, começa a ser colonizado por micro-organismos no contato com a mãe e o meio ambiente. Em geral, esses primeiros colonizadores são membros das microbiotas indígenas e sua presença tem um papel importante na defesa do hospedeiro, não só na exclusão de po-

tenciais patógenos exógenos, mas também como estímulos para o desenvolvimento do sistema imunológico em bebês (35). Como membros das microbiotas indígenas, *Streptococcus oralis*, *S. mitis* e *S. Salivarius* são os estreptococos predominantes pioneiros que colonizam a cavidade bucal de lactentes durante os primeiros dias de vida. A colonização por dois outros membros das microbiotas indígenas, *S. sanguinis* e *S. mutans*, ocorre mais tardiamente, aproximadamente entre um e dois anos de idade, respectivamente, após a irrupção dos primeiros dentes decíduos. Em estudo realizado com crianças na faixa etária dos seis aos 18 meses foi demonstrado que os patógenos periodontais são encontrados com menor frequência em comparação com outras espécies analisadas, apresentando a seguinte distribuição em amostras da língua: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (30%), *Prevotella intermedia* (29%), *Porphyromonas gingivalis* (23%), *Bacteroides forsythus* (11%) e *Treponema denticola* (36%) (69).

Os micro-organismos da cavidade bucal podem causar uma série de doenças infecciosas bucais, incluindo cárie dentária, periodontite, problemas endodônticos, alveolite seca e amigdalite. Existem evidências de relações entre bactérias bucais e um número crescente de doenças sistêmicas (60), incluindo doença cardiovascular (29, 76, 4), acidente vascular cerebral (28), parto prematuro (52, 9), diabetes (20), pneumonia (59, 3), osteomielite em crianças (15) e endocardite bacteriana (5).

Inicialmente, *Escherichia coli*, *Clostridium sp* e *Streptococcus sp* são os

micro-organismos colonizadores dos intestinos. Com o aleitamento materno, surgem os *Bifidobacterium sp* e os *Lactobacillus sp* e, em seguida, os *Bacteroides sp*, *Eubacterium sp* e *Peptococcus sp*. Em lactentes, a quantidade de *Bifidobacterium sp* pode variar de acordo com o tempo de aleitamento materno, devido aos fatores promotores do crescimento presentes no leite humano. Normalmente, o recém-nascido apresenta uma população heterogênea de bactérias nos intestinos, a qual permanece relativamente estável durante toda a vida (10).

As bactérias intestinais podem ser divididas em espécies prejudiciais, benéficas e indiferentes para o hospedeiro. Entre os efeitos nocivos, podem ser citados a diarreia, infecções, danos hepáticos, carcinogênese e putrefação intestinal. A inibição do crescimento de micro-organismos prejudiciais promovendo melhora da digestão, da absorção de nutrientes essenciais, da síntese de vitaminas, estimulação do sistema imune e secreção de citocinas anti-inflamatórias são exemplos de efeitos protetores desenvolvidos pela microbiota intestinal, principalmente por *Bifidobacterium sp* e *Lactobacillus sp*. O grupo de *Bacteroides sp* é capaz de desempenhar ações benéficas e prejudiciais. De acordo com Ryan e Projan (2001), essas bactérias são inócuas a não ser que a barreira da mucosa do trato gastrointestinal ou das vias respiratórias esteja lesada (40, 56).

O intestino humano representa a maior massa de tecido linfóide do corpo e, a partir da sua colonização, bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Bacteroides sp*, Gram-positivas como

Lactobacillus sp e *Bifidobacterium sp*, atuam como fonte de antígenos e imunomoduladores inespecíficos, estimulando resposta imune local e sistêmica, bem como influenciando o número e a distribuição da população de células do tecido linfóide associado ao intestino. Quando presentes na dieta alimentar, recebem o nome de probióticos (40, 44, 71).

Os micro-organismos da microbiota da orofaringe são importantes fontes de infecções, especialmente entre pessoas cujas defesas das vias aéreas estão prejudicadas por deformações anatômicas, idade e debilidade imunológica, uso de álcool, drogas e tabaco.

As fissuras labiopalatinas correspondem às malformações craniofaciais mais frequentes que acometem a espécie humana, tratando-se de uma anomalia que causa perda de continuidade nos tecidos labiais, alveolares e palatinos da maxila, necessitando de procedimentos cirúrgicos para reabilitação estética e funcional.

No Brasil estima-se uma ocorrência em torno de 1:650 nascidos vivos (48), sendo enquadrada no âmbito do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (HRAC-USP) em Bauru, pelo sistema de classificação de Spina (61), o qual utiliza como referência anatômica o forame incisivo, resquício do limite embrionário entre palato primário e palato secundário, aliado a dois princípios fundamentais: a morfologia e a origem embriológica da fissura. As fissuras encontram-se, portanto classificadas em três grupos principais: fissuras pré-forame incisivo (lábio ou lábio + arco dentário) (Figuras 1A e 1B), fissuras transforame incisivo

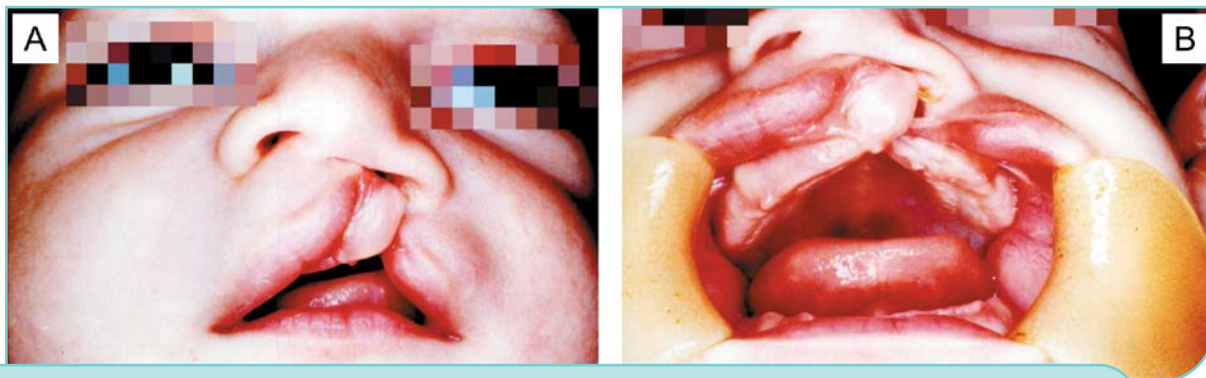


Figura 1 - A- Face de criança com fissura pré-forame incisivo unilateral. B- Vista intra-bucal da fissura pré-forame incisivo unilateral.



Figura 2 - A- Face de criança com fissura transforame incisivo unilateral. B- Vista intra-bucal da fissura transforame incisivo unilateral, evidenciando o envolvimento do palato.



Figura 3 - A- Face de criança com fissura pós-forame incisivo (fissura de palato apenas). B- Vista intra-bucal da fissura pós-forame incisivo, com comprometimento do palato duro e mole.

(lábio + arco dentário + palato) (Figuras 2 A e 2B) e fissuras pós-forame incisivo (palato apenas) (Figuras 3A e 3B).

Toda equipe interdisciplinar que trabalha na reabilitação das fissuras labio-palatinas enfrenta arduamente implicações psicológicas, estéticas e funcionais inerentes a esse tipo de malformação. O tratamento é longo e altamente especializado, envolvendo diferentes especialidades para a reabilitação completa dos pacientes com essa malformação.

O protocolo cirúrgico do HRAC-USP para a fissura mais ampla, a qual denomina-se transforame incisivo, envolve as seguintes etapas: a queiloplastia (cirurgia de reconstituição labial) realizada aos 3 meses de idade; a palatoplastia (cirurgia para distinguir a cavidade nasal da cavidade bucal) aos 12 meses; alongamento de columela nasal aos 6 anos; o enxerto alveolar secundário (cirurgia de reconstrução do defeito ósseo oca-

sionado pela fissura) entre 9 e 12 anos de idade e a cirurgia ortognática na maturidade esquelética (12).

Pacientes com fissura no palato completa ou incompleta ainda não operados apresentam prejuízo no estabelecimento de pressão intrabucal negativa durante a sucção com consequente ingestão insuficiente de leite e, muitas vezes, inviabilização do aleitamento materno. Assim sendo, pode haver comprometimento da evolução clínico-nutricional, predispondo a criança a infecções (73, 23). Com a comunicação entre as cavidades bucal e nasal ocorrem perdas de alimentos pelo nariz ou sua aspiração, podendo causar também além de infecção respiratória, as otites de repetição (73, 39). Para esses pacientes a cirurgia é o grande destaque do tratamento.

Desta forma, esta revisão de literatura visa enfatizar as características principais e peculiares da microbiota do trato

gastrointestinal de crianças com fissura envolvendo o palato.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Muitos estudos têm sido conduzidos, com o objetivo de verificar modificações na composição da microbiota do trato gastrointestinal em decorrência de dietas (66, 17, 21, 26, 36), idade (44, 22), localização geográfica (57, 37, 42), terapias medicamentosas (19, 32) e doenças entéricas (49, 6). Uma das funções mais importantes da microbiota do trato gastrointestinal é a proteção contra a colonização por micro-organismos potencialmente patogênicos – “resistência à colonização”, e os anaeróbios são os principais micro-organismos envolvidos nesse processo (71). Essa resistência está relacionada à competição por substratos, sítios de colonização e à produção de ácidos orgânicos, que inibem

o crescimento de muitos patógenos. Alguns tipos de bactérias são capazes de produzir "bacteriocinas", substâncias semelhantes a antibióticos, que inibem o crescimento bacteriano de algumas espécies e exercem efeito auto-regulador sobre as produtoras (21, 26, 36).

Alguns fatores como doenças e determinados medicamentos podem destruir o equilíbrio da microbiota do trato gastrointestinal. Nesse sentido, podendo também ser influenciado pela dieta, localização geográfica, cirurgias do trato gastrointestinal, etnia, uso de mamadeiras, hospitalização e, principalmente, durante o uso de antimicrobianos (40, 22). O impacto de antimicrobianos sobre a composição da microbiota colônica dependerá da concentração da droga no lúmen intestinal e de seu espectro de ação, podendo provocar vários efeitos indesejáveis, como a colonização por patógenos potenciais, além de influenciar a atividade metabólica da microflora intestinal (40, 66).

A antibióticoprofilaxia em cirurgia diz respeito à utilização do antibiótico em pacientes sem evidências de processo infeccioso estabelecido, com o objetivo de prevenir a infecção sistêmica ou da ferida operatória que eventualmente possa ocorrer (64). O uso de antimicrobianos profiláticos em cirurgia está indicado nas intervenções em que é alta a probabilidade de infecção da ferida operatória, como pode ocorrer nas cirurgias não contaminadas ou potencialmente contaminadas; e também nos casos em que complicação séptica represente perda total do procedimento, como ocorre na implantação de próteses e, finalmente, em pacientes imunossuprimidos (64, 16). As altas taxas de infecção sem antibiótico e sua redução com o uso, em estudos clínicos controlados, justificam a profilaxia nessas circunstâncias (14). No caso das cirurgias contaminadas e infectadas, a indicação de antibióticos é feita com finalidade curativa e não profilática, obedecendo às normas já estabelecidas para a antibióticoterapia clássica (64).

A realização de terapia antimicrobiana pode conduzir a uma redução no número de micro-organismos residentes em condições de normalidade no trato gastrointestinal, permitindo o crescimento excessivo de espécies bacterianas

já presentes e consequente colonização por micro-organismos potencialmente patogênicos. A administração de antibióticos também pode promover o desenvolvimento de resistência do micro-organismo com a possibilidade de disseminação destes no meio ambiente (57, 40). De acordo com Monreal, Pereira e Lopes (2005) foi demonstrado que a microbiota intestinal retorna ao normal em 30 dias após o término do tratamento com antimicrobianos.

Após a realização das cirurgias primárias, queiloplastia e palatoplastia, quando da não persistência de fistulas buconasais, a microbiota do paciente com fissura labiopalatina assemelha-se àquela de indivíduos sem fissura, caso contrário há formação de uma microbiota mais rica em micro-organismos com maior capacidade virulenta como o *S. Aureus* (2).

O tratamento profilático para crianças submetidas à palatoplastia é a cefazolina, antibacteriano betalactâmico pertencente ao grupo das cefalosporinas de primeira geração. As cefalosporinas de primeira geração são ativas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, não tendo ação contra *Enterococcus sp*, *Pseudomonas sp*, *Listeria sp*, *Clamidia sp* e *Stafilococcus aureus* resistentes à oxacilina. Suas principais indicações clínicas são o tratamento de infecções estafilocócicas, infecções respiratórias provocadas por *Haemophilus influenzae* e a prevenção de infecções cirúrgicas (70).

Com o aparecimento de técnicas moleculares a capacidade de identificar a composição microbiana aumentou. O gene 16S *rRNA* é uma pequena subunidade do RNA ribossomal. Esta subunidade está presente em todas as células bacterianas e a sequência dos nucleotídeos pode ser utilizada para classificar as bactérias. Com base nestas informações, o uso de métodos moleculares passou a ser aplicado nos estudos de comunidades bacterianas complexas, incluindo as do trato gastrointestinal (45, 25, 54, 8).

Estudos demonstram a ocorrência da colonização do corpo humano por micro-organismos no início da vida, estando a qualidade e estabilidade na dependência de vários fatores, os quais ainda não são totalmente conhecidos (10, 35, 40, 68).

O grau de contaminação ambiental no período neonatal possivelmente interfere na composição da microbiota, e a repercussão deste fato ainda não está clara (8).

Vale ressaltar que pouco se sabe a respeito da associação entre a fissura envolvendo o palato e a microbiota do trato gastrointestinal. O conhecimento da microbiota permite a utilização de diferentes estratégias com o intuito de manipular as populações bacterianas e promover a saúde.

3 DISCUSSÃO

O cólon abriga diversas comunidades de micro-organismos aeróbios e anaeróbios, cujo número ultrapassa a soma de todas as células somáticas e germinativas do próprio organismo (6). Estes micro-organismos constituem uma comunidade ecologicamente dinâmica (microbiota) e desempenham atividades metabólicas em nível local (mucosa intestinal) e sistêmico (31, 46, 33, 24, 38). A partir do nascimento, o trato gastrointestinal é colonizado por muitos micro-organismos ingeridos através dos alimentos e pelo contato com o meio ambiente (40, 62, 50, 68, 63). Os anaeróbios predominam no cólon, com cerca de 10^{11} organismos por grama de fezes.

Além dos diversos fatores que podem influenciar a microbiota do trato gastrointestinal, entre eles a idade do indivíduo, modo do nascimento (parto normal ou cirúrgico), dieta, localização geográfica, cirurgias do trato gastrointestinal, etnia, uso de mamadeiras, hospitalização e uso de antibiótico (40, 58, 31, 46, 33, 24); outro fator a ser considerado é o genótipo de cada malformado, uma vez que o controle da colonização estaria relacionado à disponibilidade e qualidade dos sítios de adesão na mucosa do trato gastrointestinal (7). Nesse sentido, a participação das malformações craniofaciais, bem como suas repercussões na alimentação infantil, e também a utilização frequente de antimicrobianos poderia contribuir para modificações desta microbiota.

As fissuras labiopalatinas sendo malformações craniofaciais resultantes de alterações congênitas que envolvem a região do crânio e face, apresentam etio-

logia complexa, a qual está ligada a múltiplos fatores, genéticos e ambientais. As fissuras labiais, com ou sem fissura de palato, são etiologicamente independentes das fissuras isoladas de palato. As primeiras têm maior prevalência no gênero masculino e as fissuras isoladas de palato no gênero feminino. Além disso, estas últimas estão mais associadas às síndromes e anomalias congênitas múltiplas e sofrem ainda maior influência de fatores ambientais do que as fissuras de lábio com ou sem fissura de palato (33, 24, 65, 41).

Segundo Moraes e Neto (2003), a microbiota do trato gastrointestinal é benéfica para o indivíduo quando há simbiose com o hospedeiro, isto é, equilíbrio entre as necessidades e efeitos recíprocos (43). Pesquisadores como Kallioäki et al. (2008), Marchand e Vandenplas (2000) relatam em seus estudos que a microbiota intestinal do neonato, do lactente e do adulto se forma de modo gradual e sequencial, adquirindo características estáveis em torno dos dois anos de idade (24,67). Segundo Almeida et al. (2009), a microbiota intestinal materna é a fonte natural das bactérias que colonizam o recém-nascido, e o parto cirúrgico ou normal deverá influir de modo considerável (1), sendo necessários de seis a 12 meses para que uma microbiota semelhante à de um adulto se instale.

Em seus estudos, Palmer et al. (2007) relatam que a composição da microbiota intestinal infantil é bastante variável e menos estável ao longo do tempo. No primeiro ano de vida, o trato gastrointestinal da criança progride da esterilidade para colonização extremamente densa, culminando com uma mistura de micro-organismos semelhante à de um adulto (53). Os fatores que determinam a composição da microbiota intestinal de um indivíduo ao longo do tempo ainda são pouco compreendidos. Novak et al. (2001) demonstraram que lactentes alimentados com leite materno têm microbiota intestinal diferente dos que são alimentados com fórmulas lácteas. Os primeiros têm predomínio de *Bifidobacterium sp* e *Lactobacillus sp*, e os alimentados com fórmulas apresentam mais coliformes e *Bacteroides sp* (51, 55). Estudos de Hopkins et al. (2005), empregando a técnica da PCR em tem-

po real, revelaram grande aumento da concentração de *Bacteroides sp* nas fezes de crianças entre sete e 24 meses de idade. Penders J e colaboradores (13) observaram densa colonização por *Bacteroides sp*, *Lactobacillus sp* e *Bifidobacterium sp* em 1.032 crianças com idade de 30 dias e concluíram que a alimentação infantil apresentou um impacto significativo sobre a microbiota intestinal. (13). Não são encontrados relatos de aleitamento materno ou fórmulas lácteas que mostrem a influência na microbiota do trato gastrointestinal de crianças com malformação craniofacial.

O uso de antimicrobianos tem sido um fator importante associado à modificação da microbiota do trato gastrointestinal. Diversos estudos têm demonstrado que as terapias antimicrobianas são capazes de induzir mudanças rápidas e importantes nesta microbiota (40). A antibioticoprofilaxia por cefazolina, indicada em cirurgias de palato no HRAC-USP, tem como objetivo prevenir a infecção no sítio cirúrgico e/ou sistêmica que eventualmente possa ocorrer (72). Chuo e Timmons (2005) estudaram a microbiota nasal, da garganta e ouvido de crianças com fissura labiopalatina, com idade entre um e 26 meses, concluindo que estas apresentavam risco significativo de infecção por *Staphylococcus aureus* nas cirurgias primárias de lábio e/ou palato. Contudo, seria necessário realizar exames bacteriológicos no período pré-operatório para identificar micro-organismos patogênicos, bem como estabelecer protocolos adequados para o uso profilático de antibióticos em queiloplastias e palatoplastias (13). Fernandes, Oliveira e Cruz Gazor e Freitas (2009) compararam a eficácia da cefazolina endovenosa utilizada como esquema profilático, em pacientes com fraturas de mandíbula tratados com fixação aberta (placas e parafusos), avaliando a ocorrência de infecção local, e concluíram que o índice de infecção foi comparável em ambos os grupos, não havendo diferença entre antibioticoprofilaxia com cefazolina endovenosa apenas na indução ou prolongada por 24 horas no pós-operatório. Segundo Caniello et al. (2005), septoplastias são consideradas cirurgias potencialmente contaminadas e não têm necessidade de antibioticopro-

filaxia por cefazolina pelo baixo risco de infecção pós-operatória.

O uso de antibióticos de maneira indiscriminada pode levar a sérias complicações, como reações tóxicas, redução do estímulo à formação de anticorpos, além de representar um alto custo financeiro e poder estimular o relaxamento de uma boa técnica cirúrgica (67, 11, 74, 77). A ocorrência de reações alérgicas a antibióticos varia entre 0,7% a 10%, sendo que anafilaxia fatal ocorre em um a cada 25 mil pacientes (11). Segundo Wise et al. (1998), estima-se que de 20 a 50% dos antibióticos utilizados em seres humanos são desnecessários (13, 75).

Diante da importância da microbiota do trato gastrointestinal na saúde humana, o antimicrobiano utilizado na cirurgia de palato, a cefazolina, exerce influência na concentração de bactérias anaeróbias do cólon infantil; e em face de tal evidência, sugere-se que os cirurgiões responsáveis pelo tratamento corretivo de fissuras labiopalatinas analisem a necessidade de administração deste antibiótico, especialmente considerando sua repercussão na microbiota do trato gastrointestinal.

Salienta-se ainda que, estes pacientes submetidos à cirurgia de palatoplastia durante o período pós-operatório, têm a higienização bucal como um fator importante no processo saúde/doença a partir de uma concepção holística, em prevenir não somente as alterações na cavidade bucal como evitar que esses micro-organismos residentes se tornem agentes complicadores do estado geral do paciente. Assim sendo, a escolha da substância a ser utilizada para antissepsia é de grande importância, visto que a utilização de substância que não ofereça ação antisséptica desejada para a redução da microbiota local gera maior probabilidade de complicações infecciosas.

Desse modo, os seres humanos, os quais têm seu trato gastrointestinal colonizado por micro-organismos que ajudam a evitar doenças e participam de várias reações que trazem benefícios, apresentam diminuição destes quando enfermos ou em utilização de determinados medicamentos, acarretando em recuperação dificultada. Portanto, o conhecimento sobre a microbiota do trato gastrointestinal de pacientes com fissura labiopalatina

permite que sejam ofertadas orientações relativas à alimentação e higienização pós-operatória, como forma de melhorar a quantidade destes micro-organismos que trazem benefícios bem como, reduzir a dos prejudiciais contribuindo de maneira bastante significativa para a promoção de saúde destinada a estes indivíduos.

REFERÊNCIAS

- Almeida LB, Marinho CB, Souza CS, Cheib VBP. Disbiose intestinal. *Ver Brás Nutri Clin*. 2009; 24(1):58-65.
- Arief EM, Mohamed Z, Idris FM. Study of viridians Streptococci and Staphylococcus species in cleft lip and palate patients before and after surgery. *Cleft Palate Craniofac J* 2005;42:277-279.
- Awano S, Ansai T, Takata Y, Soh I, Akifusa S, Hamasaki T, Yoshida A, Sonoki K, Fujisawa K, Takehara T. Oral health and mortality risk from pneumonia in the elderly. *J Dent Res* 2008;87:334-339.
- Beck JD, Offenbacher S. Systemic effects of periodontitis: epidemiology of periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol* 2005;76:2089-2100.
- Berbari EF, Cockerill III FR, Steckelberg JM. Infective endocarditis due to unusual or fastidious microorganisms. *Mayo Clin Proc* 1997;72:532-542.
- Bhat P, Shantakumari S, Rajan D, Mathan VI, Kapadia CR, Swarnabai C, Baker SJ. Bacterial flora of the gastrointestinal tract in southern Indian control subjects and patients with tropical sprue. *Gastroenterology*. 1971; 62:11-21.
- Brandt KG, Sampaio MMSC, Miuki CJ. Importância da microflora intestinal. *Pediatria (São Paulo)*; 2006; 28(2):117-27.
- Brandt KG. Análise molecular da microbiota fecal de recém-nascidos saudáveis [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2008.
- Buduneli N, Baylas H, Buduneli E, Turkoglu O, Kose T, Dahlen G. Periodontal infections and pre-term low birth weight: a case-control study. *J Clin Periodontol* 2005;32:174-181.
- Bullen CL, Tearle PV, Willis AT. Bifidobacteria in the intestinal tract of infants: an in vivo study. *J Med Microbiol* 1976; 9:325-33.
- Caniello M, Passerotti GH, Goto EY, Voegels RL e Butugan O. Uso de antibióticos em septoplastias: é necessário? *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* [online]. 2005; 71(6):734-738.
- Capelozza Filho L, Silva Filho OG da. Abordagem interdisciplinar no tratamento das fissuras labiopalatinas. In: Mêlega JC, editor. *Cirurgia plástica fundamentos e arte: cirurgia reparadora da cabeça e pescoço*. 2002; p.59-88
- Chuo CB, Timmons MJ. The Bacteriology of Children Before Primary Cleft Lip and Palate Surgery. *Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 2005; 42(3): 272-6.
- DeDio RM, Tom LW, McGowan KL, Wetmore RF, Handler SD, Potsic WP. Microbiology of the tonsils and adenoids in a pediatric population. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1988; 114: 763-5.
- Dodman T, Robson J, Pincus D. Kingella kingae infections in children. *J Paediatr Child Health* 2000;36:87-90.
- Fairbanks DN. In: Bayley BJ, Calhoun KH et al. *Head and Neck Otolaryngology*. Third edition. Philadelphia, Lippincott: Williams & Wilkins. 2001; 47-54.
- Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: What we know and need to know from gnotobiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1998; 1157:70.
- Fernandes HADR, Oliveira e Cruz Gazor e Freitas RS. Antibioticoprofilaxia em fratura de mandíbula. 2009; 12(1):21-4.
- Finegold SM. Interaction of antimicrobial therapy and intestinal microflora. *Am J Clin Nutr*. 1970; 23:1466-71.
- Genco RJ, Grossi SG, Ho A, Nishimura F, Murayama Y. A proposed model linking inflammation to obesity, diabetes, and periodontal infections. *J Periodontol* 2005;76:2075-2084.
- Gibson GR, Wang X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J Appl Bacteriol*. 1994; 77:412-20.
- Haenel H. Human normal and abnormal gastrointestinal flora. *Am J Clin Nutr* .1970; 23:1433-39.
- Hagberg C, Larson O, Milerad Josef. Incidence of cleft lip and palate and risks of additional malformations. *Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 1998; 35: 40-5.
- Hattori M, Taylor TD. The Human Intestinal Microbiome: A New Frontier of Human Biology. *DNA RESEARCH*. 2009; 16: 1-12.
- Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture methods. *Microbiol Immunol* 2002;46:535-548.
- Hentges DJ. Fecal flora of volunteers on controlled diets. *Am J Clin Nutr*. 1978; 31:S123-4.
- Hopkins MJ, Macfarlane GT, Furie E, Fite A and Macfarlane S. Characterisation of intestinal bacteria in infant stools using real-time PCR and northern hybridization analyses. *FEMS Microbiol Ecol*. 2005; 54: 77-85.
- Joshi KJ, Hung HC, Rimm EB, Willett WC, Ascherio A. Periodontal disease, tooth loss, and incidence of ischemic stroke. *Stroke* 2003;34:47-52.
- Joshi KJ, Rimm EB, Douglass CW, Trichopoulos D, Ascherio A, Willett WC. Poor oral health and coronary heart disease. *J Dent Res* 1996;75:1631-1636.
- Kalliomäki M, Collado MC, Salminen S and Isolauri E. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am J Clin Nutr*. 2008; 87:534-8.
- Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T, Oshima K, Toh H et al. Comparative Metagenomics Revealed Commonly Enriched Gene Sets in Human Gut Microbiomes. *DNA Research*. 2007; 14, 169-181.
- Kurpad AV, Shetty PS. Effects of antimicrobial therapy of fecal bulking. *Gut*. 1986; 27:55-8.
- Mai V, Draganov PV. Recent advances and remaining gaps in our knowledge of associations between gut microbiota and human health. *World J Gastroenterol*. 2009; 15, 81-85.
- Marchand J, Vandenplas Y. Administração de Microorganismos em benefício do hospedeiro: Mitos e fatos. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2000; 12:1077-88.
- Marsh PD. Oral ecology and its impact on oral microbial diversity. In: *Oral bacterial ecology: the molecular basis*. Kuramitsu HK, Ellen RP, editors. Norfolk, England: Horizon Scientific Press, 2000 ; pp. 11-65.
- Marteau P, Pochart P, Flourie B, Pellier P,

- Santos L, Desjeux J-S, Rambaud J-C. Effect of chronic ingestion of fermented dairy product containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on metabolic activities of the colonic flora in humans. *Am J Clin Nutr*. 1990; 52:685-88.
37. Mata LJ, Jejicanos ML, Jiménez F. Studies on the indigenous gastrointestinal flora of Guatemalan children. *Am J Clin Nutr*. 1972; 25:1380-90.
38. Mitsou EK, Kirtzalidou E, Oikonomou I, Liosis G, Kyriacou A. Fecal microflora of greek health neonates. *Anaerobe*. 2008; 14: 94-101.
39. Mondini CCSD. Avaliação da capacidade de cuidadores de lactentes com Sequência de Robin [Tese]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2008.
40. Monreal MTFD, Pereira PCM, Lopes CAM. Intestinal microbiota of patients with bacterial infection of the respiratory tract treated with amoxicillin. *Braz J Infect Dis* 2005;9:292-300.
41. Moore, K L, - Aparelho branquial. In: *Embriologia Clínica*, segunda edição. Rio de Janeiro, Interamericana. 1977; Cap. 10, p. 154-85.
42. Moore WEC, Holdeman LV. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl microbial*. 1974; 27:961-79.
43. Moraes MB, Neto UF. Enteropatia Ambiental. *Estudos Avançados*. 2003; 17(43): 137-48.
44. Moreau MC, Coste M. Immune responses to dietary protein antigens. *World Rev Nutr Dietetics*. 1993; 74: 22-57
45. Mountzouris KC, McCartney AL, Gibson PR. Intestinal microflora of human infants and current trends for its nutritional modulation. *Br J Nutr* 2002;87:405-420.
46. Mueller S, Saunier K, Hanisch C, Norin E, Alm L. et al. Differences in Fecal Microbiota in Different European Study Populations in Relation to Age, Gender, and Country: a Cross-Sectional Study. *Appl. Environ. Microbiol*. 2006; 72, 1027–1033.
47. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Commensal and pathogenic microbial flora in humans. *Medical Microbiology*. 2002; p.78-87.
48. Nagem H Filho, Moraes N, Rocha RGF. Contribuição para o estudo da prevalência das máis formações congênitas lábio-palatais na população escolar de Bauru. *Rev Fac Odontol São Paulo*.1968;6(2):111-28
49. Nordenvall B, Hallberg D, Larsson I, Nord CE. The effect of clindamycin on de intestinal flora in patients with enteric hyperoxaluria. *Scand J Gastroenterol*. 1983; 18:177-81.
50. Norin KE, Gustafsson BE, Lindblad BS, Midtvedt T. The establishment of some microflora associated biochemical characteristics in feces from children during the first years of life. *Acta Paediatr Scand*. 1985; 74:207-12.
51. Novak FR, Almeida JAG, Vieira GO and Borba LM. Colostró humano: fonte natural de probióticos? *J Pediatr*. 2001; 77 (4): 265-70.
52. Offenbacher S, Jared HL, O'Reilly PG, Wells SR, Salvi GE, Lawrence HP, Socransky S S, Beck J D. Potential pathogenic mechanisms of periodontitis associated pregnancy complications. *Ann Periodontol* 1998;3:233-250.
53. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA and Brown PO. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *Plos Biology*. 2007; 5(7):1556-73.
54. Park HK, Shim SS, Kim SY, Park JK, Park SE, Kim HJ, Kang BC, Kim CM. Molecular analyses of colonized bacteria in a human newborn infant gut. *J Microbil* 2005;43:345-353.
55. Rolf RD. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr*. 2000; 130 Suppl. 2S: 396S-402S.
56. Ryan JL, Projan SJ. Doenças Bacterianas. In: Parslow TG, Stites DP et al. *Imunologia Médica*. Décima edição. Guanabara Koogan; 2001. p.528-536.
57. Salminen S, Isolauri E, Onnela T. Gut flora in normal and disordered states. *Chemotherapy* 1995;41(Suppl 1):5-15.
58. Savage DC. Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. *Savage, Annu. Rev. Microbiol*. 1977; 31: 107-33.
59. Scannapieco FA. Role of oral bacteria in respiratory infection. *J Periodontol* 1999;70:793-802.
60. Seymour GJ, Ford PJ, Cullinan MP, Leishman S, Yamazaki K. Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clin Microbiol Infect* 2007;13(Suppl. 4):3-10.
61. Silva OG filho, Ferra FM Jr, Rocha DL, Freitas JAS. Classificação das fissuras lábio-palatais: breve histórico, considerações clínicas e sugestão de modificação. *Rev Bras Cir*. 1992;82(2):59-65
62. Simon GL, Gorbach SL. Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology*. 1984. 86:174-93.
63. Simon GL, Gorbach SL. The human intestinal microflora. *Dig Dis Sci*. 1986; 31:147S-62S.
64. Solomkin J. In: Baker RJ, Fischer J. *Mastery of surgery*. Fourth edition. Philadelphia, Lippincott: Williams & Wilkins. 2001; 146-54.
65. Souza Freitas, J.A. de. Centro de Pesquisa e Reabilitação de Lesões Lábio Palatais. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. 1974.
66. Souza ME, Pereira PCM. Microbiota intestinal de indivíduos que sofreram acidente ocupacional com materiais biológicos e que realizaram profilaxia anti-retroviral. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2007; 40(6):653-656.
67. Stark PL, Lee A. The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *Med Microbiol*. 1982; 15(2):189-203.
68. Sullivan A, Edlund C, Nord CE. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *Lancet Infect Dis*. 2001; 1:101-14.
69. Tanner ACR, Milgrom PM, Kent, Jr. R, Mokeem SA, Page RC, Riedy CA, P. Weinstein P e J Bruss J. The Microbiota of Young Children from Tooth and Tongue Samples. *J Dent Res* 2002; 81: 53.
70. Trabulsi LR, Mimica I, Mimica Lycia MJ. Características dos principais Grupos de antibacterianos: espectro de ação e indicações. In: Trabulsi LR, Alterthum F et al. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu; 1999: 99-110.
71. Van der Waaij D. Colonization resistance of the digestive tract: Clinical consequences and implications. *J Antimicrob Chemother*. 1982; 10:263-70.
72. Waitzbert DL, Ferrini MT. Exame físico e Antropometria. In: Waitzberg DL. *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*. 3 ed. São Paulo: Atheneu; 2000: p. 255-78.
73. Weckwerth PH, Marchesano LH, Lamônica Neto D, Aguiar HF. Bacteriologia da oite

média crônica supurativa em crianças portadores de fissura palatal. Rev Bras Med 1993; 50:602-610.

74. Weimert T., Yoder MG. Antibiotics and nasal surgery. Laryngoscope 1980; 90(4):667-72.

75. Wise R, Hart T, Cars O, Streulens M, Helmuth R, Huovinen P and Sprenger M. Antimicrobial resistance. Br Med J. 1998; 317:609-610.

76. Wu T, Trevisan M, Genco RJ, Dorn JP, Falkner KL, Sempos CT. Periodontal disease and risk of cerebrovascular disease: the first

national health and nutrition examination survey and its follow-up study. Arch Intern Med 2000;160:2749-2755.

77. Yoder MG, Weimert TA. Antibiotics and topical surgical preparation solution in septal surgery. Otolaryngol Head Neck Surg. 1992; 106:243.

UTILIZAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA BRASILEIRA PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA



Daiva Domenech Tupinambá

Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília. Campus Avançado Asa Norte – SGAN 916 Módulo B Av. W5, Brasília/DF, Brasil, CEP 70790-160. daiva.tupinamba@catolica.edu.br. Embrapa-Cerrados. BR 020, Km 18, Planaltina/DF, Brasil, CEP 73310-970. daiva.tupinamba@embrapa.br.

Shelly de Fátima Paluan

Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília. shelly.paluan@catolica.edu.br.

Ohana Yonara A. Costa

Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília. ohanayac@gmail.com.

Ana Carolina Bitencourt

Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília. c.bitencourt@gmail.com.

Jessica Carvalho Bergmann

Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília. jessica.bergmann@catolica.edu.br.

Betania Ferraz Quirino

Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília. Embrapa-Agroenergia. Parque Estação Biológica – PqEB s/nº – W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, CEP 70770-901. betania.quirino@embrapa.br.

RESUMO

Fatores climáticos e econômicos estão levando diversos países a buscarem na bioenergia uma alternativa para suas demandas energéticas. No Brasil o etanol é produzido pela fermentação, por leveduras, do caldo da cana-de-açúcar.

O bagaço da cana-de-açúcar apresenta grande potencial como matéria-prima na produção de etanol celulósico. Sua hidrólise total gera açúcares simples fermentáveis. Entretanto, existem obstáculos para seu uso. A pressão por novas enzimas e microrganismos alavancou os estudos nessa área, trazendo novas

técnicas para o estudo de microrganismos cultiváveis e não cultiváveis, como a metagenômica. A biodiversidade brasileira é uma excelente fonte de microrganismos e genes com potencial para a produção de etanol celulósico. A biomassa necessita de diversas enzimas para sua desconstrução. Os processos

de produção de etanol celulósico que estão sendo desenvolvidos se utilizam de um coquetel enzimático e/ou microrganismos capazes de realizar a desconstrução da biomassa e fermentação dos açúcares liberados. Um pré-tratamento se faz necessário e, além disso, existem diversos tipos de processos de hidrólise e fermentação para cada biomassa. Este artigo de revisão reúne as principais e mais atuais informações sobre a produção de etanol celulósico, seus desafios e perspectivas futuras, oferecendo uma visão geral da sua produção.

Termos para indexação: Etanol celulósico, *Saccharum* sp., Metagenômica, Inibidores, Enzimas, Microrganismos.

INTRODUÇÃO

O crescimento da demanda energética mundial, aumento dos preços do petróleo e preocupação com as mudanças climáticas estão levando diversos países a buscarem na bioenergia uma alternativa para suas demandas energéticas [1]. Tanto o biodiesel quanto o álcool são biocombustíveis líquidos derivados de biomassa (matéria orgânica de origem vegetal ou animal que pode ser utilizada na produção de energia), uma fonte renovável, disponível e sustentável. Dentro desse panorama, a agroenergia vem ao encontro de diversos anseios, como a redução das emissões de gases responsáveis pelo efeito estufa, aumento da fixação do homem ao campo e acesso à energia pelas populações pobres, trazendo redução da pobreza e impactos positivos sobre o meio ambiente [1]. Além disso, a indústria do etanol emprega 20 vezes mais mão-de-obra por litro produzido do que a do petróleo e outras fontes energéticas alternativas, como eletricidade e hidrogênio [2]. Entretanto, alguns fatores devem ser levados em consideração, como a disputa por áreas cultiváveis com alimentos e desmatamento, entre outros fatores potencialmente danosos.

O etanol atualmente disponível, chamado de primeira geração, é produzido pela fermentação, por leveduras, de açúcares simples obtidos pela hidrólise enzimática de materiais celulósicos. No Brasil a matéria-prima de escolha é a cana-de-

-açúcar, diferentemente de outras partes do mundo, que utilizam principalmente beterraba, milho ou mandioca [2]. A cultura da cana-de-açúcar produz o dobro de etanol, se comparada ao milho, 7.500 L de etanol/ha contra 3.800 L de etanol/ha [2], o que faz com que o etanol brasileiro seja extremamente competitivo.

Atualmente, os rejeitos da cana-de-açúcar são utilizados para adubação (vinhoto) e como fonte de energia para caldeiras (bagaço). Entretanto, o bagaço da cana tem grande potencial para uso como matéria-prima para a produção de etanol celulósico. São produzidos cerca de 250 kg de bagaço por tonelada de cana-de-açúcar [3]. A hidrólise total desses resíduos gera açúcares simples, que são base não apenas para a produção de etanol, mas de uma série de outras substâncias como ácidos orgânicos, outros açúcares de interesse, enzimas, entre outros [4]. Porém, a utilização desses resíduos lignocelulósicos encontra diversos obstáculos como a estrutura cristalina da celulose, que é resistente à hidrólise, a associação lignina-celulose, a qual cria uma barreira que impede o acesso enzimático ou microbiológico ao substrato [3], inibidores da fermentação que são gerados durante o processo, ausência de enzimas adequadas, entre outros, o que eleva o custo da produção do etanol celulósico, deixando clara a necessidade de amplos estudos para a otimização do processo de produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica.

A crescente demanda do mercado industrial pela descoberta de novas enzimas que sejam mais eficazes e resistentes às condições extremas encontradas no processo de produção de biocombustíveis celulósicos (de segunda geração) leva à exploração de fontes alternativas na busca destas. Os micro-organismos são candidatos ideais para a produção destas enzimas, oferecendo uma fonte abundante e barata. Porém, sabe-se que cerca de 99% destes não são cultiváveis por métodos laboratoriais convencionais, gerando assim a necessidade de alternativas de bioprospecção que dispensem o cultivo [5]. Visando ultrapassar esta barreira, cientistas desenvolveram ao longo dos anos diferentes técnicas para explorar estes micro-organismos não cultiváveis, hoje em dia conhecidas

como metagenômica, termo cunhado e técnica aperfeiçoada pela Dra. Jo Handelsman [6]. Neste processo, o DNA total de uma amostra ambiental é extraído, clonado em vetor apropriado e então inserido em um hospedeiro adequado. Os clones metagenômicos gerados podem ser então estudados com diversas finalidades, incluindo a identificação de novas enzimas.

Esta revisão começa com uma descrição da biomassa lignocelulósica e principais enzimas degradadoras dessa biomassa, seguida de uma visão da biodiversidade brasileira, em especial no que diz respeito à busca de enzimas e micro-organismos, cultiváveis ou não, adequados à produção de etanol celulósico. Por fim, serão descritos os principais processos utilizados na produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica e os desafios da produção.

Biomassa lignocelulósica: estrutura, enzimas relacionadas e potencial energético

Com exceção de algumas bactérias e animais, a celulose é encontrada na natureza unicamente na parede celular vegetal onde representa, em angiospermas, de 42 a 50% do peso seco vegetal e está associada à hemicelulose (25 a 35%) e lignina (20 a 25%) [60, 7]. Na biomassa lignocelulósica diversas unidades de β -D-glicopiranosose ligadas por meio de ligações glicosídicas β -1,4 formam uma microfibrila de celulose. A organização de várias microfibrilas gera uma fibrila. As fibrilas, por sua vez, se unem para formar as fibras de celulose. Estudos cristalográficos demonstraram a existência de diversos polimorfos da celulose, as celuloses I a IV, sendo a primeira a predominante em tecidos vegetais [8]. A celulose possui uma estrutura cristalina, o que se deve não apenas às ligações de hidrogênio intra e intercadeias, mas também a forças de van der Waals entre as fibras. O grau de cristalinidade da celulose é variável dentro da lignocelulose. A presença de "espaços", como poros e torções nas fibras, criam regiões amorfas mais suscetíveis à ação enzimática [9].

Na biomassa lignocelulósica a celulose encontra-se associada à hemi-

celulose, um polímero amorfo formado por pentoses (D-xilose e L-arabinose) e hexoses (D-glicose, D-galactose e D-manose), ligadas entre si por meio de ligações glicosídicas β -(1-3 e 1-4), sendo a xilose o açúcar majoritário; além de açúcares ácidos (ácido D-glicurônico e ácido 4-O-metil-glicurônico) [10]. Todavia, essa composição é variável, de acordo com a matriz vegetal. As madeiras duras possuem de 3 a 5% de glicomananas, um polímero linear formado por moléculas de manose, ou manose e glicose, ligadas por ligações glicosídicas β -1,4; enquanto que nas madeiras moles até 25% do peso seco da porção hemicelulósica é composta por O-acetil-galactoglicomananas, com um esqueleto formando por unidades de manose, galactose e glicose em uma proporção de 3:1:1 [11], [12], [13], [14].

Além da celulose e hemicelulose, existe ainda a lignina, um polímero fenólico aromático de alto valor econômico potencial. Entretanto, a lignina é normalmente descartada nas fábricas de papel, sendo eventualmente utilizada como combustível [15]. Seus precursores são três álcoois: *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico, com teores distintos de acordo com o tipo de lignina (derivada de madeiras moles, duras ou gramíneas) que, assim como para os demais componentes da biomassa vegetal, variam de acordo com o tipo de fonte vegetal [16].

Para a desconstrução do material celulósico, existem diversas enzimas hidrolíticas que atuam tanto sobre a celulose

quanto hemicelulose, liberando açúcares fermentáveis. A Tabela 1 apresenta as mais importantes enzimas hidrolíticas.

Além das enzimas hidrolíticas, existem as chamadas enzimas acessórias, que não estão diretamente envolvidas na sacarificação do material lignocelulósico, mas são capazes de influenciar grandemente a ação de enzimas hidrolíticas, aumentando a sua ação, como no caso das enzimas da família 61 (GH61), que são dependentes de cobre [25], [26]. Estas enzimas agem em sinergia com celulasas e apresentam similaridades estruturais com as proteínas CBM33, capazes de desorganizar a estrutura cristalina da celulose, melhorando o acesso das enzimas hidrolíticas às fibras da celulose [27]. Outro tipo de proteína acessória, conhecida como CBP21, também atua aumentando o acesso de proteínas hidrolíticas ao substrato, em uma ação sinérgica com essas enzimas [28]. As expansinas são proteínas vegetais que atuam como coadjuvantes no crescimento celular e amolecimento de frutas, apresentando grande potencial no pré-tratamento de biomassa [29], [30]. Foi encontrada ainda, em *Trichoderma reesei*, uma molécula com grande homologia com as expansinas – a *swollenina*. Esta molécula possui uma propriedade de “inchamento” de fibras de algodão com produção de açúcares redutores, o que evidencia seu potencial na desconstrução da biomassa [31]. A Figura 1 apresenta um esquema da estrutura da biomassa lignocelulósica com os locais

de ação das principais enzimas celulolíticas.

É claro o grande potencial energético da biomassa lignocelulósica para a produção de etanol celulósico. Entretanto, apesar da hemicelulose, assim como a celulose, possuir grandes quantidades de açúcares, estes são predominantemente pentoses, nem sempre fermentáveis pelos micro-organismos utilizados no processo fermentativo convencional, como no caso da *Saccharomyces cerevisiae*. Além disso, a xilana, principal componente da hemicelulose, pode inibir a ação hidrolítica de celulasas [32]. Diversos estudos vêm sendo realizados no sentido de produzir micro-organismos capazes de fermentar não só hexoses, mas também pentoses, para que seja possível a utilização dos produtos da hidrólise da hemicelulose, aumentando o rendimento do processo [33], [34].

Biodiversidade brasileira e seu potencial: micro-organismos cultiváveis celulolíticos e fermentadores e micro-organismos não cultiváveis e seus genes de interesse

A diversidade microbiana se refere à quantidade de indivíduos de determinada espécie e à riqueza de espécies de fungos, bactérias e arqueias existentes em determinado habitat [35], [36]. Os micro-organismos são responsáveis pela ciclagem de nutrientes no solo, o que os caracteriza como essenciais para a

TABELA 1 - PRINCIPAIS ENZIMAS CELULOLÍTICAS E HEMICELULOLÍTICAS COM SEUS RESPECTIVOS SUBSTRATOS

	Enzima*	IUBMB [17]	Substrato
Celulasas	β -D-glicosidase	EC 3.2.1.21	Celobiose
	Endo-1,4- β -D-glicanase	EC 3.2.1.4	Celulose amorfa (interna)
	Exo-1,4- β -D-glicanase (Celobiohidrolase I - CBH I)	EC 3.2.1.176	Celulose (extremidades redutoras)
	Exo-1,4- β -D-glicanase (Celobiohidrolase II - CBH II)	EC 3.2.1.91	Celulose (extremidades não redutoras)
Hemicelulasas	Endo-1,4- β -xilanase	EC 3.2.1.8	Xilana
	Xilanase oligossacarídica extremidade redutora	EC 3.2.1.156	Xilana (extremidade redutora)
	Xilana 1,2- α -glicuronosidase	EC 3.2.1.131	Xilana (madeiras duras)
	Xilana 1,4- β -xilosidase	EC 3.2.1.37	Xilana (extremidade não redutora)
	α -L-arabinofuranosidase	EC 3.2.1.55	α -L-arabinosídeos (extremidade não redutora)
	β -mananase (manana endo-1,4- β -manosidase)	EC 3.2.1.78	Mananas, galactomananas e glicomananas
	Exo- β -D-mananase	EC 3.2.1.25	β -D-manosídeos (extremidade não redutora)
	α -galactosidase	EC 3.2.1.22	α -D-galactosídeos (extremidade não redutora)

*Referências: [7], [12], [18], [19], [20], [21], [22], [23], [24].

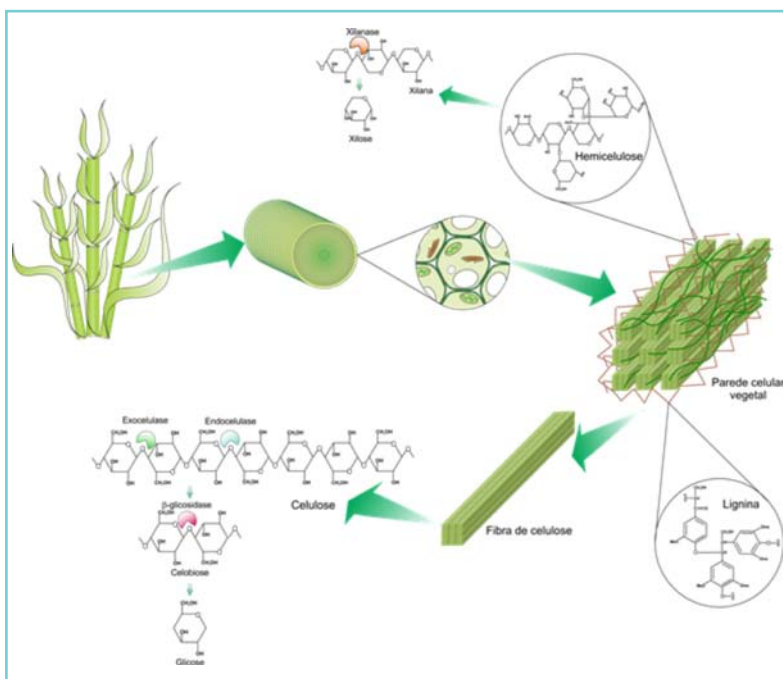


Figura 1 - Estrutura esquemática da biomassa da cana-de-açúcar e locais de ação das principais enzimas celulolíticas.

homeostase de um ecossistema [37]. A diversidade genética presente em determinado solo é capaz de indicar sua qualidade [38]. Devido à conjugação entre bactérias, o conceito de espécie para o estudo de biodiversidade de procariotos não foi definitivamente estabelecido, o que interfere no estudo destes micro-organismos [39], [40], [41]. Assim como as bactérias, os fungos são ubíquos no solo, também desempenhando importantes funções ecológicas [42]. Contudo, o entendimento destes é menor comparado ao das comunidades bacterianas, já que a maioria dos micologistas baseiam seus estudos em métodos de cultura [43].

A diversidade microbiana vem sido exaustivamente estudada, explorando diferentes ambientes. Em meados de 1980, Dr. Pace e colaboradores [44] propuseram a ideia de clonar DNA ambiental em hospedeiros e em 1991 publicaram seu primeiro estudo em que o DNA de uma amostra ambiental foi diretamente clonado em vetores fagos [45]. Posteriormente foram criadas bibliotecas metagenômicas denominadas *zoolibraries*, em que o DNA proveniente de micro-organismos presentes em di-

gestores anaeróbicos em funcionamento contínuo com biomassa lignocelulósica por mais de 10 anos foi clonado em um hospedeiro e clones com atividades celulolíticas foram identificados [46]. Em seguida, Dr. Delong e colaboradores criaram uma biblioteca de procariotos provenientes de água do mar. Nesta biblioteca foi identificada uma sequência de 16S rRNA proveniente de uma arqueia jamais cultivada anteriormente [47]. Tamames e colaboradores [41] mostraram que vários táxons podem ser encontrados em diferentes ambientes. Especificidade ambiental não é comum, contudo há uma preferência ambiental. Este estudo também mostra que o solo é um ambiente pouco restritivo, englobando um elevado número de táxons procarióticos.

A bioprospecção de solos, em busca de enzimas de interesse biotecnológico, é uma ferramenta potente, especialmente no caso da produção de etanol celulósico. Lakshmi e Narasimha [48] estudaram a produção de celulases por fungos isolados de solo de floresta. Um dos fungos isolados, *Aspergillus* sp., apresentou elevada capacidade celulolítica, indican-

do atividade de exoglicanase, endoglicanase e β -D-glicosidase. Picart e colaboradores [49] isolaram duas cepas de *Penicillium* sp. produtoras de celulases termoestáveis a partir de solos de floresta subtropical. Pang e colaboradores [18], usando abordagem metagenômica, identificaram uma nova endoglicanase em solos de compostagem.

No Brasil, Terceti [50], utilizando a metagenômica, foi capaz de avaliar a biodiversidade bacteriana em carvão pirogênico de Terra Preta Antropogênica de duas áreas de Floresta Amazônica. O filo predominante encontrado foi Acidobacteria, seguido de Proteobacteria, Firmicutes, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Nitrospira e Chloroflexi, entre outros. Castro e colaboradores [51] observaram, estudando a diversidade de fungos em solos do Cerrado, que o filo predominante em áreas com ação antrópica é o Ascomycota, contudo a riqueza aumenta conforme o solo recebe menos influência humana. Resultados semelhantes podem ser observados no trabalho de Quirino e colaboradores [52] que compararam solo de cerrado *sensu stricto* nativo com solo convertido em pastagem. No segundo há o predomínio do filo bacteriano Actinobacteria em relação ao solo de cerrado *sensu stricto* nativo, ou seja, também ocorreu diminuição da riqueza do solo com o aumento da ação antrópica, neste caso em uma ordem de 10 vezes. Faoro e colaboradores [53] estudaram a influência das características do solo como altitude e teores de cálcio, magnésio, alumínio e fósforo na biodiversidade da mata Atlântica brasileira. Este mesmo grupo, em outro estudo, também encontrou em solo de Mata Atlântica, por meio de uma abordagem metagenômica, uma lipase termoestável proveniente de uma Acidobacteria [54]. Bruce e colaboradores [55], também estudando a biodiversidade de solos de mata Atlântica, encontraram prevalência do filo Acidobacteria, em consonância com os estudos de Faoro.

Os micro-organismos estão presentes inclusive em animais, contudo estes ambientes requerem táxons especializadas, caracterizando-os como ambientes seletivos [41]. Cunha e colaboradores [56], a partir de técnicas independentes de cultivo, estudaram as comunidades de bactérias e arqueias em rúmen de ca-

prino do sertão nordestino. Foi identificada a presença de dois principais filos nas bibliotecas metagenômicas oriundas das amostras sólido-aderidas de rúmen e de fluido ruminal: Firmicutes e Bacteroidetes. Em relação às arqueias, o filo prioritário encontrado nas duas bibliotecas foi o Euryarchaeota, com grande prevalência do gênero *Methanobrevibacter*.

No mundo, a bioprospecção, especialmente em rúmen animal, é utilizada na busca por celulases. Del Pozo e colaboradores [57] identificaram, clonaram, expressaram, purificaram e caracterizaram uma β -glicosidase a partir de rúmen bovino, utilizando-se de técnicas metagenômicas. Existem estudos semelhantes a partir de rúmen de iaque (*Bos grunniens*) e búfalo (*Bubalus bubalis*) [58], [59].

Lynd, em um abrangente estudo sobre a utilização de celulose por micro-organismos, identificou os grupos celulolíticos distribuídos na natureza. A capacidade de digerir celulose está disseminada no domínio *Fungi*. No domínio *Bacteria* está concentrada nos Filos Actinobacteria, ordem aeróbica Actinomycetales e Filo Firmicutes, ordem anaeróbica Clostridiales [60]. Apesar da grande especificidade de algumas celulases produzidas por bactérias anaeróbicas, a sua produção é baixa, além do crescimento lento, o que levou os pesquisadores a focarem seus estudos em fungos anaeróbicos celulolíticos [61].

Em relação aos mecanismos celulolíticos, existem grandes diferenças entre os micro-organismos aeróbicos e anaeróbicos. No caso das bactérias e fungos aeróbicos o mecanismo modelo mais bem estudado é o do fungo *T. reesei* [62]. Este fungo secreta três grupos de celulases: as β -glicosidases, endo e exoglicanases, além de outras enzimas acessórias não tão bem estudadas [25]. Estas celulases atuam hidrolisando as ligações glicolíticas β -1,4 em diversas regiões da molécula de celulose, gerando produtos diversos. No caso dos micro-organismos anaeróbicos, as enzimas podem ser agregadas em grandes complexos aderidos à superfície das células, chamados de celulosomos [63]. Os celulosomos permitem às bactérias adesão ao substrato sem necessidade de produção de grandes quantidades de enzima a serem difundidas no espaço extracelular e fácil

acesso à glicose produzida [64]. Essa estrutura multienzimática, que pode conter de 14 a 50 polipeptídeos, chegando a 210 kDa, encontra-se aderida à superfície celular externa de bactérias como a *Clostridium thermocellum* e é formada não só por enzimas celulosídicas, mas também por proteínas estruturais que formam um arcabouço: as coesinas e CBM (*carbohydrate-binding module*), escafoldinas, e doquerinas, criando um grande complexo enzimático, conforme revisado por Demain e colaboradores [65] e Gilbert e colaboradores [66].

Vários micro-organismos já foram isolados do ambiente, crescidos em laboratório e utilizados com fins biotecnológicos, sendo a levedura *S. cerevisiae* um dos mais conhecidos [67]. O microrganismo celulolítico e/ou fermentador ideal deve ser seguro para os seres humanos e a natureza, sua produção deve ser elevada, assim como a eficiência da conversão do substrato em produto [68], além de ser necessário que um só microrganismo seja capaz não só de produzir os substratos por meio da hidrólise enzimática, mas que seja responsável também pela fermentação dos açúcares produzidos [60]. Lynd e colaboradores citam os tipos de microrganismos utilizados nos processos de produção de etanol celulósico: os naturalmente celulolíticos, geneticamente modificados para melhoria de características relacionadas ao produto, e os micro-organismos fermentadores não-celulolíticos, com alto rendimento na produção de etanol, geneticamente modificados para expressar sistemas celulolíticos heterólogos [69]. Olson e colaboradores [70] apresentaram duas estratégias para a criação dos micro-organismos supracitados: a estratégia nativa, em que se utilizam os micro-organismos capazes de utilizar os componentes insolúveis do material lignocelulósico e a estratégia recombinante, em que se parte de micro-organismos que não possuem essa característica inicial e por isso precisam expressar heterologicamente sistemas enzimáticos sacarolíticos.

Com o objetivo de encontrar micro-organismos na natureza capazes de converter biomassa em etanol, vários fungos e bactérias já foram estudados. Durante a década de 70 cientistas buscaram no-

vas leveduras capazes de converter tanto glicose quanto xilose em etanol. *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus* são leveduras promissoras no processo de fermentação de xilose [71]. Entretanto, essa conversão ocorre muito mais lentamente do que a de glicose pela *S. cerevisiae* devido a diversos fatores como maior requerimento de oxigênio, sensibilidade a altos teores de etanol no meio, além da presença de outros inibidores, o que acaba por manter a *S. cerevisiae* como levedura de escolha para o processo de produção de etanol lignocelulósico [71]. Cimpeanu e colaboradores [72] isolaram e testaram nove cepas de leveduras romenas, encontrando duas cepas de *S. cerevisiae* termotolerantes com potencial para a produção de etanol celulósico.

Entre os fungos utilizados o *Neurospora crassa* é um ótimo candidato, já que não só produz todas as enzimas celulolíticas necessárias para a hidrólise da biomassa, mas também é capaz de converter xilose em etanol; entretanto, pré-tratamento é necessário [73].

Bactérias anaeróbicas termofílicas também são micro-organismos muito utilizados na produção de etanol celulósico. Demain e colaboradores [65] estudaram o sistema celulolítico de *C. thermocellum*, uma bactéria anaeróbica que possui diversas vantagens na produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. A *C. thermocellum* não precisa de aeração, o que barateia o processo; ela possui uma temperatura ótima de crescimento elevada (60°C), o que facilita a recuperação do etanol, além de diminuir a possibilidade de contaminação. Entretanto, a produção ainda é baixa se comparada com a produção da *S. cerevisiae*, já que vários outros produtos inibidores também são produzidos durante a fermentação, além da inibição pelo próprio etanol. Além disso, o *C. thermocellum* não converte pentoses em etanol, sendo necessária a utilização de coculturas.

Outra bactéria muito utilizada, especialmente na produção de bebidas alcoólicas, é a *Zymomonas mobilis*, capaz de fermentar glicose, frutose e sacarose. Além da anaerobiose facultativa, a resistência à presença de etanol é uma vantagem na produção de bioetanol, entretanto, ela é incapaz de fermentar pentoses [74]. Cepas

TABELA 2 - ENSAIOS ENZIMÁTICOS PARA DETECÇÃO DE CLONES DE BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS PRODUTORES DE ENZIMAS DE INTERESSE PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO

Enzima	Substrato(s)	Revelação da atividade	Referências
α -amilase	Amido de milho	Remazol Brilliant Blue R	[91]
	Amido solúvel	Iodo	[92]
Exoglicanase	Metilumbiliferil β -D-celobiosídeo (MUC)	Luz UV	[46]
Celulase	Carboximetilcelulose (CMC), bagaço de cana, Avicel	Vermelho do Congo	[92], [93], [94]
β -glicosidase	Metilumbiliferil β -D-glicosídeo (MUG)	Luz UV	[46], [58]
	Esculina	Citrato de ferro	[95]
Xilanase	Palha de milho, Xilana	Vermelho do Congo	[96], [97]

modificadas de *Z. mobilis* capazes de fermentar xilose apresentam baixo rendimento devido à formação de xilitol, um inibidor do processo, o que se deve à ação de uma enzima, a xilose redutase. Agrawal e colaboradores [33] descobriram uma xilose redutase mutante em uma cepa modificada de *Z. mobilis* com baixa produção de xilitol e grande afinidade por xilulose, benzaldeído, furfural, acetaldeído e 5-hidroximetilfurfural, sendo uma excelente enzima modificada para o metabolismo da xilose, além de atuar como detoxificante no processo fermentativo. Outras cepas modificadas foram criadas para aumentar a capacidade fermentativa da *Z. mobilis*, como no trabalho de Deanda e colaboradores [75], em que o açúcar alvo é a L-arabinose, um dos principais componentes da hemicelulose em alguns tipos de biomassa, perdendo apenas para a xilose.

Diferentemente da *S. cerevisiae* e *Z. mobilis*, a bactéria *Escherichia coli* consegue metabolizar a maioria dos carboidratos presentes na biomassa lignocelulósica, além de ser amplamente estudada e de fácil manipulação, tendo sido melhoradas cepas produtoras de bioetanol [76], [77]. Entretanto, *E. coli* não possui status GRAS (*Generally Recognized As Safe*: sigla em inglês para "Geralmente Reconhecido como Seguro"), que é conferido aos micro-organismos amplamente estudados e utilizados na produção de alimentos e/ou medicamentos.

No que diz respeito aos micro-organismos não cultiváveis, os genes de interesse são triados a partir de bibliotecas metagenômicas. Geralmente, ao se construir uma biblioteca metagenômica, utiliza-se como hospedeiro a *E. coli*. Existem, porém, controvérsias quanto ao

uso de somente um microrganismo na construção de uma biblioteca metagenômica, pois isso pode gerar problemas de expressão de genes provenientes de outros micro-organismos [77]. Não obstante, estudos comprovam que a expressão gênica em *E. coli* não se limita somente a genes de Proteobacteria – filo ao qual a *E. coli* pertence –, pois genes de outros filos já foram expressados neste micro-organismo sem a necessidade de engenharia genética [78], [79], [80], [81], [82], [83], [84]. Outros candidatos a hospedeiros para a construção de bibliotecas metagenômicas incluem *Streptomyces*, *Bacillus* e *Archaea* [78].

As bibliotecas metagenômicas podem ser construídas utilizando pequenos ou grandes insertos de DNA, em que a decisão sobre qual utilizar depende do que se espera conseguir com a biblioteca. Quando se busca identificação de genes individuais ou produtos de genes, utilizam-se pequenos insertos. Porém, se o intuito da biblioteca é identificar *operons* e *clusters* de genes, os quais codificam vias degradativas ou biossintéticas completas, utilizam-se grandes insertos [85].

Na construção de bibliotecas de grandes insertos são utilizados cosmídeos, BACs ou fosmídeos [86], [87], [88]. Estas bibliotecas são utilizadas na análise do tamanho, complexidade e diversidade de um metagenoma. Por outro lado, ao longo prazo, as bibliotecas de pequenos insertos são mais apropriadas para gerar um número maior de clones de DNA do que as bibliotecas de grandes insertos [89], [90].

Para triagem de uma biblioteca metagenômica pode-se utilizar duas estratégias. Na triagem baseada em atividade enzimática, identificam-se novos ge-

nes que codificam para novos tipos ou classes de enzimas. Pode-se também identificar a síntese de novos compostos bioativos, pois esta estratégia dispensa a comparação das sequências obtidas à sequências já conhecidas. Porém, como já mencionado, a expressão dos genes clonados em hospedeiros diferentes pode gerar problemas de expressão enzimática. Com isso, clones com o potencial enzimático esperado podem passar despercebidos devido a resultados falso-negativos [77]. A Tabela 2 apresenta os principais ensaios de triagem de bibliotecas metagenômicas utilizados na atualidade com suas enzimas de interesse, substratos, métodos de revelação e referências bibliográficas.

A Figura 2 apresenta fotos de placas com clones positivos produtores de diversas enzimas como amilase, β -glicosidase, exoglicanase, celulase de baixa e alta viscosidades e xilanase.

Por outro lado, na segunda estratégia, triagem da biblioteca por semelhança de sequências, não existe a limitação gerada pelo problema de expressão enzimática. Aqui criam-se sondas de DNA ou *primers* derivados de sequências de genes ou proteínas já identificados por outros trabalhos [77]. Porém, esta técnica pode não selecionar genes completos e cada clone identificado requer muito trabalho em sua análise [98]. Outro fator limitante é que só serão encontrados genes com sequências homólogas a outros previamente identificados [77], [85].

Produção de etanol celulósico, seus inibidores e desafios

A produção de etanol celulósico se dá a partir da hidrólise de materiais lignoce-

lulósicos para obtenção de açúcares fermentáveis. Entretanto, para se obter estes açúcares, a biomassa lignocelulósica deve ser submetida a processos prévios, os quais serão descritos a seguir.

Pré-tratamentos

A recalcitrância dos materiais lignocelulósicos à hidrólise se deve a diversos fatores como a cristalinidade e baixa solubilidade da celulose, teor de lignina na biomassa, difícil acesso de micro-organismos e suas enzimas celulolíticas à celulose e hemicelulose, entre outros. Se faz necessário o uso de pré-tratamentos, numa tentativa de expor as fibras de celulose às enzimas, eliminar a lignina sem degradar a hemicelulose, evitar a formação de subprodutos inibidores dos micro-organismos fermentadores e enzimas celulolíticas, além de reduzir custos [99]. O pré-tratamento a ser usado deve ser escolhido de acordo com o tipo de biomassa disponível, já que cada pré-tratamento atua de maneira distinta nos sub-componentes da biomassa, assim como de acordo com o processo como um todo.

Os pré-tratamentos podem ser físicos (fragmentação mecânica, pirólise e irradiação), químicos (hidrólise ácida, hidrólise alcalina, ozonólise, amônia, processo Organosolv e SO_2), físico-químicos (craqueamento ou explosão a vapor, oxidação úmida e pré-tratamentos hidrotérmicos) ou biológicos (pré-tratamento por fungos ou Biorganosolv), ou ainda, uma combinação dessas técnicas [100], [101]. Entre os principais pré-tratamentos utilizados para a produção de etanol a partir de bagaço de cana encontra-se a *explosão a vapor* em que uma combinação de temperatura e pressão elevadas seguida de descompressão leva à quebra da estrutura lignocelulósica [102]. Essa técnica pode ser combinada com o uso de ácido sulfúrico diluído e possui diversas vantagens como menor custo energético, se comparada à fragmentação mecânica, e não geração de resíduos poluentes. Entretanto, existe a formação de inibidores que podem atuar sobre os micro-organismos fermentadores [103].

A *hidrólise ácida* utiliza diversos ácidos (peróxido, sulfúrico, fórmico, acético) concentrados ou diluídos. Áci-

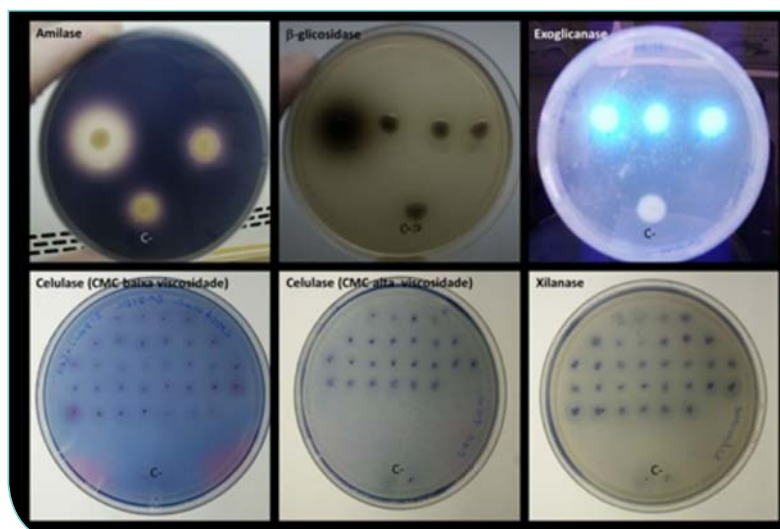


Figura 2 - Resultados de triagem de clones positivos para diversos tipos de substratos.

dos concentrados são pouco utilizados devido às dificuldades de trabalho, já que são corrosivos, poluentes, tóxicos e geram subprodutos indesejáveis, sendo preferidos os ácidos diluídos [104], [105].

A *hidrólise alcalina* atua nas ligações éster da lignina, tanto internas quanto entre a lignina e hemicelulose, saponificando-as [103]. No processo de *explosão das fibras com amônia (AFEX)*, o material lignocelulósico é tratado com amônia líquida em temperatura moderada e alta pressão, que, a exemplo da explosão a vapor, é liberada rapidamente, levando ao rompimento das fibras do material lignocelulósico. Este processo não produz inibidores e o material não precisa ser previamente particulado, mas a amônia é poluente e deve ser reciclada [9].

Os *líquidos iônicos (LI)* são uma combinação de um cátion orgânico com um ânion, que pode ou não ser orgânico. A capacidade de desorganizar a estrutura tridimensional não apenas da celulose, mas também da hemicelulose e lignina, se deve a capacidade que esses sais possuem de competir por ligações de hidrogênio, as quais são responsáveis pela organização estrutural da celulose [106], [107].

Os *pré-tratamentos biológicos* são considerados “limpos”, já que não produzem os subprodutos tóxicos encontrados nos pré-tratamentos quí-

micos, como ácidos e inibidores [108], além de reduzir os custos com energia elétrica utilizada nos processos físicos. São empregados fungos e bactérias degradadores de lignocelulose por meio da produção de enzimas hidrolíticas e oxidativas. Os fungos capazes de produzir tais enzimas são classificados em (1) *White-Rot Fungi*; (2) *Brown-Rot Fungi*, e (3) *Soft-Rot Fungi* [62].

Os *White-Rot Fungi* são considerados os mais abundantes e eficientes degradadores de lignina na natureza [109], talvez pelo fato de produzirem enzimas com alta processividade, diferentemente dos *Brown-Rot Fungi*, apesar de alguns relatos contrários [110]. Além disso, os *White-Rot Fungi* aparentemente atuam de maneira sinérgica com bactérias [111]. Os *White-Rot Fungi* são quase na sua totalidade Basidiomicetos (com alguns Ascomicetos) e possuem como alvo principal a lignocelulose de angiospermas. Produzem lacases e peroxidases [108], [109], [112], [113], [114], [115]. Os *Brown-rot Fungi* também são Basidiomicetos e Ascomicetos e atuam preferencialmente na hemicelulose e celulose de gimnospermas, por meio da produção de endo, exoglicanases e β -glicosidases [110], [116], [117], [118]. Já os *Soft-Rot Fungi* são Ascomicetos e fungos mitosporicos, atuando na lignina por mecanismos poucos conhecidos até o momento [119].

T. reesei é um *Soft-Rot Fungi* muito conhecido e utilizado por suas celulases e hemicelulases, sendo seu mecanismo de degradação lignocelulósica o mais bem estudado até o momento [62].

Apesar das vantagens apresentadas no uso de fungos como pré-tratamento de biomassa, o longo tempo de atuação e inibição pelos seus subprodutos ainda não os torna viáveis para uso em escala industrial [115]. Entretanto, estudos estão sendo conduzidos no sentido de viabilizar o uso deste tipo de pré-tratamento. Holmgren e Sellstedt usaram dois fungos distintos, *White-Rot Fungi* (*Trametes versicolor*) e *Soft-Rot Fungi* (*Chalara parvispora*), associados com *S. cerevisiae* no processo de sacarificação e fermentação simultânea (SSF), em uma tentativa de aumentar a produção de etanol celulósico a partir da hemicelulose, já que o fungo *C. parvispora* produz etanol utilizando xilose como substrato [120].

Subprodutos tóxicos – inibidores

Durante o pré-tratamento do material lignocelulósico, especialmente quando do uso de ácidos fortes ou elevadas temperaturas, existe a formação de subprodutos tóxicos que são inibidores do crescimento celular, ação enzimática e fermentação. Olsson e Hahn-Hägerdal [121] classificaram os compostos inibidores em cinco grupos: (1) compostos liberados durante o pré-tratamento (ácido acético), (2) produtos de degradação de açúcares (2-furaldeído (furfural) e 5-hidroximetilfurfural, provenientes da desidratação da glicose e xilose, respectivamente), (3) produtos de degradação da lignina (compostos fenólicos), (4) produtos da fermentação (ácidos orgânicos, acetaldeído e etanol) e (5) metais pesados provenientes da corrosão dos equipamentos utilizados no processo pelo ácidos utilizados na hidrólise, como cromo, cobre, ferro e níquel [122], [123]. Por vezes a inibição pode se dar por sinergia entre estes compostos e outros fatores, como no caso do ácido acético, o qual atua em sua forma dissociada, dependente do pH [124]. Existem diversos métodos para evitar a ação deletéria dos compostos inibidores, os quais podem ser químicos, físicos ou biológicos

ou, ainda, uma combinação destes. Taherzadeh e colaboradores [125] identificaram quatro abordagens distintas: (1) evitar que, durante a hidrólise, os compostos inibidores se formem, (2) desintoxicação dos hidrolisados prévia à fermentação, (3) desenvolvimento de micro-organismos tolerantes a estes inibidores, e (4) desintoxicação *in situ* por meio da bioconversão dos inibidores. A escolha do melhor método a ser empregado é função do material lignocelulósico e pré-tratamento utilizados [123]. Nichols e colaboradores [126] inocularam material lignocelulósico pré-tratado com o fungo *Coniochaeta ligniaria* para metabolização e remoção de inibidores antes do processo fermentativo. Para evitar a formação de metais pesados e subprodutos tóxicos pela ação de ácidos fortes, diversos estudos foram feitos prevendo o uso de ácido fosfórico, um ácido mais fraco e caldeiras de metal inoxidável [127], [128], [129]. Almeida e colaboradores [130] avaliaram os efeitos deletérios dos furaldeídos e processos de neutralização dos mesmos, como detoxificação e biorredução. Alriksson e colaboradores [131] utilizaram agentes redutores para detoxificar hidrolisados enzimáticos de lignocelulose, aumentando a fermentabilidade dos mesmos.

Produção de Etanol Celulósico – hidrólise enzimática e fermentação

Existem vários métodos de hidrólise e fermentação para a produção de etanol. A partir da hidrólise do material lignocelulósico dois tipos de açúcares são liberados, as pentoses e hexoses. Os micro-organismos normalmente apresentam uma característica chamada de Repressão Catabólica (CCR), em que dão preferência a um açúcar para fermentação em detrimento de açúcares secundários (mesmo que sejam capazes de fermentar pentoses e hexoses). Geralmente esse açúcar é a glicose, o que pode ser explicado por sua maior abundância na natureza. Estes micro-organismos só irão começar a fermentar as pentoses após a depleção da glicose existente. Sendo assim, a presença de glicose no meio inibe a fermentação das pentoses [132]. A presença do açúcar

preferencial pode atuar inibindo a expressão ou atividade de sistemas catabólicos de açúcares secundários [133]. Existem micro-organismos que naturalmente possuem o sistema CCR-negativo, como a *S. cerevisiae*, *Lactobacillus brevis*, *E. coli*, *Klebsiella oxytoca* e *Z. mobilis*, enquanto outros foram geneticamente modificados para permitir ou melhorar a utilização simultânea de dois ou mais açúcares, como a *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* e os mesmos *E. coli*, *K. oxytoca*, *S. cerevisiae* e *Z. mobilis*, entre outros [134], [135], [136], [137], [132], [138], [139], [140].

Ainda sobre os tipos de produção, a hidrólise e fermentação podem ser realizadas simultaneamente ou em separado e coquetéis enzimáticos ou micro-organismos podem ser usados. Deve-se observar que, em função do material lignocelulósico utilizado, o pré-tratamento, hidrólise e fermentação mais adequados devem ser associados, gerando um grande número de combinações possíveis, o que pode ser observado em inúmeros trabalhos científicos disponíveis hoje.

Na *Hidrólise e Fermentação Separadas (SHF)* a hidrólise da celulose e hemicelulose ocorre em um reator para a posterior fermentação dos açúcares resultantes em outra, o que facilita o ajuste de parâmetros de reação (pH e temperatura) de hidrólise e fermentação. Entretanto, ocorre a inibição da hidrólise e fermentação pelos subprodutos da mesma, além de maiores custos de produção (tempo e espaço) [141], [142].

O processo de *Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF)* foi inventado e patenteado por Gauss e colaboradores em 1976, após a observação de que a hidrólise era limitada pelos subprodutos da mesma (glicose e celobiose) e que, com a fermentação simultânea destes subprodutos, os níveis de hidrólise se mantinham e, com isso, a produção de etanol era elevada [143]. Além disso, há redução nos custos, já que o processo ocorre em um equipamento apenas. Entretanto, os parâmetros favoráveis para a hidrólise e fermentação são diferentes (pH e temperatura), dificultando o estado ótimo das duas reações. E ainda, a reciclagem de enzimas e fermentadores é dificultada [144]. Também deve-se observar o problema

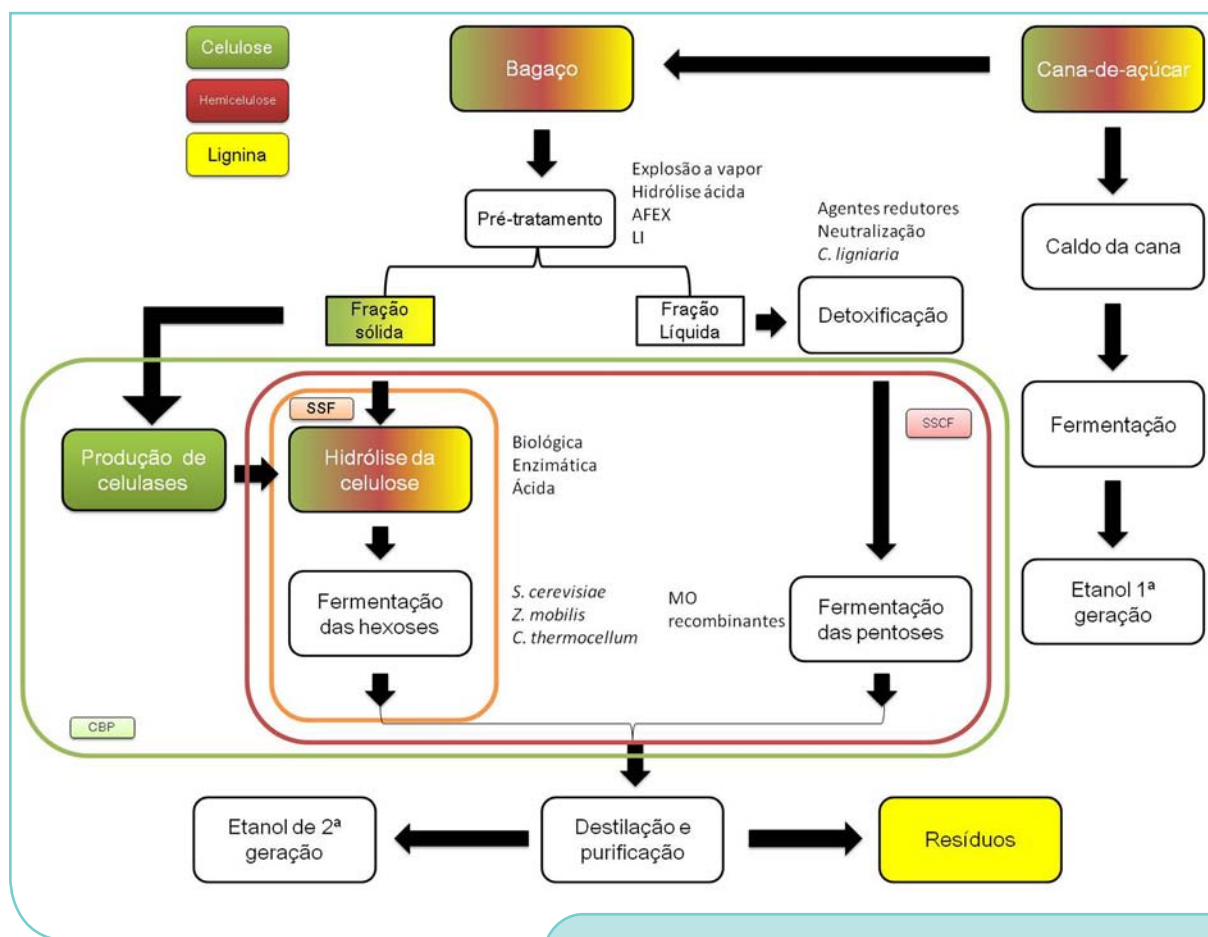


Figura 3 - Processos de produção de etanol a partir de cana-de-açúcar.

de acúmulo de pentoses, no caso de uso de micro-organismos fermentadores que possuem CCR. Estes só irão começar a fermentar as pentoses após a depleção da glicose no meio de reação, o que dificilmente irá acontecer em um processo do tipo SSF, já que novas moléculas de glicose estão sendo liberadas ao mesmo tempo e compartimento em que ocorre a fermentação [132].

Na *Sacarificação e Cofermentação Simultâneas (SSCF)*, a hidrólise do material lignocelulósico e fermentação das pentoses e hexoses ocorrem simultaneamente, em um mesmo equipamento, diferentemente do que ocorre na SSF onde, após o pré-tratamento da lignocelulose, existe a separação da celulose e hemicelulose para a fermentação, sendo que o processo de SSF utiliza apenas as moléculas de glicose provenientes da hidrólise da celulose para a posterior

fermentação, enquanto que na SSCF os produtos da hemicelulose também são fermentados [127], [145], [132]. Aqui, os micro-organismos fermentadores apresentam CCR-negativa, naturalmente ou por meio de engenharia genética [145], [146], [147]. Entretanto, pelas diferentes temperaturas ótimas de sacarificação e hidrólise, altas concentrações de enzimas são necessárias, o que eleva os custos [148].

No *Bioprocessamento Consolidado (CBP)* ou *Conversão Microbial Direta (DMC)* a produção de enzimas, hidrólise da biomassa e fermentação das hexoses e pentoses ocorrem em um só passo, sem adição de enzimas. As vantagens deste tipo de processo são claras: redução de custos de resfriamento e adequação do processo à países tropicais, menor necessidade de matérias-primas, menores riscos de contaminação e

maior eficiência no processo hidrolítico [149], [150]. Abdel-Banat e colaboradores [151], utilizando uma cepa termotolerante da levedura *Kluyveromyces marxianus*, demonstraram que um aumento de apenas 5°C na temperatura de fermentação afeta fortemente os custos da produção do bioetanol. Entretanto, são necessários micro-organismos altamente especializados, capazes de produzir todas as enzimas necessárias, resistentes a elevadas temperaturas e inibidores resultantes do processo hidrolítico; o que não é uma realidade até o momento. Como na SSF, a grande diferença entre a temperatura ideal de sacarificação e fermentação representa um desafio na seleção de micro-organismos adequados. Na Figura 3 estão representados esquematicamente diversos tipos de processo de produção de etanol celulósico.

Perspectivas

Pode-se observar grandes avanços no entendimento dos processos envolvidos com a produção do bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica. Entretanto, tornou-se clara a complexidade e diversidade da mesma segundo espécie vegetal; para cada matéria-prima diversos parâmetros devem ser ajustados para obtenção de rendimento máximo. Além disso, a biodiversidade microbiana brasileira apresenta inúmeras possibilidades de novos micro-organismos que potencialmente podem baratear custos e simplificar o processo de produção de etanol se forem trabalhados em conjunto com a biomassa escolhida. Além dos micro-organismos cultivados, há também que se explorar a riqueza metabólica dos micro-organismos não cultiváveis através da metagenômica. O desenvolvimento de programas de melhoramento de biomassa em conjunto com processos industriais em que micro-organismos e/ou seus produtos são utilizados tem grande potencial para aumentar a competitividade brasileira para produção de etanol celulósico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FAO, *Assessment of the world food security situation*, in *FAO Committee on World Food Security*. Sess. 33. R.I.E.a.S.D.D. FAO and D. ES, Editors. 2007: Rome (Italy).
2. Petrobrás, *Biocombustíveis: o que você precisa saber sobre este novo mercado*, C.I.d.A.d. Petrobrás, Editor 2008. p. 58.
3. CGEE, *Química Verde no Brasil 2010-2030*. 1ª ed 2010, Brasília - DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE). 438.
4. Mtui, G.Y.S., *Recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and production of value added products*. *African Journal of Biotechnology*, 2009. **8**(8): p. 1398-1415.
5. Torsvik, V., J. Goksoyr, and F.L. Daae, *High diversity in DNA of soil bacteria*. *Appl Environ Microbiol*, 1990. **56**(3): p. 782-7.
6. Handelsman, J., *Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004. **68**(4): p. 669-85.
7. Kumar, R., S. Singh, and O.V. Singh, *Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2008. **35**(5): p. 377-391.
8. Liu, C.F., et al., *Isolation and characterization of cellulose obtained from ultrasonic irradiated sugarcane bagasse*. *J Agric Food Chem*, 2006. **54**(16): p. 5742-8.
9. Lynd, L.R., et al., *Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002. **66**(3): p. 506-77, table of contents.
10. Sun, J.X., et al., *Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses*. *Carbohydrate Polymers*, 2004. **56**: p. 10.
11. Timell, T.E., *Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses*. *Wood Science and Technology*, 1967. **1**(1): p. 45-70.
12. Stoll, D., H. Stalbrand, and R.A.J. Warren, *Mannan-degrading enzymes from *Cellulomonas fimi**. *Appl Environ Microbiol*, 1999. **65**(6): p. 2598-2605.
13. Kirk, T.K. and D. Cullen, *Enzymology and Molecular Genetics of Wood Degradation by White-Rot Fungi*, in *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*, R.A. Young and M. Akhtar, Editors. 1998, John Wiley & Sons, Inc.: New York, NY. p. 273-307.
14. Scheller, H.V. and P. Ulvskov, *Hemicelluloses*, in *Annual Review of Plant Biology*, Vol 61, S. Merchant, W.R. Briggs, and D. Ort, Editors. 2010. p. 263-289.
15. Suhas, P.J. Carrott, and M.M. Ribeiro Carrott, *Lignin—from natural adsorbent to activated carbon: a review*. *Bioresour Technol*, 2007. **98**(12): p. 2301-12.
16. Boeriu, C.G., et al., *Characterisation of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy*. *Industrial Crops and Products*, 2004. **20**: p. 14.
17. IUBMB. Available from: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>.
18. Pang, H., et al., *Identification of Cellulase Genes from the Metagenomes of Compost Soils and Functional Characterization of One Novel Endoglucanase*. *Current Microbiology*, 2009. **58**(4): p. 404-408.
19. Kulkarni, N., A. Shendye, and M. Rao, *Molecular and biotechnological aspects of xylanases*. *Fems Microbiology Reviews*, 1999. **23**(4): p. 411-456.
20. Haapala, R., et al., *Production of endo-1,4-β-glucanase and xylanase by *Trichoderma reesei* immobilized on polyurethane foam*. *Biotechnology Techniques*, 1994. **8**(6): p. 401-406.
21. Duffaud, G.D., et al., *Purification and characterization of extremely thermostable beta-mannanase, beta-mannosidase, and alpha-galactosidase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga neapolitana* 5068*. *Appl Environ Microbiol*, 1997. **63**(1): p. 169-77.
22. Parker, K.N., et al., *Galactomannanases Man2 and Man5 from *Thermotoga* species: growth physiology on galactomannans, gene sequence analysis, and biochemical properties of recombinant enzymes*. *Biotechnol Bioeng*, 2001. **75**(3): p. 322-33.
23. Simpson, H.D., U.R. Haufler, and R.M. Daniel, *An extremely thermostable xylanase from the thermophilic eubacterium *Thermotoga**. *Biochemical Journal*, 1991. **277**: p. 413-417.
24. Srisodsuk, M., et al., *Modes of action on cotton and bacterial cellulose of a homologous endoglucanase-exoglucanase pair from *Trichoderma reesei**. *European Journal of Biochemistry*, 1998. **251**(3): p. 885-892.
25. Harris, P.V., et al., *Stimulation of Lignocellulosic Biomass Hydrolysis by Proteins of Glycoside Hydrolase Family 61: Structure and Function of a Large, Enigmatic Family*. *Biochemistry*, 2010. **49**(15): p. 3305-3316.
26. Quinlan, R.J., et al., *Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011. **108**(37): p. 15079-15084.
27. Vaaje-Kolstad, G., et al., *An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides*. *Science*, 2010. **330**(6001): p. 219-222.
28. Eijsink, V.G.H., et al., *Towards new enzymes for biofuels: lessons from chitinase research*. *Trends in Biotechnology*, 2008. **26**(5): p. 228-235.
29. Cosgrove, D.J., *Loosening of plant cell walls by expansins*. *Nature*, 2000. **407**(6802): p. 321-326.

30. Lee, Y., D. Choi, and H. Kende, *Expansins: ever-expanding numbers and functions*. Current Opinion in Plant Biology, 2001. **4**(6): p. 527-532.
31. Yao, Q., et al., *Gene Cloning and Heterologous Expression of a Novel Endoglucanase, Swollenin, from Trichoderma pseudokoningii* S38. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2008. **72**(11): p. 2799-2805.
32. Zhang, J., M. Tang, and L. Viikari, *Xylans inhibit enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials by cellulases*. Bioresource Technology, 2012. **121**: p. 8-12.
33. Agrawal, M. and R.R. Chen, *Discovery and characterization of a xylose reductase from Zymomonas mobilis ZM4*. Biotechnology Letters, 2011. **33**(11): p. 2127-2133.
34. George, S.P., A. Ahmad, and M.B. Rao, *A novel thermostable xylanase from Thermomonospora sp.: influence of additives on thermostability*. Bioresource Technology, 2001. **78**(3): p. 221-224.
35. Altieri, M.A., *The ecological role of biodiversity in agroecosystems*. Agriculture Ecosystems & Environment, 1999. **74**(1-3): p. 19-31.
36. Nannipieri, P., et al., *Microbial diversity and soil functions*. European Journal of Soil Science, 2003. **54**(4): p. 655-670.
37. Moreira, F.M.S. and J.O. Siqueira, *Microbiologia e bioquímica do solo* 2006: UFPA.
38. Lambais, M.R., et al., *Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas*, in *Tópicos em ciência do solo*, S.B.d.C.d. Solo, Editor 2005, Vidal-Torrado, P., Alleoni, L.R.F., Cooper, M., Silva, A.P., Cardoso, E.J., orgs.: Viçosa, MG. p. 41.
39. Gevers, D., et al., *Re-evaluating prokaryotic species*. Nat Rev Micro, 2005. **3**(9): p. 733-739.
40. Lammel, D.R., *Diversidade de rizóbios em florestas de Araucária angustifolia no estado de São Paulo [online]*, in *Dissertação de Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas* 2007, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo: Piracicaba.
41. Tamames, J., et al., *Environmental distribution of prokaryotic taxa*. BMC Microbiology, 2010. **10**.
42. Christensen, M., *A view of fungal ecology*. Mycologia, 1989. **81**(1): p. 19.
43. Anderson, I.C. and J.W.G. Cairney, *Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques*. Environmental Microbiology, 2004. **6**(8): p. 769-779.
44. Pace, N.R., et al., *The analysis of natural microbial-populations by ribosomal-RNA sequences*. Advances in Microbial Ecology, 1986. **9**: p. 1-55.
45. Schmidt, T.M., E.F. Delong, and N.R. Pace, *Analysis of a marine picoplankton community by 16S ribosomal-RNA gene cloning and sequencing*. Journal of Bacteriology, 1991. **173**(14): p. 4371-4378.
46. Healy, F.G., et al., *Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in a thermophilic, anaerobic digester maintained on lignocellulose*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995. **43**(4): p. 667-674.
47. Stein, J.L., et al., *Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon*. J Bacteriol, 1996. **178**(3): p. 591-9.
48. Lakshmi, A.S. and G. Narasimha, *Production of cellulases by fungal cultures isolated from forest litter soil*. Annals of Forest Research, 2012. **55**(1): p. 85-92.
49. Picart, P., P. Diaz, and F.I.J. Pastor, *Cellulases from two Penicillium sp strains isolated from subtropical forest soil: production and characterization*. Letters in Applied Microbiology, 2007. **45**(1): p. 108-113.
50. Terceti, M.d.S., *Diversidade bacteriana do gene 16S rRNA em carvão pirogênico de Terra Preta Antropogênica da Amazônia Central e Oriental*, in *Centro de Energia Nuclear na Agricultura* 2009, Universidade de São Paulo: Piracicaba. p. 124.
51. de Castro, A.P., et al., *Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture fields*. Arch Microbiol, 2008. **190**(2): p. 129-39.
52. Quirino, B.F., et al., *Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation*. Microbiol Res, 2009. **164**(1): p. 59-70.
53. Faoro, H., et al., *Influence of Soil Characteristics on the Diversity of Bacteria in the Southern Brazilian Atlantic Forest*. Appl Environ Microbiol, 2010. **76**(14): p. 4744-4749.
54. Faoro, H., et al., *Characterization of a new Acidobacteria-derived moderately thermostable lipase from a Brazilian Atlantic Forest soil metagenome*. Fems Microbiology Ecology, 2012. **81**(2): p. 386-394.
55. Bruce, T., et al., *Bacterial Community Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Soils*. Microbial Ecology, 2010. **60**(4): p. 840-849.
56. Cunha, I.S., et al., *Bacteria and Archaea community structure in the rumen microbiome of goats (Capra hircus) from the semiarid region of Brazil*. Anaerobe, 2011. **17**(3): p. 118-124.
57. Del Pozo, M.V., et al., *Microbial beta-glucosidases from cow rumen metagenome enhance the saccharification of lignocellulose in combination with commercial cellulase cocktail*. Biotechnology for Biofuels, 2012. **5**.
58. Bao, L., et al., *Screening and characterization of a cellulase with endocellulase and exocellulase activity from yak rumen metagenome*. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2011. **73**(1-4): p. 104-110.
59. Nguyen, N.H., et al., *Identification and Characterization of a Cellulase-Encoding Gene from the Buffalo Rumen Metagenomic Library*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2012. **76**(6): p. 1075-1084.
60. Lynd, L.R., et al., *Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology* (vol 66, pg 506, 2002). Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002. **66**(4): p. 739-739.
61. Duff, S.J.B. and W.D. Murray, *Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review*. Bioresource Technology, 1996. **55**(1): p. 1-33.
62. Hatakka, A. and K. Hammel, *Fungal Biodegradation of Lignocelluloses*, in *Industrial Applications*, M. Hofrichter, Editor 2010, Springer Berlin Heidelberg. p. 319-340.
63. Lamed, R., et al., *The Cellulosome: a discrete cell surface organelle of Clostridium thermocellum which exhibits separate antigenic, cellulose-binding and various cellulolytic activities*. Biotechnology and Bioengineering, 1983: p. 163-181.
64. Murray, W.D., L.C. Sowden, and J.R. Colvin, *Localization of the cellulase activity of Bacteroides cellulosolvens*. Letters in Applied Microbiology, 1986. **3**(3): p. 69-72.
65. Demain, A.L., M. Newcomb, and J.H. Wu, *Cellulase, clostridia, and ethanol*. Microbiol

Mol Biol Rev, 2005. **69**(1): p. 124-54.

66. Gilbert, H.J., *Cellulosomes: microbial nanomachines that display plasticity in quaternary structure*. Molecular Microbiology, 2007. **63**(6): p. 1568-1576.

67. Antoni, D., V.V. Zverlov, and W.H. Schwarz, *Biofuels from microbes*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007. **77**(1): p. 23-35.

68. Jang, Y.-S., et al., *Engineering of microorganisms for the production of biofuels and perspectives based on systems metabolic engineering approaches*. Biotechnology Advances, 2012. **30**(5): p. 989-1000.

69. Lynd, L.R., et al., *Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update*. Current Opinion in Biotechnology, 2005. **16**(5): p. 577-583.

70. Olson, D.G., et al., *Recent progress in consolidated bioprocessing*. Current Opinion in Biotechnology, 2012. **23**(3): p. 396-405.

71. Hahnagerdal, B., et al., *Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts*. Enzyme and Microbial Technology, 1994. **16**(11): p. 933-943.

72. Cimpeanu, C., et al., *Bioethanol production by new thermotolerant Romanian yeast strains*. Romanian Biotechnological Letters, 2010. **15**(3): p. 5310-5316.

73. Dogaris, I., et al., *Bioconversion of dilute-acid pretreated sorghum bagasse to ethanol by Neurospora crassa*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012. **95**(2): p. 541-550.

74. Letti, L.A.J., et al., *Ethanol production from soybean molasses by Zymomonas mobilis*. Biomass and Bioenergy, 2012. **44**(0): p. 80-86.

75. Deanda, K., et al., *Development of an arabinose-fermenting Zymomonas mobilis strain by metabolic pathway engineering*. Appl Environ Microbiol, 1996. **62**(12): p. 4465-4470.

76. Sanny, T., et al., *Engineering of ethanolic E. coli with the Vitreoscilla hemoglobin gene enhances ethanol production from both glucose and xylose*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010. **88**(5): p. 1103-1112.

77. Daniel, R., *The soil metagenome - a rich resource for the discovery of novel natural products*. Current Opinion in Biotechnology, 2004. **15**(3): p. 199-204.

78. Handelsman, J., et al., *Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products*. Chem Biol, 1998. **5**(10): p. R245-9.

79. Courtois, S., et al., *Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation*. Environmental Microbiology, 2001. **3**(7): p. 431-439.

80. Hurt, R.A., et al., *Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(10): p. 4495-4503.

81. Santosa, D.A., *Rapid extraction and purification of environmental DNA for molecular cloning applications and molecular diversity studies*. Molecular Biotechnology, 2001. **17**(1): p. 59-64.

82. Stokes, H.W., et al., *Gene cassette PCR: Sequence-independent recovery of entire genes from environmental DNA*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(11): p. 5240-5246.

83. Daniel, R., *Construction of Environmental Libraries for Functional Screening of Enzyme Activity*, in *Directed Molecular Evolution of Proteins* 2003, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 63-78.

84. Courtois, S., et al., *Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(1): p. 49-55.

85. Schmeisser, C., H. Steele, and W.R. Streit, *Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007. **75**(5): p. 955-962.

86. Entcheva, P., et al., *Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(1): p. 89-99.

87. Rondon, M.R., et al., *Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(6): p. 2541-7.

88. Treusch, A.H., et al., *Characterization of large-insert DNA libraries from soil for environmental genomic studies of Archaea*. Environmental Microbiology, 2004. **6**(9): p. 970-980.

89. Venter, J.C., et al., *Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea*. Science, 2004. **304**(5667): p. 66-74.

90. Banfield, J.F., et al., *Proteogenomic approaches for the molecular characterization of natural microbial communities*. Omics-a Journal of Integrative Biology, 2005. **9**(4): p. 301-333.

91. Akpan, I., M.O. Bankole, and A.M. Adesemowo, *A rapid plate culture method for screening of amylase producing micro-organisms*. Biotechnology Techniques, 1999. **13**(6): p. 411-413.

92. Scheirlinck, T., et al., *Integration and expression of alpha-amylase and endoglucanase genes in the Lactobacillus-plantarum chromosome*. Appl Environ Microbiol, 1989. **55**(9): p. 2130-2137.

93. Voget, S., H.L. Steele, and W.R. Streit, *Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase*. Journal of Biotechnology, 2006. **126**(1): p. 26-36.

94. Todaka, N., et al., *Screening of Optimal Cellulases from Symbiotic Protists of Termites through Expression in the Secretory Pathway of Saccharomyces cerevisiae*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2011. **75**(11): p. 2260-2263.

95. Eberhart, B., D.F. Cross, and L.R. Chase, *Beta-glucosidase system of Neurospora crassa. I. Beta-glucosidase + cellulase activities of mutant + wild-type strains*. Journal of Bacteriology, 1964. **87**(4): p. 761-8.

96. Alves-Prado, H., et al., *Screening and Production Study of Microbial Xylanase Producers from Brazilian Cerrado*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010. **161**(1-8): p. 333-346.

97. Teather, R.M. and P.J. Wood, *Use of congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen*. Appl Environ Microbiol, 1982. **43**(4): p. 777-780.

98. Knietzsch, A., et al., *Metagenomes of complex microbial consortia derived from different soils as sources for novel genes conferring formation of carbonyls from short-chain polyols on Escherichia coli*. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2003. **5**(1): p. 46-56.

99. Balata, M., H. Balata, and C. Öz, *Progress in bioethanol processing*. Progress in Energy

and Combustion Science, 2008. **34**: p. 23.

100. Zheng, Y., Z. Pan, and R. Zhang, *Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production*. International Journal of Agricultural and Biological Engineering, 2009. **2**(3): p. 18.

101. Mosier, N., et al., *Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass*. Bioresource Technology, 2005. **96**(6): p. 673-686.

102. Morjanoff, P.J. and P.P. Gray, *Optimization of Steam Explosion as a method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymatic saccharification*. Biotechnology and Bioengineering, 1987. **29**(6): p. 733-741.

103. Sun, Y. and J. Cheng, *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*. Bioresource Technology, 2002. **83**: p. 11.

104. Torget, R.W., J.S. Kim, and Y.Y. Lee, *Fundamental Aspects of Dilute Acid Hydrolysis/Fractionation Kinetics of Hardwood Carbohydrates*. Ind. Eng. Chem. Res., 2000. **39**(8): p. 9.

105. Grethlein, H.E., *The effect of pore-size distribution on the rate of enzymatic-hydrolysis of cellulosic substrates*. Bio-Technology, 1985. **3**(2): p. 155-160.

106. Mora-Pale, M., et al., *Room temperature ionic liquids as emerging solvents for the pretreatment of lignocellulosic biomass*. Biotechnol Bioeng, 2011. **108**(6): p. 1229-45.

107. Vancov, T., et al., *Use of ionic liquids in converting lignocellulosic material to biofuels*. Renewable Energy, 2012. **45**: p. 1-6.

108. Camassola, M. and A.J.P. Dillon, *Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum**. Industrial Crops and Products, 2009. **29**(2-3): p. 642-647.

109. D'Souza, T.M., C.S. Meritt, and C.A. Reddy, *Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum**. Appl Environ Microbiol, 1999. **65**(12): p. 5307-5313.

110. Cohen, R., M.R. Suzuki, and K.E. Hammel, *Processive endoglucanase active in crystalline cellulose hydrolysis by the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum**. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(5): p. 2412-7.

111. Blanchette, R.A., *A review of microbial*

deterioration found in archaeological wood from different environments. International Biodeterioration & Biodegradation, 2000. **46**(3): p. 189-204.

112. Piškur, B., et al., *Influence of *Pleurotus ostreatus* inoculation on wood degradation and fungal colonization*. Bioresource Technology, 2011. **102**(22): p. 10611-10617.

113. Husaini, A., et al., *Lignocellulolytic enzymes produced by tropical white rot fungi during biopulping of *Acacia mangium* wood chips*. Journal of Biochemical Technology, 2011. **3**(2): p. 6.

114. Kamei, I., et al., *Direct ethanol production from cellulosic materials by the hypersaline-tolerant white-rot fungus *Phlebia* sp. MG-60*. Bioresource Technology, 2012. **112**(0): p. 137-142.

115. Okamoto, K., et al., *Direct ethanol production from starch, wheat bran and rice straw by the white rot fungus *Trametes hirsuta**. Enzyme and Microbial Technology, 2011. **48**(3): p. 273-277.

116. Okamoto, K., et al., *Characterization of two acidic β -glucosidases and ethanol fermentation in the brown rot fungus *Fomitopsis palustris**. Enzyme and Microbial Technology, 2011. **48**(4-5): p. 359-364.

117. Okamoto, K., et al., *Efficient xylose fermentation by the brown rot fungus *Neolentinus lepideus**. Enzyme and Microbial Technology, 2012. **50**(2): p. 96-100.

118. Rasmussen, M.L., et al., *Sequential saccharification of corn fiber and ethanol production by the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum**. Bioresource Technology, 2010. **101**(10): p. 3526-3533.

119. Shary, S., S.A. Ralph, and K.E. Hammel, *New insights into the ligninolytic capability of a wood decay ascomycete*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(20): p. 6691-6694.

120. Holmgren, M. and A. Sellstedt, *Identification of white-rot and soft-rot fungi increasing ethanol production from spent sulfite liquor in co-culture with *Saccharomyces cerevisiae**. Journal of Applied Microbiology, 2008. **105**(1): p. 134-140.

121. Olsson, L. and B. Hahn-Hägerdal, *Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production*. Enzyme and Microbial Technology, 1996. **18**(5): p. 312-331.

122. Mills, T.Y., N.R. Sandoval, and R.T. Gill, *Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli**. Biotechnology for Biofuels, 2009. **2**.

123. Mussatto, S.I. and I.C. Roberto, *Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolysates for use in fermentative processes: a review*. Bioresource Technology, 2004. **93**(1): p. 1-10.

124. Parajó, J.C., H. Domínguez, and J. Domínguez, *Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates*. Bioresource Technology, 1998. **66**(1): p. 25-40.

125. Taherzadeh, M.J., C. Niklasson, and G. Liden, *On-line control of fed-batch fermentation of dilute-acid hydrolysates*. Biotechnology and Bioengineering, 2000. **69**(3): p. 330-338.

126. Nichols, N.N., B.S. Dien, and M.A. Cotta, *Fermentation of bioenergy crops into ethanol using biological abatement for removal of inhibitors*. Bioresource Technology, 2010. **101**(19): p. 7545-7550.

127. Geddes, C.C., I.U. Nieves, and L.O. Ingram, *Advances in ethanol production*. Current Opinion in Biotechnology, 2011. **22**(3): p. 312-319.

128. Gámez, S., et al., *Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid*. Journal of Food Engineering, 2006. **74**(1): p. 78-88.

129. Geddes, C.C., et al., *Optimizing the saccharification of sugar cane bagasse using dilute phosphoric acid followed by fungal cellulases*. Bioresource Technology, 2010. **101**(6): p. 1851-1857.

130. Almeida, J., et al., *Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009. **82**(4): p. 625-638.

131. Alriksson, B., A. Cavka, and L.J. Jönsson, *Improving the fermentability of enzymatic hydrolysates of lignocellulose through chemical in-situ detoxification with reducing agents*. Bioresource Technology, 2011. **102**(2): p. 1254-1263.

132. Kim, J.-H., D.E. Block, and D.A. Mills, *Simultaneous consumption of pentose and hexose sugars: an optimal microbial phenotype for efficient fermentation of lignocellulosic biomass*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010. **88**(5): p. 1077-1085.

133. Goerke, B. and J. Stuelke, *Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients*. *Nature Reviews Microbiology*, 2008. **6**(8): p. 613-624.
134. Alkasrawi, M., et al., *Influence of strain and cultivation procedure on the performance of simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006. **38**(1-2): p. 279-286.
135. Kim, J.-H., S.P. Shoemaker, and D.A. Mills, *Relaxed control of sugar utilization in Lactobacillus brevis*. *Microbiology-Sgm*, 2009. **155**: p. 1351-1359.
136. Dien, B.S., M.A. Cotta, and T.W. Jeffries, *Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003. **63**(3): p. 258-266.
137. Shaw, A.J., et al., *Metabolic engineering of a thermophilic bacterium to produce ethanol at high yield*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008. **105**(37): p. 13769-13774.
138. Golias, H., et al., *Evaluation of a recombinant Klebsiella oxytoca strain for ethanol production from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation: comparison with native cellobiose-utilising yeast strains and performance in co-culture with thermotolerant yeast and Zymomonas mobilis*. *Journal of Biotechnology*, 2002. **96**(2): p. 155-168.
139. Yamada, R., et al., *Direct and efficient ethanol production from high-yielding rice using a Saccharomyces cerevisiae strain that express amylases*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2011. **48**(4-5): p. 393-396.
140. Zhang, M., et al., *Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic Zymomonas mobilis*. *Science*, 1995. **267**(5195): p. 240-243.
141. Olofsson, K., M. Bertilsson, and G. Liden, *A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks*. *Biotechnology for Biofuels*, 2008. **1**.
142. Drissen, R.E.T., et al., *Modelling ethanol production from cellulose: separate hydrolysis and fermentation versus simultaneous saccharification and fermentation*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2009. **27**(1): p. 27-35.
143. Gauss, W.F., S. Suzuki, and M. Tagagi, *Manufacture of alcohol from cellulosic materials using plural ferments*, in *Office USPT1976*, Bio Research Center Company Limited: USA.
144. Balat, M., H. Balat, and C. Oz, *Progress in bioethanol processing*. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2008. **34**(5): p. 551-573.
145. Chen, M.-L. and F.-S. Wang, *Optimization of a Fed-Batch Simultaneous Saccharification and Cofermentation Process from Lignocellulose to Ethanol*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2010. **49**(12): p. 5775-5785.
146. Nakamura, N., et al., *Effective xylose/cellobiose co-fermentation and ethanol production by xylose-assimilating S-cerevisiae via expression of beta-glucosidase on its cell surface*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2008. **43**(3): p. 233-236.
147. Sakamoto, T., et al., *Direct ethanol production from hemicellulosic materials of rice straw by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of hemicellulolytic enzymes on the surface of xylose-utilizing Saccharomyces cerevisiae cells*. *Journal of Biotechnology*, 2012. **158**(4): p. 203-210.
148. Hasunuma, T., et al., *A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology*. *Biore-source Technology*, 2012(0).
149. D'Amore, T., et al., *Selection and optimization of yeast suitable for ethanol production at 40°C*. *Enzyme and Microbial Technology*, 1989. **11**(7): p. 411-416.
150. Hasunuma, T. and A. Kondo, *Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains*. *Process Biochemistry*, 2012. **47**(9): p. 1287-1294.
151. Abdel-Banat, B.A., et al., *High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast?* *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010. **85**(4): p. 861-867.

As bactérias produtoras de carbapenemases tipo NDM aterrissaram no Brasil

por Vanessa Vieira

Oito casos positivos detectados no Rio Grande do Sul colocam o país em alerta para tentar conter o avanço dos germes contendo o gene NDM-1. Resistentes aos antibióticos carbapenêmicos, eles podem elevar a taxa de mortalidade a 50%

Em junho de 2010, o casal Sanjev Thakran e Lalita internou seu bebê, Tapas, de três semanas, no Mangla Children's Hospital, na cidade de Bijnor, na Índia. Os médicos acreditavam que a criança precisaria de apenas alguns dias de cuidados intensivos, sendo aquecida na incubadora e alimentada por um tubo nasal, antes de receber alta e voltar para casa. Não foi o que aconteceu. Embora estivesse sendo tratada com uma série de antibióticos, uma infecção bacteriana se alastrou pelos pulmões do bebê e pela corrente sanguínea, até atacar as membranas que cobrem o cérebro e a medula espinhal. Quando nem os carbapenêmicos – uma das mais poderosas classes de antibióticos – funcionaram, os médicos perceberam que estavam lidando com algo novo. Tapas morreu onze semanas após dar entrada no hospital. Exames laboratoriais revelariam mais tarde que a causa da infecção era a bactéria *Klebsiella pneumoniae*, um microorganismo do trato intestinal que pode causar pneumonia e infecções urinárias em pacientes hospitalares. A *K. pneumoniae* continha o gene NDM-1, que torna as bactérias ultrarresistentes a antibióticos β -lactâmicos. Tapas foi apenas uma entre 14 crianças infectadas no hospital por bactérias contendo o gene NDM-1 num prazo de 17 meses. Seis delas morreram.

Os primeiros casos documentados de infecções causadas por bactérias

com este gene de resistência ocorreram em 2008, mas análises retrospectivas de culturas mais antigas revelaram a presença do gene em amostras de enterobactérias isoladas em 2006. Desde então, essas superbactérias já foram documentadas em 40 países em todos os continentes, com exceção da América do Sul e da Antártida. Não mais. A partir deste ano, o Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH /IOC-FIOCRUZ) diagnosticou pela primeira vez no Brasil sua presença em oito pacientes atendidos em Porto Alegre. Um deles, internado em janeiro no Hospital Nossa Senhora da Conceição, na capital gaúcha, não estava colonizado, mas infectado por uma bactéria contendo o gene. “A infecção estava localizada no pé e foi realizada uma amputação. O paciente teve melhora pela extirpação do foco infeccioso”, explica o médico infectologista Diego Falci, do Controle de Infecção Hospitalar do Hospital Nossa Senhora da Conceição.

Desde então, houve o fechamento de leitos de UTI nos hospitais de onde as amostras positivas foram coletadas, para a chamada ‘limpeza terminal’. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária também emitiu uma nota técnica com orientações para a prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes. As recomendações envolvem a coleta regular de amostras pelos laboratórios hospitalares, o comu-

nicado imediato da detecção do micro-organismo multirresistente às autoridades da área da Saúde, o isolamento dos pacientes positivos e até o cumprimento rigoroso de normas básicas de prevenção de infecções, como o uso obrigatório de luvas e lavagem criteriosa das mãos. As cepas isoladas devem ser enviadas para unidades de referência, como o Instituto Oswaldo Cruz. “Os testes fenotípicos para pesquisa do gene NDM-1 são cruciais para adotar medidas de barreira para a disseminação do problema”, explica Afonso Barth, do Serviço de Patologia Clínica do Laboratório de Doenças Auto-Imunes e Infecciosas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, laboratório que tem auxiliado e agilizado a pesquisa destas bactérias no sul do Brasil. “O momento é de alerta e temos de tomar medidas rápidas para que o problema não fique fora de controle”, diz Ana Paula D’Alincourt Asséf, pesquisadora-adjunta do LAPIH / IOC-FIOCRUZ, responsável pela caracterização do primeiro relato desse gene na amostra proveniente do Rio Grande do Sul e que já analisou mais de 1 000 amostras de todo o país em busca do gene.

ERA PÓS-ANTIBIÓTICA

O termo NDM-1 é a forma reduzida de Nova Délhi-metallo-beta-lactamase1. O gene recebeu esse nome por causa de seu histórico de disseminação, que apon-

ta a Índia como origem do problema, já que os primeiros pacientes infectados por germes contendo o gene tinham um histórico de viagens àquele país. Esse gene induz a produção da enzima metalo-beta-lactamase, que contém zinco e é capaz de degradar e tornar inócua a classe de antibióticos conhecida como beta-lactâmicos. Os beta-lactâmicos incluem as penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, sendo estes últimos considerados os antibióticos mais potentes de que se dispõe atualmente.

Sem poder contar com essas drogas, as alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções bacterianas ficam limitadas à associação das chamadas polimixinas -- antibióticos que podem causar lesões ao sistema nervoso e aos rins -- com tigeciclinas ou aminoglicosídeos como gentamicina ou amikacina. Algumas publicações evidenciam taxas de mortalidade provocadas por bactérias produtoras de NDM oscilando entre 40% e 50% no prazo de 30 dias. "A NDM-1 está transformando bactérias comuns, que os antibióticos conseguiam derrotar facilmente, em assassinas incuráveis", diz Timothy Walsh, professor de Microbiologia Médica na Cardiff University, do Reino Unido.

O aumento da resistência aos antibióticos está aproximando o planeta do que a Organização Mundial de Saúde chama de 'era pós-antibiótica'. "Coisas tão comuns quanto uma dor de garganta ou o joelho ralado de uma criança poderão voltar a matar", afirmou Margaret Chan, diretora Geral da OMS, num encontro médico realizado em março em Copenhague. Procedimentos como operações nos quadris, transplantes de órgãos, tratamentos quimioterápicos e até o atendimento a bebês prematuros podem ficar muito mais difíceis ou perigosos demais para se realizar", acrescentou. Atualmente, as variedades mais conhecidas de bactérias resistentes já matam mais de 25 mil pessoas anualmente apenas na Europa.

PESTE NEGRA

O gene NDM costuma ser encontrado em enterobactérias como *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. Porém, não é exclusivo desse tipo de micro-organismo. Localizado nos plasmídeos -- moléculas de DNA extra-cromossômicas que podem ser transmitidas de bactéria a bactéria -- o gene tem alto poder de disseminação. Em teoria, ele pode ser adquirido até mesmo pela bactéria *Yersinia pestis*, causadora da peste bubônica, conhecida na Idade Média como Peste Negra, e que ainda mata em algumas regiões do planeta. "É uma questão de tempo e de acaso", diz Mark Toleman, geneticista molecular da Cardiff University.

Outra fonte de preocupação é que, embora as autoridades sanitárias ainda lidem com a NDM como um problema restrito aos hospitais, um estudo ambiental realizado em Nova Délhi em 2010 detectou a presença do gene em 51 de 171 amostras de vazamentos e poças nas ruas da capital indiana e em duas de 50 amostras de água de torneira. Ele estava presente em bactérias como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *Shigella boydii*, *Vibrio cholerae* e *Aeromonas caviae*.

As baixas condições de saneamento na Índia facilitam a colonização da população pelas bactérias produtoras de carbapenemases tipo NDM. Mais da metade dos 1,2 bilhão de habitantes do país fazem suas necessidades a céu aberto e 23% dos moradores das cidades não contam com banheiros, segundo um relatório de 2012 publicado pela OMS em parceria com a UNICEF. O esgoto não tratado espalha os micro-organismos resistentes ao contaminar a água e os alimentos com ela cultivados ou lavados.

Hoje, estima-se que 100 milhões de indianos sejam portadores de germes que contêm o gene NDM-1. Essa informação serve de alerta às autoridades brasileiras, já que o Brasil também sofre

com as más condições de saneamento. "Não é apenas uma cirurgia ou estar próximo de um hospital. Você pode contrair o problema por meio dos alimentos e da água", comenta Maurine Leverstein-van Hall, microbiologista clínica do Centro Médico Universitário de Utrecht, na Holanda, ao comentar o caso de dois pacientes holandeses infectados por bactérias portadoras do gene NDM na Índia, mesmo sem terem sido submetidos a procedimentos médicos no país. "Há um tsunami chegando nos próximos anos, quando a resistência aos antibióticos explodir", alerta Abdul Ghafur, médico infectologista em Chennai, a maior cidade do sul da Índia. "Precisamos de medidas de guerra para lidar com esse problema o quanto antes", diz. "Já perdemos a guerra contra bactérias produtoras do gene KPC, que já estão disseminadas no Brasil. Este é o momento de conter as bactérias produtoras de carbapenemases tipo NDM", diz Afonso Barth, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

REFERÊNCIAS

Alan P. Johnson; Neil Woodford. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. Journal of Medical Microbiology http://jmm.sgmjournals.org/content/62/Pt_4/499.full

Drug-Defying Germs From India Speed Post-Antibiotic Era. Bloomberg Markets Magazine, <http://www.bloomberg.com/news/2012-05-07/drug-defying-germs-from-india-speed-post-antibiotic-era.html>

Progress on Drinking Water and Sanitation, 2012 Update. OMS e UNICEF

Resistance to antibiotics could bring "the end of modern medicine as we know it", WHO claim. The Telegraph <http://www.telegraph.co.uk/health/healthnews/9147414/Resistance-to-antibiotics-could-bring-the-end-of-modern-medicine-as-we-know-it-WHO-claim.html>

Uma solução ecológica contra os danos do petróleo

por Vanessa Vieira

Micro-organismos especializados na degradação de hidrocarbonetos podem ser alternativas aos dispersantes químicos na limpeza dos vazamentos de petróleo, minimizando o impacto ambiental desses acidentes

20 de abril de 2010. Uma explosão na plataforma Deepwater Horizon, da British Petroleum, no Golfo do México, mata 11 pessoas e rompe tubulações no fundo do oceano, a 1.500 metros de profundidade. O poço de extração passa a jorrar cerca de um milhão de litros de petróleo ao dia nas águas do mar. As manchas de óleo resultantes do vazamento ocupam uma área semelhante ao território de Porto Rico, fazendo deste o maior acidente ambiental da história dos Estados Unidos. Apenas em 15 de julho daquele ano a petroleira anunciou ter conseguido, finalmente, estancar o vazamento.

A tragédia ambiental no Golfo do México deixou 30 000 mil pássaros e 115 cetáceos mortos. Mas, segundo os ambientalistas, esses números poderiam ser multiplicados por oito, já que muitas mortes continuam a acontecer. Em fevereiro de 2011, 59 golfinhos foram encontrados encalhados ou mortos nas praias do Golfo. Trinta e seis desses animais eram filhotes prematuros ou natimortos. Este número é nove vezes superior à média encontrada entre 2002 e 2009. Áreas de mangue e pântanos foram fortemente atingidos e continuam de piche já que, graças às marés, essas zonas tendem a acumular o óleo remanescente dos vazamentos.

E o que aconteceria se houvesse um vazamento nas zonas de exploração do pré-sal nas mesmas proporções ao ocorrido no Golfo do México? Esse questionamento foi feito pelo geólogo americano John Amos, durante o VII Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação, em Natal, no Rio Grande do Norte, em

setembro do ano passado. Amos é presidente da SkyTruth, uma ONG de West Virginia que usa o Google Earth para monitorar manchas de petróleo e vazamentos ao redor de plataformas petrolíferas. A ONG foi a primeira a detectar o maior acidente de petróleo do Brasil -- o vazamento da Chevron na Bacia de Campos. Durante o Congresso, ele conclamou o governo brasileiro a investir na pesquisa de novas tecnologias para limpar derramamentos de petróleo e reduzir o dano ambiental causado por esses acidentes. "A exploração não vai parar. Então, eu gostaria de ver o Brasil liderando o desenvolvimento de tecnologia para limpar o petróleo e prevenir acidentes, porque tudo indica que essa liderança não será assumida pelos Estados Unidos".

Uma resposta a esse desafio pode estar vindo de um estudo coordenado pelo Professor Alexandre S. Rosado responsável pelo Laboratório de Ecologia Molecular Microbiana, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, publicado recentemente pelo periódico especializado BMC Microbiology. O artigo investigou a diversidade bacteriana nas áreas de mangue e seu potencial para a degradação anaeróbica de hidrocarbonetos. O local escolhido para realizar a pesquisa foi o manguezal de Suruí, na Baía de Guanabara, no estado do Rio de Janeiro. No ano 2000, houve um vazamento na Baía de Guanabara que impactou fortemente essa área, com o derramamento de mais de um milhão de litros de petróleo provenientes de uma refinaria próxima.

Estudos anteriores já haviam demonstrado a eficiência da biodegrada-

ção anaeróbica de diesel. Na presença de micro-organismos redutores de nitrato, sulfato ou carbono, 99% do petróleo foram removidos em 510 dias. Para dar um passo adiante, os pesquisadores da UFRJ investigaram os perfis das comunidades microbianas nas diferentes camadas de sedimentos das áreas de mangue e a proporção de bactérias redutoras de sulfato -- as mais eficientes no processamento dos hidrocarbonetos -- em diferentes profundidades do solo. Para isso, fizeram uma varredura nesses micro-organismos em busca dos genes característicos do processamento anaeróbico do petróleo e seus derivados.

Entre os resultados encontrados, verificou-se que os primeiros 15 centímetros de sedimentos a partir da superfície são uma zona de ativa redução de sulfato nos manguezais. Mas essa proporção decai drasticamente nas faixas mais profundas. Isso poderia explicar, por exemplo, por que o petróleo que penetra as camadas mais profundas do solo de mangue permanece por anos sem ser degradado. A boa notícia, entretanto, é que a proporção de bactérias redutoras de sulfato tende a aumentar em manguezais já atingidos por vazamentos de petróleo. "Por isso, um pântano com histórico de contaminação por petróleo está mais preparado para responder a uma situação adversa como essa do que uma área virgem", afirmam os pesquisadores em seu trabalho.

Além de ajudar a compreender a capacidade de recuperação das zonas de mangue frente aos acidentes com petróleo, proporcionada pela sua população de bactérias aptas à degradação

de hidrocarbonetos, o estudo pode abrir as portas para a futura criação de soluções biotecnológicas para a limpeza do petróleo derramado nos oceanos pelos vazamentos. O uso mais intensivo dessas bactérias poderia se revelar uma alternativa para minimizar o impacto ambiental causado pelos tradicionais dispersantes químicos após os acidentes com petróleo.

REFERÊNCIAS

Estimativa do dano ambiental provocado pelo vazamento de petróleo no Golfo do México. Reportagem **Gulf's Complexity and Resilience Seen in Studies of Oil Spill**, do New York Times. http://www.nytimes.com/2011/04/12/science/12spill.html?pagewanted=all&_r=0

Andrade L. L., et al. *Microbial diversity*

and anaerobic hydrocarbon degradation potential in an oil-contaminated mangrove sediment, publicado na BMC Microbiology. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/12/186>

Comentários de John Amos, da Ong Skytruth. <http://www.oeco.org.br/multimedia/videos/26484-fundador-da-ong-americana-skytruth-em-entrevista-exclusiva-no-stand-de-oeco>

É hora de reciclar os conhecimentos

por Vanessa Vieira

Confira os destaques da programação do 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, que vai discutir as contribuições da bioinformática para a investigação dos microorganismos presentes no ambiente, nos animais e seres humanos e de como funciona a nossa interação com eles

As maiores autoridades nacionais e internacionais em Microbiologia têm compromisso na agenda entre os dias 29 de setembro e 3 de outubro deste ano. O ponto de encontro é Natal, cidade escolhida para sediar o 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Um dos grandes nomes que marcarão presença no evento é o microbiologista norte-americano Patrick Robert Murray, diretor mundial de Assuntos Científicos da BD Diagnostic Systems, que fará a abertura oficial do congresso. À frente do Centro Clínico do National Institutes of Health (NIH) até 2011, Murray comandou programas de pesquisa em genômica e introduziu diversas tecnologias inovadoras na rotina de testes diagnósticos, além de ter composto o Conselho Americano de Microbiologia Médica. Em sua participação no 27º CBM, ele falará sobre o impacto das novas metodologias na Microbiologia. O assunto está em alta desde a publicação, no ano passado, dos resultados do Projeto do Microbioma Humano, iniciativa que realizou o sequenciamento do material genético dos microorganismos que habitam o corpo humano. Um total de 60 milhões de genes foi mapeado -- um trabalho que só foi possível graças ao uso das novas tecnologias no campo da microbiologia.

Depois da abertura do congresso, Murray ainda conduzirá no dia 1º uma conferência sobre o impacto clínico do Maldi-TOF sobre a bacteriologia, já que essa técnica de análise biomolecular permite identificar e diferenciar microorganismos como fungos e bactérias de

forma mais rápida, precisa e barata do que procedimentos baseados em testes imunológicos e bioquímicos. A temática do uso de novas tecnologias no trabalho do microbiologista também estará presente nos cursos *Bioinformática para o Microbiologista: Next Generation Sequencing – Passado, Presente e Futuro*, que abordará o uso da NGS nas pesquisas em Microbiologia, e *Uma visão geral sobre análise computacional de genomas bacterianos*, ministrados no dia 29 e 30 de setembro respectivamente. No dia 2 de outubro o assunto volta à pauta numa mesa redonda sobre os novos achados acerca do funcionamento do microbioma.

Entre os palestrantes internacionais de destaque também estão Jens Frisvad, da Universidade Técnica da Dinamarca e Kenneth Stapleford, do Instituto Pasteur, de Paris. O primeiro, considerado na atualidade uma das maiores autoridades em Micologia de Alimentos, com mais de 200 trabalhos publicados e 4000 citações, ministrará um curso sobre essa temática no dia 29. O segundo falará no dia 30 sobre epidemias e potenciais vacinas contra os vírus transmissores de doenças como dengue e febre amarela.

Além de Stapleford, a Mesa Redonda 28 deve atrair as atenções no dia 30 de setembro por debater dois temas bastante populares -- o risco de infecções em transplantes e a epidemiologia e evolução da dengue. Mais tarde, na Mesa Redonda 35, pesquisadores do Instituto Adolfo Lutz debaterão o aparecimento de novos surtos de coqueluche no Brasil,

uma doença que se acreditava erradicada há 30 anos.

No dia 1º de outubro, a conferência 30 trará um debate de fundamental importância para os microbiologistas brasileiros: a necessidade de estabelecer e padronizar critérios nacionais para a identificação de bactérias resistentes. "Precisamos criar um protocolo brasileiro. Ainda recorremos aos critérios usados nos Estados Unidos e na Europa, que nem sempre são aplicáveis ao Brasil, porque a nossa casuística é outra", afirma Carla Taddei, da Sociedade Brasileira de Microbiologia. Já a conferência 29 discutirá um tema bastante em voga -- a disseminação de genes de resistência no meio-ambiente. Esse campo de pesquisa se debruça, por exemplo, sobre a possibilidade de adquirir genes resistentes a alguns tratamentos após consumir a carne de animais tratados com antibióticos. A Mesa Redonda 37, por sua vez, orientará os microbiologistas de todo o País sobre como identificar e reagir a surtos.

Outro tema de bastante repercussão e que será discutido no Congresso é a contaminação do mosquito transmissor da dengue por bactérias que encurtam seu ciclo de vida, tema da palestra do pesquisador Luciano Moreira, da Fiocruz, ainda no dia 1º. No dia seguinte, os debates em torno da biotecnologia prometem roubar a cena, já que pesquisadores acadêmicos e da Petrobras discutirão as potencialidades no uso de microorganismos para a produção de biocombustíveis durante a Mesa Redonda 20. A biotecnologia tam-

bém entra em cena, no debate sobre as políticas nacionais para a catalogação, preservação e uso sustentável da biodiversidade brasileira, assunto da palestra de Claude Pirmez, pesquisadora da Fio-cruz. Coordenadora da rede de Centros de Recursos Biológicos do Brasil, ela vai discorrer sobre a importância da consolidação dessa infraestrutura para reduzir a dependência tecnológica brasileira e o déficit da balança comercial na área de

biotecnologia.

No último dia do congresso, a grande atração devem ser as sessões interativas, durante as quais casos clínicos são apresentados à plateia, que deverá interagir informando como agiria naquela situação. As respostas corretas serão explicadas por especialistas.

Para Carla Taddei, da SBM, a maior parte das conferências e cursos do Congresso aborda temas do dia-a-dia dos

microbiologistas, atualizando-os e preparando-os para lidar com situações práticas. "Nesta edição, a grande ênfase da programação será na genética e na bioinformática, que nos permite revelar, com grande eficiência, que bactérias povoam o ambiente e qual sua interação com o ser humano", avalia a pesquisadora. Os interessados em se inscrever no 27º CBM podem obter maiores informações no site www.sbmicrobiologia.org.br.

Selo de Qualidade SBM

Confiança na qualidade do produto

Em 2009 a Sociedade Brasileira de Microbiologia implantou o Selo de Qualidade SBM, com o objetivo de promover a certificação de produtos sanitariamente adequados quanto à presença de microrganismos. Em paralelo ao Selo, foi criado o Departamento de Avaliação de Produtos pela SBM, responsável pelas análises e pesquisas dos produtos, incluindo as embalagens e informações ao consumidor.

A certificação do produto começou a ser uma exigência do mercado e os fabricantes passaram a se preocupar mais em adequar sua produção e seus produtos dentro de parâmetros qualitativos e com preços competitivos. O programa de certificação da SBM visa certificar produtos quanto a sua qualidade microbiológica e/ou sua capacidade germicida.

O processo de certificação pela SBM segue um programa internacional, cujas diretrizes emanam da Organização Mundial de Saúde.

O primeiro produto a receber o Selo de Qualidade da SBM foi o Dettol® produzido pela empresa Reckitt-Benckiser nas formas de sabonete em barra, sabonete líquido e gel anti-séptico. Este selo foi concedido após avaliação de parecer técnico-específico emitido por especialistas indicados pela SBM.



Como solicitar o Selo SBM

As empresas interessadas em encaminhar seus produtos para avaliação do programa de certificação da SBM devem:

- Enviar carta à Sociedade Brasileira de Microbiologia e solicitar que o produto, fabricado ou comercializado no Brasil seja analisado para receber o Selo de Qualidade SBM;
- Também é preciso enviar estudos já realizados sobre o produto, como análises, pesquisas e formulação, além de informações adicionais que houver;
- Caso a comissão de avaliação achar necessário, novos testes em laboratórios credenciados poderão ser solicitados.

Vigência é de 24 meses

Depois do envio deste material, o SBM firma com a empresa solicitante um protocolo de pesquisa, informando os objetivos, procedimentos e tempo de estudo. A realização dos ensaios dura entre 30 a 90 dias e todas as análises realizadas, materiais e equipamentos utilizados obedecem a normas específicas para cada produto. Sendo o produto aprovado, deverá a Empresa assinar um Contrato que rege todos os pontos do relacionamento com a SBM, passando a efetuar um pagamento mensal pela utilização da marca. Este valor mensal também é definido conforme o resultado da análise do Questionário de Perfil da Empresa.

Para tornar possível mais essa atividade da SBM, foi realizado um convênio de parceria com empresa tradicional em proficiência, a Controllab.

Para obtenção de maiores esclarecimentos entre em contato com:
sbm@sbmicrobiologia.org.br

MICROBIOLOGIA *in foco*

SBM IN FOCO - A forma direta de falar com os microbiologistas.



Apresentamos o plano de comercialização para 1 ou 4 edição (ões) da Revista Microbiologia in Foco.

Periódico da Sociedade Brasileira de Microbiologia, com tiragem de 2000 exemplares e distribuição gratuita. Revista de informação e divulgação sobre temas em bacteriologia, micologia e virologia nas várias áreas de abrangência da Microbiologia: ambiental, agrícola, básica, de alimentos, industrial, médica humana e veterinária e oral.

A revista ainda conta com espaços para divulgação de consensos, agenda científica, atualidades e oportunidades de trabalho.

Venha fazer parte deste veículo de informação atualizada!

Atenciosamente,

Marina Baquerizo Martinez e Carlos P. Taborda - Editores
Sociedade Brasileira de Microbiologia

VALORES:

Capa Final Interna	1 edição R\$ 2.000,00	4 edições – R\$ 4.000,00 cada
Capa Final Externa	1 edição R\$ 2.500,00	4 edições – R\$ 5.200,00 cada
½ página (par)	1 edição R\$ 1.000,00	4 edições – R\$ 1.600,00 cada
Página Inteira (par)	1 edição R\$ 1.850,00	4 edições – R\$ 3.600,00 cada
½ página (ímpar)	1 edição R\$ 1.350,00	4 edições – R\$ 2.400,00 cada
Página Inteira (ímpar)	1 edição R\$ 2.150,00	4 edições – R\$ 4.400,00 cada

FORMA DE PAGAMENTO: 15 dias após a edição da Revista, através de boleto bancário com recibo oficial.

página inteira

21 x 28 cm

1/2 página

18 x 12 cm

Para anunciar entre em contato com Jair Cagnotto:

E-mail: financeiro@sbmicrobiologia.org.br

Telefone: (11) 3813-9647 ou 3037-7095

SBM SOCIEDADE
BRASILEIRA DE
MICROBIOLOGIA

WWW.SBMICROBIOLOGIA.ORG.BR

AGENDA 2013

Prezados Colegas Microbiologistas

É com enorme satisfação que informamos que o 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, organizado pela Sociedade Brasileira de Microbiologia (SBM) será realizado no período de 29 de setembro a 03 de Outubro de 2013, no Centro de Convenções de Natal, na cidade de Natal, Rio Grande do Norte. Estamos trabalhando para elaborar um evento de alto nível científico e planejamos oferecer uma programação científica atrativa que abordará temas relevantes e atuais para que você se sinta estimulado a participar. Comece a se preparar para participar deste congresso que está sendo formatado pensando em oferecer, com conforto e qualidade, ciência de alto nível e a oportunidade de aproveitar tudo de bom o que a cidade de Natal e região têm a oferecer. Estamos certos de que o 27º CBM será um sucesso.



Esperamos encontrá-los para compartilhar novos conhecimentos.

Um abraço,

Adalberto Pessoa Junior

Presidente - SBM

Eventos paralelos:

II Simpósio Iberoamericano sobre Micro-organismos Fotossintetizantes

XV Simpósio Brasileiro de Micobactérias

II Simpósio de Fermentação Alcoólica

I Brazilian Microbiome Workshop and II Brazilian Microbiome Project Meeting

IV Simpósio de Coleções de Cultura

Mini-Simpósio sobre New Delhi metalo-beta-lactamase-1 (NDM-1)

Conhecimento, desenvolvimento, relacionamentos, troca de informações e experiências em Biopolímeros

Data: 28/09 - 01/10/2014
Local: Parque Balneário Hotel
www.pointcm.com.br/biopolymers

O Brasil sediará o principal evento mundial de Biopolímeros em 2014.

Realização: SBM Suporte: Microbiologia Organização: POINT

Realização
Inscrição
Carga horária

Fevereiro/2013 a Dezembro/2014
Novembro/2012 a Janeiro/2013
904h compostas por 504 h presenciais, 200h de monografia e 200h de estudo dirigido.

Especialização em Microbiologia Clínica

Propósito principal diagnóstico laboratorial das doenças infecciosas.

Público alvo

graduados da área de saúde, biologia e profissionais atuantes em microbiologia médica.

Especialização em Microbiologia Ambiental / Industrial

Propósito principal utilização de microrganismos para geração de produtos de interesse comercial.

Público alvo

microbiologistas atuantes na área ambiental/industrial

Especialização em Microbiologia de Alimentos

Propósito principal origem e estabelecimento da microbiota de alimentos cárneos, lácteos e vegetais.

Público alvo

graduados da área da saúde, em biologia, veterinária, engenheiros de alimentos e microbiologistas atuantes na área de alimentos.

Local e Data

Quinzenalmente às sextas-feiras (19-23h)
e aos sábados (9-18h)
Universidade São Paulo – Campus Butantã

Informações

Coordenação Pedagógica da SBM
cursos@sbmicrobiologia.org.br
+55 11 3037-7095
www.sbmicrobiologia.org.br – link “cursos”

Realização
Inscrição
Carga horária

Fevereiro/2013 a Dezembro/2013
Novembro/2012 a Janeiro/2013
252h presenciais + 200h de estudo dirigido

Aperfeiçoamento em Microbiologia Clínica

Propósito principal diagnóstico laboratorial das doenças infecciosas.

Público alvo

graduados da área de saúde, biologia e profissionais atuantes em microbiologia médica.

Aperfeiçoamento em Microbiologia Ambiental / Industrial

Propósito principal utilização de microrganismos para geração de produtos de interesse comercial.

Público alvo

microbiologistas atuantes na área ambiental/industrial

Aperfeiçoamento em Microbiologia de Alimentos

Propósito principal origem e estabelecimento da microbiota de alimentos cárneos, lácteos e vegetais.

Público alvo

graduados da área da saúde, em biologia, veterinária, engenheiros de alimentos e microbiologistas atuantes na área de alimentos.

Local e Data

Quinzenalmente às sextas-feiras (19-23h)
e aos sábados (9-18h)
Universidade São Paulo – Campus Butantã

Informações

Coordenação Pedagógica da SBM
cursos@sbmicrobiologia.org.br
+55 11 3037-7095
www.sbmicrobiologia.org.br – link “cursos”

Os sócios da SBM têm direito a descontos especiais nos eventos promovidos ou patrocinados pela SBM. Para usufruir do desconto de associado em nossas atividades é imprescindível estar anuente a dois anos consecutivos com a sociedade. Além disso, têm acesso livre à revista científica *Brazilian Journal of Microbiology* (BJM) e que se destina à publicação de trabalhos de pesquisa originais, notas breves e revisões, envolvendo todos os aspectos da Microbiologia. É considerada uma das revistas científicas mais importantes do nosso país. O BJM tem uma política muito severa de avaliação dos trabalhos submetidos à publicação, sendo cada manuscrito avaliado por pelo menos dois revisores criteriosamente selecionados.

A revista *Microbiologia in Foco* tem o objetivo de promover o intercâmbio de informações científicas entre os associados, publicando os autores nacionais de expressão. Adota o mesmo critério de avaliação e excelência que a SBM sempre adotou. Enviaremos o último número da *Microbiologia in Foco* a todos os novos associados, após sua efetiva associação.

Fique sócio da SBM.

Veja informações no site: www.sbmicrobiologia.org.br

Lembre-se: um sócio da SBM integra a maior e mais representativa associação da comunidade científica que atua na microbiologia nacional.

Valores para associação

Categoria de Sócio	Anuidade 2013
Aluno de Graduação	R\$ 85,00
Aluno de Pós-Graduação (Mestrado e Doutorado)	R\$ 135,00
Pós-Doutorando	R\$ 165,00
Profissional	R\$ 195,00
Assinatura Jurídica	R\$ 355,00

Diretoria

Biênio 2012-2013

SBM 2012-2013

Presidente

Adalberto Pessoa Junior, USP-SP

Vice Presidente

Alexandre Soares Rosado, UFRJ-RJ

1º Secretário

Carla Taddei de Castro Neves, USP-SP

2º Secretário

Lauro Santos Filho, UFPB-PB

1º Tesoureiro

Carlos Pelleschi Taborda, USP-SP

2º Tesoureiro

Maria Cristina Dantas Vanetti, UFV-MG

Conselho Fiscal

Bernadette D.G.M. Franco, USP-SP

Sergio E. L. Fracalanza, UFRJ-RJ

Agnes Marie Sá Figueiredo, UFRJ-RJ

Representantes de Área

SBM 2012-2013

Coleções de Culturas

Manuela da Silva, Fiocruz/RJ

Carlos Augusto Rosa – UFMG/MG

Ensino

Karla Tereza Silva Ribeiro – UFPA/PA

Marcela Pelegrine Peçanha – PUC/SP; UNISO

Infecções Hospitalar

Ana Lúcia Darini – USP/RP

Afonso Luis Barth – UFRGS/RS

Microbiologia de Alimentos

Bernadete G. Franco – USP/SP

Ricardo Souza Dias – FUNED/MG/Metodista de Minas

Microbiologia Ambiental

Vivian Pelizari – USP/SP

Raquel Peixoto – UFRJ/RJ

Microbiologia Clínica

Elizabeth de Andrade Marques – UERJ/RJ

Marina Baquerizo Martinez – FCF/USP

Microbiologia Industrial

Luiz Henrique Guimarães – USP/Ribeirão Preto

Eleni Gomes – UNESP/Rio Preto

Microbiologia Médica

Leila Carvalho Campos – Fiocruz/BA

Tânia Aparecida Tardelli Gomes do Amaral – UNIFESP/SP

Micologia

Célia Maria de Almeida Soares – UFG/GO

Marcio Rodrigues – UFRJ/RJ

Micotoxinas

Marta Taniwaki – ITAL/SP

Adriana de Almeida Palma – ITAL/SP

Parasito-Hospedeiro

Sandro R. de Almeida – USP/SP

Dario Simões Zamboni – USP/RP

Microbiologia do Solo

Itamar Soares de Melo – Embrapa/SP

Vânia Maria Maciel Melo – UFC/CE

Microbiologia Veterinária

Rinaldo Aparecido Mota – UFRPE/PE

Odir Antônio Dellagostin – UFPEL/RS

Virologia

Flávio Guimarães da Fonseca – UFMG/MG

Luciana Barros de Arruda – UFRJ/RJ

Genética de Microorganismos e Bioinformática

Artur Silva – UFPA/PA

Gustavo Goldman – USP/SP

