

O MUNDO INVISÍVEL E
DESCONHECIDO DA FLORESTA AMAZÔNICA
REINO FUNGI

Sandra Zanotto
Maria Dolores Fonseca
João Lúcio Azevedo

A floresta amazônica constitui a maior região de floresta tropical do planeta, sendo que 3,7 milhões de quilômetros quadrados de sua extensão estão localizados em território brasileiro. Apresenta uma magnitude única em todos os aspectos, incluindo a maior bacia hidrográfica e a região de maior biodiversidade. Por consequência, o Brasil classifica-se como o primeiro país em plantas, peixes de água doce e mamíferos, o segundo em anfíbios e vertebrados (excluindo os peixes) e o terceiro em aves.¹ Entretanto, os mesmos relatórios que divulgam tais estatísticas, fazem poucas referências à diversidade microbiana – fungos, bactérias e outros seres microscópicos – tanto no que diz respeito ao planeta como um todo, quanto em relação à Amazônia. E ao levar em consideração a rapidez das alterações ambientais neste bioma, em particular, constata-se a urgência de se realizar inventários de sua microbiota para dar conta da diversidade de espécies fúngicas. É obrigação estratégica do governo brasileiro promover um levantamento sistêmico de dados de modo a retratar um bem cultural, visando o conhecimento, a exploração e a proteção do acervo de uma região que requer sobretudo um estudo de habitats.

O reino Fungi

¹ MITTERMEIER, R. A.; GIL, P. R. & MITTERMEIER, C. G. *Megadiversity: Earth's Biologically Wealthiest Nations*. México: CEMEX, Agrupación Sierra Madre, 1997. BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. *Relatório Nacional para a Convenção sobre a Diversidade Biológica*. Brasília: COBIO, 1998.

² BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98(3):426-438, 2001.

³ HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycological Research*, 95:641-655, 1991.

HAWKSWORTH, D. L. Fungi: negated component of biodiversity crucial to ecosystem function and maintenance. *Canadian Biodiversity*, 1:4-10, 1992.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105:1.422-1.432, 2001.

⁴ BLACKWELL, M. *Op. cit.*

⁵ BLACKWELL, M. *Op. cit.*

Considerando os microrganismos como um todo, o reino Fungi é o que possui o maior número de espécies conhecidas. Entretanto, de cerca de 100 mil espécies catalogadas, as provenientes da floresta amazônica são praticamente nulas.² Consta-se o universo reduzido de espécies conhecidas quando comparado com as estimativas apresentadas por Hawksworth³ de que o número total de espécies de fungos poderia ser de 1 milhão e meio, e sobretudo com avaliações mais recentes, sugerindo que existam 5.1 milhões de espécies de fungos no planeta⁴. Fatores tais como dificuldades inerentes ao isolamento, espécies não cultiváveis e falhas na aplicação de métodos de identificação por biologia molecular, podem ter contribuído para o baixo número de espécies identificadas.⁵

Os fungos podem ser encontrados em quase todos os ambientes e são conhecidos por colonizar e sobreviver em habitats diversificados: no solo, na água, no ar, em materiais em decomposição, em todos os organismos vivos, em baixas ou elevadas temperaturas e pressões atmosféricas. Ou seja, são onipresentes e cosmopolitas na sua distribuição: ocorrem dos trópicos aos polos, do alto de uma montanha ao fundo de um oceano. A localização geográfica, condições climáticas, micro-habitat, tipos de substratos, distribuição da fauna e da flora são fatores importantes que contribuem para a distribuição dos fungos ao redor do planeta. Estes aspectos sugerem que a floresta amazônica, com sua megadiversidade e suas áreas de endemismos, pode apresentar uma extraordinária diversidade fúngica inexplorada.

Os microrganismos constituem elemento crucial e essencial no suporte dos ciclos da vida e, nesse contexto, os fungos desempenham um papel importante em diversos processos que ocorrem nos ecossistemas, tais como, ciclagem de nutrientes, degradação e interações com o hospedeiro. Tais aspectos podem estar diretamente ligados a um dos paradoxos da floresta amazônica: como um dos sistemas mais produtivos do planeta cresce sobre um dos solos mais pobres?

Portanto, o mundo contemporâneo perde com as lacunas existentes no conhecimento da diversidade fúngica amazônica. É incalculável o valor agregado a cada novo fungo isolado, identificado e investigado quanto a seu potencial como nova fonte de produtos naturais para utilização na medicina, agricultura e indústria ou mesmo na regulação dos ecossistemas.

Metabólitos fúngicos

Apenas após Louis Pasteur descobrir que a fermentação é causada por células vivas, foi que as pessoas começaram a investigar seriamente os microrganismos como uma fonte para produtos naturais bioativos. Alexander Fleming, em 1928, inaugurou a era dos antibióticos pela descoberta da penicilina isolada do fungo *Penicillium notatum*. Desde então, os pesquisadores se engajam na descoberta e aplicação de metabólitos microbianos com atividade contra patógenos de plantas e humanos.

Mais de 20.000 metabólitos bioativos de origem microbiana eram conhecidos até o final de 2002⁶ e este número vem aumentando constantemente à medida que são realizados novos estudos com microrganismos, especialmente com fungos⁷.

Historicamente os microrganismos são a fonte da maioria dos antibióticos em uso na atualidade.⁸ Entre estes, 45% são produzidos por actinomicetos, 38% por fungos e 17% por outras bactérias, além dos actinomicetos. Os fungos estão entre os mais importantes grupos de organismos eucarióticos que estão sendo explorados na busca de metabólitos com aplicações clínicas. Mais de 8.600 compostos biologicamente ativos são provenientes de fungos, com vários usos. Entretanto, somente certos gêneros, tais como *Aspergillus* e *Penicillium*, têm sido rigorosamente estudados quanto à produção de compostos bioativos.⁹

Em alguns casos, os fungos associados a plantas e que vivem no interior de tecidos e órgãos vegetais sem produzir dano aos seus hospedeiros, designados de fungos endofíticos, são capazes de produzir o mesmo composto bioativo que a planta hospedeira produz. Por exemplo, o taxol (paclitaxel), uma das primeiras drogas anticâncer no mundo cujo valor é estimado em bilhões de dólares, era inicialmente extraído da casca de uma árvore (*Taxus brevifolia*). Atualmente, já é possível visualizar a sua produção por fungos endofíticos associados a *T. brevifolia*. A descoberta do fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, isolado de seu hospedeiro vegetal, demonstrou ser ele também produtor de taxol, bem como outros fungos isolados em anos subsequentes. Isto permitirá com que a planta hospedeira de ciclo vital longo possa ser preservada, por consequência o anticancerígeno será produzido mais facilmente por fermentação do fungo endofítico.¹⁰

Sendo incontestável que a região amazônica detenha uma das maiores diversidades microbiana do planeta, essa

⁶ BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites: a personal view. *The Journal of Antibiotics*, 58:1-26, 2005.

⁷ VERMA, V. C.; KHARWAR, R. N. & STROBEL, G. A. *Chemical and functional diversity of natural products from plant associated endophytic fungi*. Natural Products por fungos entomopatogênicos no Amazonas. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.

⁸ DEMAINE A. L. & SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J. Antibiot.*, 62:5-16, 2009.

⁹ BÉRDY, J. *Op. cit.*

¹⁰ STROBEL, G. & DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v. 67, n. 4. p. 491-502, 2003. STIERLE, A.; STROBEL, G. & STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 9 April: 260 (5.105), 214-216, 1993. STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; FORD, E.; SIDHU, R. S. & YANG, X. Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. *Journal of Industrial Microbiology*, 17: 417-423, 1996.

enorme variabilidade genética ganha um valor agregado incomensurável quando apropriadamente organizada, classificada, documentada e disponível para acesso sempre que houver demanda, seja ela para pesquisa ou aplicações tecnológicas. Portanto, as coleções biológicas podem ser consideradas recursos estratégicos para o Brasil, onde podem fazer parte da base para inovação biotecnológica do país.

Coleções de microrganismos na Amazônia

Na Amazônia, diversas coleções de microrganismos estão sendo mantidas por instituições públicas de ensino e pesquisa. Muito recentemente, algumas iniciativas de estímulo às coleções pelos órgãos de fomento federais deram novas perspectivas aos profissionais da área. No entanto, ainda há um déficit enorme na formação de recursos humanos para desenvolver o estudo e a manutenção da diversidade da microbiota. Um dos gargalos está na formação de taxonomistas.

Na cidade de Manaus, Estado do Amazonas, existem quatro coleções como fiel depositária de amostras do patrimônio genético, cujas particularidades são descritas a seguir.

Segundo as informações disponibilizadas pela curadora Dr^a Maria Francisca S. Teixeira e a MSc. Taciana de Amorim Silva, a Coleção de Microrganismos da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) foi reestruturada e inaugurada com a denominação de “Coleção de Culturas DPUA”, em 1988, data em que foi publicado o primeiro Catálogo de Culturas. Credenciada em 2005 como fiel depositária, está filiada ao World Data Centre for Microorganisms (WDCM) e integra a RENNEBRA (Rede de Coleções de Culturas de Microrganismos do Norte e Nordeste do Brasil). Até o momento foram preservadas 1.719 culturas de fungos, incluindo representantes do Filo Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota e Fungos anamorfos, totalizando 90 gêneros e 300 espécies.

A Coleção de Culturas DPUA tem como finalidade preservar fungos da Amazônia, principalmente os produtores de substâncias para aplicação na indústria de alimentos, farmacêutica, limpeza de efluentes e os de interesse médico, além de contribuir com a formação de recursos humanos em nível técnico-científico. Nos últimos 10 anos, 1.422 acessos às culturas da coleção foram realizados com finalidade de pesquisa envolvendo estudantes do ensino médio, graduação, mestrado e doutorado. A UFAM mantém ainda, desde 1992, uma coleção de culturas de trabalho, especialmente de microrganismos endolíticos isolados de hospedei-

ros tropicais, entre eles, plantas agrícolas como citros, cupuaçu, guaranazeiro, mandioca, pupunha; e plantas medicinais como copaíba, cumarú, plantas tóxicas e aquáticas. Atualmente a coleção funciona como suporte a pesquisas visando formação de recursos humanos na Amazônia, por meio de trabalhos de dissertações e teses nos programas de pós-graduação em Biotecnologia, Genética e Ciências Agrárias da mesma universidade. A coleção apresenta potencial biotecnológico na obtenção de bactérias e fungos produtores de enzimas e fármacos para controle biológico e na seleção de novos vetores para uso na tecnologia do DNA recombinante. Esta coleção contém cerca de 2.000 microrganismos endofíticos, principalmente fungos filamentosos, e encontra-se distribuída em vários laboratórios, como os de Fungos Endofíticos (Responsável, Dr. José Odair Pereira) e de Biologia Molecular (Responsável, Dr. Spartaco Astolfi Filho). Vários trabalhos de pesquisa e teses foram realizados com fungos mantidos nesses laboratórios, trabalhos que envolveram a produção de enzimas amilolíticas¹¹, de substâncias antimicrobianas¹² e de controle biológico¹³, entre outros produtos de interesse biotecnológico.

O Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA), inaugurado em 2001 e com suas atividades iniciadas em 2005, possui uma Coleção de Culturas de Microrganismos mantida e ampliada desde então. Segundo o Curador, Dr. Rudi E. de Lima Procópio, cerca de uma centena de fungos endofíticos isolados de plantas amazônicas estão identificados por microscopia e técnicas moleculares. São preservados ainda em torno de 1.000 fungos provenientes de solos e plantas (endofíticos) e 500 bactérias de solo, todos isolados de biomas amazônicos. O principal interesse da coleção está na área de novos antibióticos e antitumorais. Uma dissertação de mestrado e outra de doutorado já foram realizadas a partir do acesso a esta coleção.

A Coleção Biológica do Instituto Leônidas e Maria Deane (CBILMD) – FIOCRUZ/Amazônia foi criada em 2002, com a finalidade de preservar, armazenar e informar sobre o uso dos recursos biológicos, genéticos e tecnológicos da biodiversidade amazônica à comunidade técnico-científica. Em 2003, a CBILMD inseriu-se ao Sistema de Informação de Coleções de Interesse Biotecnológico (SICOL) do Ministério da Ciência e Tecnologia, além de estar filiada à World Federation for Culture Collection (WFCC). Segundo a curadora Dra. Ormezinda C. C. Fernandes e a MSc. Luciete A. Silva, a CBILMD conta atualmente com um acervo de aproximadamente 1.455 microrganismos, divididos

¹¹ RONDON, A. C. F. *Atividade amilolítica de fungos endofíticos isolados de Manihot esculenta Crantz*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2003. 98 p.

¹² SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. M. & PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Paulliregia longiflora* (aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Benth. *Acta Amazonica*, 34:185-199, 2004.

¹³ OLIVEIRA, G. F. S. *Controle biológico de Nasutitermes corniger (Isoptera:Termitidae) por fungos entomopatogênicos na Amazônia*. Tese Doutorado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2011. 96 p.

entre bactérias, leveduras e fungos filamentosos, isolados da região amazônica. Hoje existem 834 culturas de fungos filamentosos isolados, sendo que algumas linhagens estão parcialmente caracterizadas quanto à ação antibiótica e à produção de enzimas, como as amilases, proteases, celulasas, pectinases e fenoloxidasas, que podem ter aplicação nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. Os gêneros de fungos de maior ocorrência na coleção são: *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Gliocladium* e *Trichoderma*. Todas estas culturas estão identificadas quanto ao gênero e/ou espécie e foram isoladas dos mais diversos substratos da região amazônica, tais como solo, água, plantas, frutos e ar. As amostras bacterianas são provenientes de amostras clínicas (orofaringe e fezes humanas) e do meio ambiente (água dos rios e igarapés, vegetais e da microbiota bucal de animais).

Segundo informações cedidas pelos curadores, Dra. Maria Aparecida de Jesus, Dra. Maricleide de Farias Naifa e Dr. Rogerio E. Hanada, o acervo microbiano do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) está alocado em duas coleções de acordo com as áreas afins: Coleção de Culturas de Microrganismos de Interesse Médico e Coleção de Culturas de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural. Ambas envolvem o isolamento e o armazenamento, identificação e guarda dos microrganismos patogênicos, seja para o homem, seja para as plantas, ou de interesse agroflorestal.

O Programa de Coleções e Acervos Científicos do INPA foi estabelecido em 1994, visando integrar e coordenar as iniciativas e atividades de manutenção, gerenciamento, desenvolvimento e modernização dos acervos científicos do Instituto. Entre os objetivos do Programa, além da manutenção básica das coleções, está o gerenciamento e a disseminação dos dados e informações associados aos espécimes. A coleção de microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do INPA foi criada em 1977, com representantes de *Rhizobia*. Em 1981, isolados de fungos xilófagos passaram a integrar o acervo, com acesso a espécies de fungos de madeira (lignocelulolíticos). Atualmente, mantém-se uma coleção única de fungos lignocelulolíticos, incluindo espécies comestíveis. A maioria das espécies fúngicas armazenadas contém informações referentes à durabilidade de mais 70 espécies de madeira. São cerca de 3.500 registros, sendo 1.830 culturas de fungos (xilófagos e fitopatógenos) e 1.680 culturas de bactérias (fitopatógenas e de solo). Por sua vez, a coleção de microrganismos de interesse médico foi criada por volta de 1970 e compõe-se de 3.858 culturas

de fungos, tanto filamentosos como leveduriformes, sendo que 2.307 estão caracterizadas. Destes, 1.605 são patógenos; o criobanco de parasitos leishmânias contém um acervo de mais de 3.000 ampolas, com cepas desses patógenos. Os microrganismos do acervo foram isolados do homem, do meio ambiente ou de alimentos, mas o maior número é proveniente de processos patológicos que envolvem o homem que reside na Amazônia. Outra coleção que se destaca na área médica são as micobactérias, na qual se encontram depositadas 2.100 cepas, isoladas de humanos e animais. O acervo inclui também culturas “tipo” de centros de referência como o American Type Culture Collection (ATCC).

No ano de 2010, foram lançadas uma versão *online* da Lista de Espécies da Flora do Brasil e a publicação do Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil. Deu-se início, então, a uma nova etapa deste importante trabalho, com um sistema dinâmico e atualizado em tempo real, com novas informações de especialistas sobre as espécies da flora brasileira. Neste sistema ainda se enquadram os fungos, considerados antes de serem um reino, como parte da flora e associados a plantas. Na Lista de Espécies da Flora do Brasil de 2012 são reconhecidos 4.422 fungos, dos quais 413 espécies provêm do estado do Amazonas.

A importância dos fungos amazônicos

Embora coleções de culturas já existam na Amazônia, são ainda restritas a uma pequena fração da enorme biodiversidade presente na região. Devido a sua potencial importância, não apenas acadêmica, mas principalmente econômica e social, nota-se grande interesse de grupos do exterior por nossa diversidade microbiana, que, de acordo com a legislação brasileira, poderá ser seguramente explorada de modo ordenado também por esses grupos.

Entretanto, é incontestável e estratégica para o país a soberania do conhecimento sobre nossa diversidade microbiana, já que produtos biotecnológicos poderão ser desenvolvidos a partir desta diversidade, tais como antibióticos, antimaláricos, antitumorais, enzimas, hormônios, fixadores de nitrogênio, solubilizadores de fosfato, cosméticos, pigmentos, produtos de controle biológico de insetos e fitopatógenos. Dessa forma, a indução de ações voltadas para consolidar o estudo e a aplicação da microbiota amazônica é fundamental. Com a possibilidade de utilização biotecnológica dos microrganismos acessados é inquestionável a importância do fortalecimento de áreas estratégicas do conhecimento, entre elas, a biologia molecular, taxonomia, evolução, microbiolo-

gia, genética e biotecnologia. Uma rede abrangendo várias coleções pode servir para que novos produtos e processos derivados de microrganismos, principalmente fungos, tão numerosos e ainda pouco explorados em ambientes tropicais, sejam utilizados por laboratórios de pesquisa em universidades e empresas públicas e privadas, gerando divisas, patentes e contribuindo para uma interação entre instituições públicas e privadas.

Desafios a serem superados

Conservação de modo racional e profissional das diferentes coleções

A conservação é feita principalmente como material para pesquisa acadêmica, envolvendo pós-graduados de mestrado e doutorado. Com o término dos trabalhos de dissertação e tese, muitas vezes a coleção específica que serviu para o desenvolvimento destes trabalhos científicos continua sendo mantida, porém com perdas constantes de isolados, sobretudo pela falta de estrutura das coleções. Portanto, justifica-se a racionalização da manutenção, inclusive visando intercâmbio de culturas e de ideias do qual resultarão pesquisas conjuntas e também processos e produtos de valor aplicado.

Intercâmbio de culturas e de profissionais da área

Com frequência, os laboratórios necessitam requisitar material de coleções. Não havendo uma troca sistematizada de informações, as buscas ocorrem até no exterior, levando a casos de aquisição de material aqui existente em laboratórios de fora do país. Com uma rede de coleções e um suporte na integração e informatização dos dados haverá economia de tempo e de recursos financeiros, além de facilidade de intercâmbio de pessoal técnico qualificado. A efetiva integração de grupos atuantes em pesquisas com microrganismos servirá para que facilidades encontradas em um laboratório possam ser disponibilizadas a outros.

Formação de recursos humanos

Como consequência da pouca integração entre grupos, principalmente de diferentes regiões, há problemas na formação e distribuição de recursos humanos especializados em acessar e preservar a microbiota. Os grupos que desenvolvem trabalhos avançados nesta área deverão atuar como polos de formação de pessoal para outros laboratórios, auxiliando na implantação e no desenvolvimento de tão importante área de pesquisa em regiões carentes de recursos humanos especializados como a Amazônia.

Sandra Patricia Zanotto é graduada em Química, doutora em Química Orgânica e coordenadora geral de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade de Nilton Lins, Manaus, Amazonas.

sandrazanotto@yahoo.com.br

Dolores Fonseca é graduada em Engenharia Florestal, mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia e doutoranda em Diversidade e Biotecnologia – Rede Bionorte da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

dolores_pinheiro@yahoo.com.br

João Lúcio de Azevedo é graduado em Engenharia Agrônômica, doutor em Genética e professor titular senior da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), Piracicaba, São Paulo.

jlazevedo@usp.br