



Bioprospecção de Fungos de um Fragmento de Cerrado no Brasil Central para Aplicações Biotecnológicas

Lucas Leonardo da Silva ¹
Izabel Cristina Moreira ²
Thâmara Machado e Silva ³
Larissa Batista da Silva ⁴
Thales Antony Assis Santos ⁵
Leticia Mikaelly de Oliveira ⁶
Denes Ferraz de Souza ⁷
Andressa de Oliveira Brito ⁸
Solange Xavier dos Santos ⁹

RESUMO

Considerando a importância dos estudos de bioprospecção de espécies de ambientes ameaçados, de grande riqueza biológica e endemismo, esse trabalho visou investigar o potencial biotecnológico de espécies fúngicas de diferentes habitats de um fragmento de Cerrado. Os fungos foram isolados em cultura, algumas das quais selecionadas para a prospecção de enzimas de interesse industrial, atividade antimicrobiana e toxicidade preliminar. Foi detectada atividade de carboximetilcelulase e peroxidase em todos os isolados avaliados. Nos testes para atividade antimicrobiana, os metabólitos fúngicos não mostraram inibição do crescimento para as cepas bacterianas analisadas, da mesma forma que nos ensaios de toxicidade, esses metabólitos se mostraram inócuos para larvas de *Artemia salina*. Ainda que a avaliação da toxicidade requeira ensaios complementares, esses resultados estimulam a continuidade dos estudos para a bioprospecção do potencial biotecnológico destes fungos, apontando-

¹ Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde pela Universidade Estadual de Goiás, UEG, Brasil. lucasleo.bio@gmail.com

² Mestrado em andamento em Recursos Naturais do Cerrado (Renac) pela Universidade Estadual de Goiás, UEG, Brasil. izacristina26@yahoo.com.br

³ Doutorado em andamento em Ciências Ambientais pela Universidade Estadual de Goiás, UEG, Brasil. thamaramachado.silva@gmail.com

⁴ Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde pela Universidade Estadual de Goiás, UEG, Brasil. silvalariissals@gmail.com

⁵ Mestrado em Recursos Naturais do Cerrado (Renac) pela Universidade Estadual de Goiás, UEG, Brasil. antonythales@hotmail.com

⁶ Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde pela Universidade Estadual de Goiás, UEG, Brasil. leticiamikaelly28@hotmail.com

⁷ Doutorado em andamento em Recursos Naturais do Cerrado pela Universidade Estadual de Goiás, UEG, Brasil. denes.bio@hotmail.com

⁸ Mestrado em andamento em Recursos Naturais do Cerrado (Renac) pela Universidade Estadual de Goiás, UEG, Brasil. andressa.brito@hotmail.com

⁹ Doutorado em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada) pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil. Docente na Universidade Estadual de Goiás, UEG, Brasil. solxav@yahoo.com.br

Lucas Leonardo da Silva; Izabel Cristina Moreira; Thâmara Machado e Silva;
Larissa Batista da Silva; Thales Antony Assis Santos; Letícia Mikaelly de Oliveira;
Denes Ferraz de Souza; Andressa de Oliveira Brito; Solange Xavier dos Santos

os como candidatos promissores para serem empregados em processos de aplicação direta ao homem ou ao meio ambiente.

Palavras-Chave: Basidiomicetos; Ascomicetos; Enzimas Ligninocelulolíticas; Toxicidade.

A diversidade fúngica é atualmente estimada em 3,8 milhões de espécies, as quais apresentam ampla distribuição mundial, ocupando uma gama muito diversa de substratos, onde podem viver como saprobiontes, parasitas ou simbioses (Hawksworth 2001; Hawksworth & Lücking 2017). Os fungos desempenham diversos papéis ecossistêmicos, tais como na ciclagem de nutrientes, no controle populacional de algumas espécies, na degradação da madeira e de substâncias tóxicas no solo (Abreu et al. 2015). Devido a essa capacidade, muitas espécies fúngicas vêm sendo estudadas quanto ao seu potencial biotecnológico (Namhyun et al. 2000).

Muitos fungos são potenciais fontes de produtos naturais, uma vez que muitos dos seus metabólitos têm mostrado aplicação industrial; como é o caso das enzimas, antibióticos, vitaminas, aminoácidos, esteroides, entre outros (Braga et al. 1999). As enzimas são utilizadas, principalmente, na degradação de compostos orgânicos, na indústria têxtil, alimentícia, na formulação de detergentes, no tratamento de couro e pele (Nielsen & Oxenboll 1998). Entre essas enzimas, aquelas que tem recebido maior destaque nas pesquisas são as celulasas (Silva et al. 2015), proteases, amilases, fenoloxidasas (Souza et al. 2008), lacases, peroxidases (Motato-Vásquez et al. 2016), pectinases (Xavier-Santos et al. 2004) e lignases (Santos et al. 2011). No entanto, o uso dos fungos e seus metabólitos em aplicações biotecnológicas, requer cuidado, pois, algumas espécies produzem substâncias tóxicas, conhecidas como micotoxinas, que embora sejam importantes para a sobrevivência dos fungos e, em alguns casos, até mesmo para o interesse biotecnológico, elas podem oferecer grande risco ao homem e ao ambiente, muitas vezes inviabilizando ou limitando a aplicação dos fungos e seus produtos (Perrone et al. 2007; Pereyra et al. 2010).

O Brasil é um país de grande diversidade biológica e de paisagens. Entre essas paisagens está o Cerrado que ocupa grande extensão do território nacional, sendo considerado a mais rica savana

Lucas Leonardo da Silva; Izabel Cristina Moreira; Thâmara Machado e Silva;
Larissa Batista da Silva; Thales Antony Assis Santos; Leticia Mikaelly de Oliveira;
Denes Ferraz de Souza; Andressa de Oliveira Brito; Solange Xavier dos Santos

tropical do mundo. Este bioma abriga aproximadamente 33% da biodiversidade brasileira, porém a intensa exploração dos produtos nativos, a expansão da atividade agropecuária e as queimadas têm contribuído para redução dessa diversidade ao longo do tempo (Aguiar et al. 2004; Klink & Machado 2005).

Apesar da rica biodiversidade e das ameaças que recaem sobre o bioma, há pouca informação acerca da diversidade fúngica, bem como poucos estudos de prospecção de bioprodutos produzidos por fungos do Cerrado (Felfili & Felfili 2001; Rocha 2012). A maioria dos trabalhos que abordam os fungos desse bioma é focada nos aspectos taxonômicos (Dianese et al. 2011; Abrahão et al. 2012; Costa-Rezende et al. 2016). Concomitantemente, os estudos envolvendo a prospecção de enzimas, em geral, se utilizam de fungos anamórficos ou associados a espécies vegetais, especialmente fungos endofíticos (Chapla et al. 2013; Lopes 2013; Pereira 2013). Pereira (2016) ressalta a importância de se explorar a diversidade do bioma, com a possibilidade de caracterização de novas espécies e bioprodutos, devido principalmente ao seu alto nível de endemismo. Nesse contexto, esse trabalho visou investigar as potencialidades quanto à produção de enzimas de interesse biotecnológico e de compostos bioativos, de espécies fúngicas de diferentes habitats e nichos, provenientes de um fragmento de Cerrado do Brasil Central.

MATERIAIS E MÉTODOS

A ÁREA AMOSTRADA

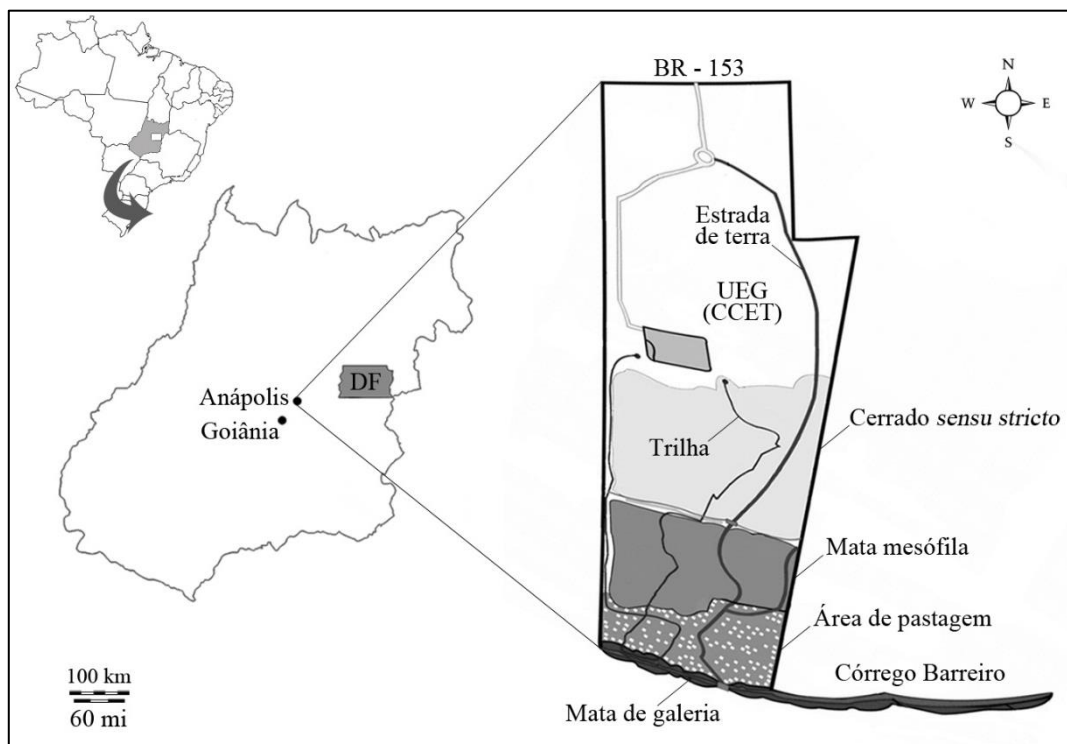
A área de estudo constitui um fragmento de Cerrado caracterizado pelas fitofisionomias cerrado *stricto sensu*, mata mesófila e mata de galeria. Conhecida como Trilha do Tatu, a área é considerada uma reserva ambiental (não oficializada) e conta com aproximadamente 15 hectares dentro das dependências do Câmpus de Ciências Exatas e Tecnológicas (CCET) da Universidade Estadual de Goiás (UEG), no município de Anápolis, Goiás, entre os paralelos 16°23'40"S e 37°57'32"W (Barreto & Angelini 2003) (Figura 01).

COLETA E ISOLAMENTO DOS FUNGOS EM CULTURA

A área foi explorada de forma aleatória em suas diferentes fitofisionomias para o reconhecimento e coleta dos fungos presentes. Diferentes substratos foram inspecionados quanto à presença desses organismos, entre os quais, madeira e folhas vivas ou em decomposição, cadáveres de inseto e solo.

Lucas Leonardo da Silva; Izabel Cristina Moreira; Thâmara Machado e Silva; Larissa Batista da Silva; Thales Antony Assis Santos; Leticia Mikaelly de Oliveira; Denes Ferraz de Souza; Andressa de Oliveira Brito; Solange Xavier dos Santos

Figura 01. Localização da área de estudo. Mapa do estado de Goiás, com destaque para a localização da “Reserva ambiental” Trilha do Tatu, situada no Câmpus de Ciências Exatas e Tecnológicas (CCET) da Universidade Estadual de Goiás, Anápolis.



Fonte: modificado de Barreto e Angelini (2003).

A amostragem de micromicetos do solo foi realizada a uma profundidade de 10 cm da superfície. Para o isolamento foi utilizada a técnica de diluição seriada até a proporção de 10^{-3} . Em seguida, 100 μL dessa suspensão de solo foram inoculados em meio batata, dextrose e ágar (BDA) acrescido de cloranfenicol ($0,025 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em placas de Petri. O inóculo foi espalhado sobre a superfície do meio com o auxílio de uma alça de Drigalski.

A amostragem de macromicetos foi realizada a partir da coleta de corpos de frutificação visíveis a olho nu, que foram acondicionados em sacos de papel devidamente rotulados. Em campo, os espécimes foram fotografados antes da retirada do substrato, uma vez que, após a secagem do material, caracteres taxonômicos importantes podem sofrer modificações, sejam na coloração, textura ou forma. Em laboratório, para o isolamento em cultura, foram retirados fragmentos dessas frutificações; esses fragmentos foram previamente lavados em solução de hipoclorito de sódio (10%) e água destilada esterilizada (Schulz et al. 1993) e inoculados sobre a superfície do meio BDA acrescido de cloranfenicol ($0,025 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em placas de petri.

Lucas Leonardo da Silva; Izabel Cristina Moreira; Thâmara Machado e Silva; Larissa Batista da Silva; Thales Antony Assis Santos; Leticia Mikaelly de Oliveira; Denes Ferraz de Souza; Andressa de Oliveira Brito; Solange Xavier dos Santos

As culturas foram incubadas em estufa BOD a 25 °C durante 72 h. Após esse período, as colônias que surgiram foram repicadas e transferidas para novas placas contendo BDA, para obtenção de colônias puras. Os espécimes de macromicetos caracterizados foram depositados no herbário HUEG e os isolados fúngicos obtidos foram inseridos na coleção de culturas fúngicas do Laboratório de Biodiversidade do Cerrado da UEG/CCET, preservados pelo método de Castellani.

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Entre os fungos que cresceram em cultura, foram selecionados cinco isolados que apresentaram melhor crescimento para a investigação do seu potencial biotecnológico quanto à produção de enzimas de interesse industrial, atividade antimicrobiana e toxicidade preliminar. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média das repetições.

Esses fungos caracterizados quanto ao potencial biotecnológico foram identificados até o menor nível taxonômico possível, tendo como referência a literatura específica para os grupos e a comparação com material de herbário. O sistema de nomenclatura dos espécimes estudados seguiu a base de dados *Index Fungorum*.

ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Foi avaliada a atividade das enzimas peroxidase (EC 1.11.1) e carboximetilcelulase (EC 3.2.1.4). A avaliação da atividade de peroxidase foi realizada de forma quantitativa. Para tanto, os isolados selecionados foram cultivados em um sistema de fermentação semi-sólida, em que discos de cultura crescida em meio BDA foram inoculados em meio à base de farelo de trigo, enriquecido com sulfato de amônia (0,1%) e sulfato de magnésio (0,01%). As culturas foram incubadas a 25 °C durante sete dias. Para obtenção do extrato enzimático bruto, o material cultivado foi ressuspensionado em 40 mL de água destilada, descompactado, agitado e filtrado. A solução obtida foi utilizada para os ensaios enzimáticos.

A atividade de peroxidase foi avaliada por espectrofotometria pelo método de Halpin e Lee (1987), utilizando-se pirogalol e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como substrato. Em tubos de ensaio foram adicionados 2,4 mL de pirogalol preparado em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 6,0 e 0,1 mL da solução enzimática. A reação foi iniciada pela adição de 0,5 mL de H₂O₂ a 0,05 mol L⁻¹, e se processou em 1 min, a 420 nm, considerando 0,1 absorvância/min, o equivalente a uma unidade de enzima de peroxidase (POX)

Lucas Leonardo da Silva; Izabel Cristina Moreira; Thâmara Machado e Silva;
Larissa Batista da Silva; Thales Antony Assis Santos; Leticia Mikaelly de Oliveira;
Denes Ferraz de Souza; Andressa de Oliveira Brito; Solange Xavier dos Santos

A atividade celulolítica dos isolados foi avaliada de forma qualitativa, através do cultivo em meio sólido específico capaz de identificar a produção de carboximetilcelulase (CMCase). Para determinar a atividade enzimática, discos de cultura crescida em meio BDA foram inoculados no ponto central de placas de petri contendo os meios sintéticos CMC I e CMC II, sendo a carboximetilcelulose (CMC) utilizada como única fonte de carbono (Ruegger & Tauk-Tornisielo 2004). As placas foram incubadas a 28 °C por 96 h. Após esse período, foram adicionados sobre as culturas 10 mL de solução de vermelho congo (2,5 g.L⁻¹) em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8,0. Após 30 minutos as culturas foram lavadas com 5 mL de solução NaCl 0,5 mol L⁻¹ para revelação do halo de degradação (Teather & Wood 1982).

O resultado foi avaliado pela medida do diâmetro das colônias e dos halos de degradação, sendo o valor expresso em índice enzimático (IE), baseado na soma do diâmetro da colônia com o do halo formado, dividindo o resultado pelo valor do diâmetro da colônia (Tiago & Silva 2007). Os isolados que não formaram halo de degradação foram considerados negativos para presença da enzima. Em contrapartida, os isolados que exibiram $IE \geq 2$ foram considerados bons produtores dessa enzima (Lealem & Gashe 1994).

EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os metabólitos secundários foram extraídos a partir do cultivo dos isolados em meio líquido TLE (1 g.L⁻¹ de bactotripton, 0,3 g.L⁻¹ de uréia, 2,0 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, 1,4 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 0,3 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,3 g.L⁻¹ de CaCl₂.6H₂O e solução de elementos traços) e incubados a 28 °C por 168 h. As culturas foram, então, filtradas a vácuo e os metabólitos extraídos com a adição de acetato de etila 2,5% (1:2), sendo a fase apolar utilizada nos ensaios. A solução obtida foi diluída em água destilada nas concentrações 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 4000 e 5000 ppm, para realização dos ensaios de atividade antimicrobiana e em água marinha sintética (38g de NaCl/1000 mL de H₂O) para os ensaios de toxicidade.

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana foi determinada através do método de disco-difusão (Ribeiro & Soares 1998), utilizando-se as seguintes cepas bacterianas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25312, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *S. epidermidis* ATCC 12223, proveniente do banco de microrganismos do Laboratório de Microbiologia da UEG/CCET. Cada cepa foi

Lucas Leonardo da Silva; Izabel Cristina Moreira; Thâmara Machado e Silva;
Larissa Batista da Silva; Thales Antony Assis Santos; Leticia Mikaelly de Oliveira;
Denes Ferraz de Souza; Andressa de Oliveira Brito; Solange Xavier dos Santos

inoculada em placas de Petri contendo o meio ágar nutriente, a partir de colônias isoladas ajustadas para a escala 0,5 de Mc Farland.

As placas foram divididas em oito setores. Em cada setor foi depositado um disco de papel filtro (5 mm de diâmetro), previamente esterilizado e embebido em 0,5 µL de uma das soluções dos metabólitos. As placas foram incubadas por 24 h a 35 °C, e então, verificada a formação de halo de inibição do crescimento bacteriano ao redor do disco.

INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE PRELIMINAR

A toxicidade dos isolados foi determinada conforme o método descrito por Meyer et al. (1982), que constitui um bioensaio simples e bastante empregado para a investigação preliminar de atividade de produtos naturais. Através desse método, é possível determinar a concentração letal 50% (CL₅₀) de componentes ativos e extratos em meio salino, manifestada pela toxicidade de componentes ativos, frações ou extratos de produtos naturais frente a larvas do microcrustáceo marinho *Artemia salina*.

Cistos de *A. salina* adquiridos comercialmente foram incubados em um aquário contendo água marinha sintética sob oxigenação e controle da temperatura (25 °C). Após 37 h de incubação, as larvas que eclodiram foram retiradas para realização do ensaio. Para o ensaio, dez larvas foram depositadas, com auxílio de uma micropipeta, em cada um dos poços de uma microplaca de poliestireno contendo cada qual uma das soluções de metabólitos. Como controle negativo foi utilizada solução marinha sintética. Após 37 h de incubação a 25 °C, foi contabilizado sob microscópio estereoscópico o número de indivíduos vivos e mortos em cada solução. A toxicidade foi expressa como concentração letal a 50% da população (CL₅₀), estimada através do software *Statplus 2009 professional (AnalystSoft/Probitos)*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

OS FUNGOS COLETADOS

Foram amostrados 36 exemplares de macromicetos *sensu lato*, e dezenas de biótipos distintos de micromicetos (a partir do isolamento do solo). Esses fungos estão distribuídos em três grupos taxonômicos: basidiomicetos, ascomicetos e mixomicetos, entre os quais, os isolados 01, 02, 04, 24 e 37 foram utilizados nos ensaios de bioprospecção (Tabela 01 e Figura 02).

Bioprospecção de Fungos de um Fragmento de Cerrado no Brasil Central para Aplicações Biotecnológicas

Lucas Leonardo da Silva; Izabel Cristina Moreira; Thâmara Machado e Silva;
Larissa Batista da Silva; Thales Antony Assis Santos; Leticia Mikaelly de Oliveira;
Denes Ferraz de Souza; Andressa de Oliveira Brito; Solange Xavier dos Santos

Tabela 01. Relação dos fungos amostrados na “Reserva ambiental” de Cerrado Trilha do Tatu, Anápolis, Goiás segundo a fitofisionomia, substrato, grupo taxonômico, gênero e número de tombo no herbário HUEG e na coleção de culturas fúngicas do Laboratório de Biodiversidade do Cerrado (SXS). SS: cerrado sensu stricto; MS: mata seca; MG: mata de galeria; MM: madeira morta; MV: madeira viva; FV: folha viva; FM; folha morta; FM SO: solo; IN: cadáver de inseto.

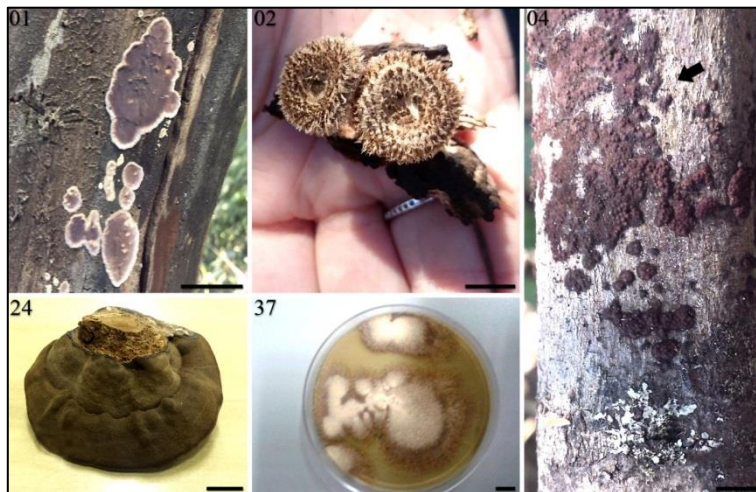
Nº amostra/isolado	Fitofisionomia	Substrato	Grupo taxonômico	Gênero	Tombo	
					HUEG	SXS
Macromicetos						
01*	SS	MM	Basidiomiceto		11432	534
02*	SS	MM	Basidiomiceto	<i>Lentinus</i>	11433	535
03	MS	MM	Ascomiceto			
04*	MS	MM	Ascomiceto	<i>Diatrype</i>	11434	536
05	MS	MM	Basidiomiceto			
06	MS	MV	Ascomiceto			
07	MS	MM	Basidiomiceto			
08	MS	MM	Indeterminado			
09	MS	MM	Basidiomiceto			
10	MS	MM	Basidiomiceto			
11	MS	MM	Basidiomiceto			
12	MS	MM	Basidiomiceto			
13	MS	FM	Indeterminado			
14	MS	FM	Indeterminado			
15	MS	SO	Indeterminado			
16	MS	MM	Basidiomiceto			
17	MS	FM	Ascomiceto			
18	MG	SO	Indeterminado			
19	MG	MM	Ascomiceto			
20	MG	MM	Basidiomiceto			
21	MG	MV	Ascomiceto			
22	MG	MM	Basidiomiceto			
23	MG	MM	Basidiomiceto			
24*	MG	MM	Basidiomiceto	<i>Fomes</i>	11435	606
25	MG	-	Indeterminado			
26	MG	MM	Basidiomiceto			
27	MG	MM	Ascomiceto			
28	MG	MM	Ascomiceto			
29	MG	FM	Indeterminado			
30	MG	MM	Basidiomiceto			
31	MG	IN	Indeterminado			
32	MG	FV	Indeterminado			
33	MG	-	Indeterminado			
34	MG	MM	Basidiomiceto			
35	MG	FV	Ascomiceto			
36	MG	MM	Mixomiceto			
Micromicetos						
37*	SS	SO	Ascomiceto	<i>Aspergillus</i>		607
38	MG	SO	Ascomiceto			

*Amostras utilizadas nos ensaios de bioprospecção.

Fonte: Os Autores.

Lucas Leonardo da Silva; Izabel Cristina Moreira; Thâmara Machado e Silva; Larissa Batista da Silva; Thales Antony Assis Santos; Leticia Mikaelly de Oliveira; Denes Ferraz de Souza; Andressa de Oliveira Brito; Solange Xavier dos Santos

Figura 02. Fungos amostrados na “Reserva ambiental” de Cerrado Trilha do Tatu, Anápolis, Goiás, utilizados em ensaios de bioprospecção. O número indicado em cada imagem corresponde ao número da amostra: 01) Corticiaceae; 02) *Lentinus* sp.; 04) *Diatrype* sp. (seta); 24) *Fomes* sp. e 37) *Aspergillus* sp. Barra = 1cm.

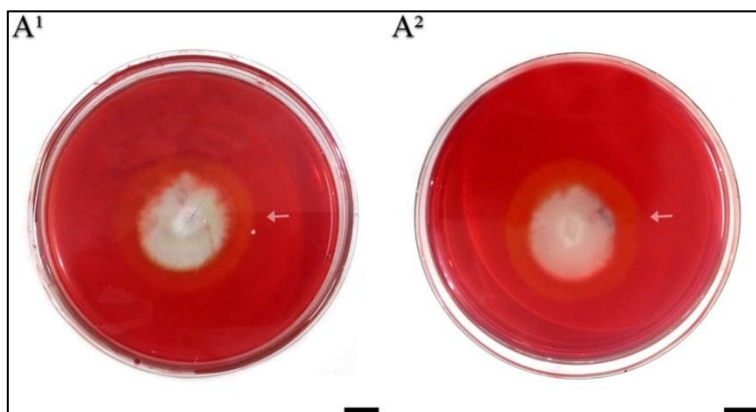


Fonte: Os Autores.

O POTENCIAL ENZIMÁTICO

Todos os isolados fúngicos apresentaram halo de degradação nos meios contendo CMC como única fonte de carbono, indicando a atividade de CMCase (Figura 03), com índice enzimático (IE) $\geq 2,0$ (Tabela 02). O isolado 02 (*Lentinus* sp.) apresentou atividade enzimática apenas no meio CMC II. Atividade de peroxidase foi detectada nos isolados 02 (*Lentinus* sp.), 04 (*Diatrype* sp.) e 37 (*Aspergillus* sp.), com destaque para o isolado 02, com UE superior 1,0 (Tabela 02).

Figura 03. Culturas do fungo *Fomes* sp. (isolado 24) proveniente da “Reserva ambiental” de Cerrado Trilha do Tatu, Anápolis, Goiás mostrando halo de degradação (seta) em meio CMC I e CMCII (A¹ e A²: respectivamente). Barra = 1 cm.



Fonte: Os Autores.

Lucas Leonardo da Silva; Izabel Cristina Moreira; Thâmara Machado e Silva; Larissa Batista da Silva; Thales Antony Assis Santos; Leticia Mikaelly de Oliveira; Denes Ferraz de Souza; Andressa de Oliveira Brito; Solange Xavier dos Santos

Tabela 02. Atividade enzimática e toxicidade de isolados de fungos coletados na “Reserva ambiental” de Cerrado Trilha do Tatu, Anápolis, Goiás. CMCCase: carboximetilcelulase; POX: peroxidase; UE: unidade de enzima; Øc: diâmetro da colônia (cm); Øh: diâmetro do halo de degradação (cm); IE: índice enzimático; NA: não avaliado; ND: não detectado.

Isolado	Táxon	Atividade enzimática						POX UE	Toxicidade sobre <i>Artemia salina</i> CL ₅₀ (ppm)
		CMCase			CMCase				
		Meio CMC I		IE	Meio CMC II		IE		
Øc	Øh	Øc	Øh						
01	Indet.(Corticaceae)	2,8	3,6	2,3	3,2	4	2,2	NA	2.742
02	<i>Lentinus</i>	3,3	ND	ND	3,6	4,2	2,2	1,204	1.670
04	<i>Diatrype</i>	2,5	4	2,6	3,75	4,5	2,2	0,1328	1.418
24	<i>Fomes</i>	2,7	3,9	2,4	3,4	4	2,2	NA	1.528
37	<i>Aspergillus</i>	1,6	2,2	2,4	2,2	2,8	2,2	0,54	3.279

Fonte: Os Autores.

Silva et al. (2015), investigando a produção de enzimas extracelulares por fungos do Cerrado associados à decomposição de materiais de vegetais em riachos, detectaram atividade celulolítica em 69% das 100 linhagens estudadas. Entre essas, 23% foram consideradas potenciais para aplicação em processos biotecnológicos, por apresentarem índice enzimático superior a 2,0. Souza et al. (2008) também detectaram atividade celulolítica em todos os 10 isolados fúngicos estudados, procedentes do bioma amazônico, sendo o isolado do gênero *Trametes* sp. o de maior atividade enzimática.

A capacidade de fungos em sintetizar enzimas ligninocelulolíticas está relacionada à sua habilidade em decompor a madeira. Durante esse processo, o fungo promove a quebra dos componentes da parede celular vegetal (celulose, hemicelulose e lignina) através da secreção de metabólitos secundários, principalmente as enzimas ligninocelulolíticas, sendo as lacases, lignina peroxidases, manganês peroxidases e celulasas as mais estudadas (Silva & Gilbertoni 2006; Abreu et al. 2007).

Motato-Vásquez et al. (2016) avaliaram qualitativamente 31 isolados de basidiomicetos quanto à produção de enzimas lignocelulolíticas. Eles constataram a presença de POX e CMCCase em 90 e 58% dos isolados, respectivamente. As espécies em questão foram associadas à decomposição branca da madeira devido à presença de ligninases, envolvidas no processo de degradação da lignina, confirmada para quase todos os espécimes testados pelos autores.

Os fungos de decomposição branca são caracterizados pela degradação preferencial da lignina entre os demais componentes da madeira (celulose e hemicelulose), deixando a madeira assim decomposta com o aspecto esbranquiçado, já que a lignina é responsável pela coloração castanha. A maioria desses organismos pertence ao filo Basidiomycota, com destaque para os gêneros *Bjerkandera*,

Lucas Leonardo da Silva; Izabel Cristina Moreira; Thâmara Machado e Silva;
Larissa Batista da Silva; Thales Antony Assis Santos; Leticia Mikaelly de Oliveira;
Denes Ferraz de Souza; Andressa de Oliveira Brito; Solange Xavier dos Santos

Gloeophyllum, *Jungbuhnia*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Phlebia*, *Pycnoporus*, *Schizophyllum* e *Trametes* (Soares 1998; Gibertoni 2004; Xavier-Santos et al. 2004; Abreu et al. 2007). Entretanto, algumas espécies pertencentes a outros grupos taxonômicos também são capazes de promover a degradação da madeira e produzir enzimas ligninocelulolíticas (Saparrat et al. 2002). Os resultados dos testes enzimáticos realizados no presente estudo confirmam essa afirmação, já que o isolado representante de Basidiomiceto (*Lentinus* sp.) mostrou atividade de POX bastante superior aos isolados do filo Ascomycota (*Diatrype* sp. e *Aspergillus* sp.).

As enzimas ligninocelulolíticas apresentam grande potencial de aplicação biotecnológica. As celulasas estão entre as enzimas hidrolíticas mais utilizadas na indústria têxtil, de papel, no preparo de detergentes, alimentos, extração de óleos e pigmentos, entre outras (Kubicek et al. 1993; Bhat 2000). As celulasas têm sido empregadas na fabricação do etanol de segunda geração, obtido a partir da celulose de materiais lignocelulolíticos (Silva 2010).

As peroxidases são enzimas da classe oxidoredutases, cuja função é catalisar a oxidação de componentes celulares, tais como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Elas têm grande aplicação em processos biorremediativos, especialmente de poluentes orgânicos e tratamento de águas residuais contendo compostos fenólicos (Kvaratskhelia et al. 1997; Karim & husain 2009).

A produção de enzimas por fungos está relacionada ao seu processo de nutrição. Durante este processo ocorre a degradação de diversos substratos naturais ou processados, sendo em sua maioria de natureza lignocelulolítica (Bennet 1998). Assim, a presença dessas enzimas está diretamente associada ao tipo de substrato (Ruegger & Tauk-Tornisielo 2004). Dessa forma, na exploração biotecnológica desses fungos, a produção dessas enzimas poderá ser induzida de acordo com o substrato fornecido.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

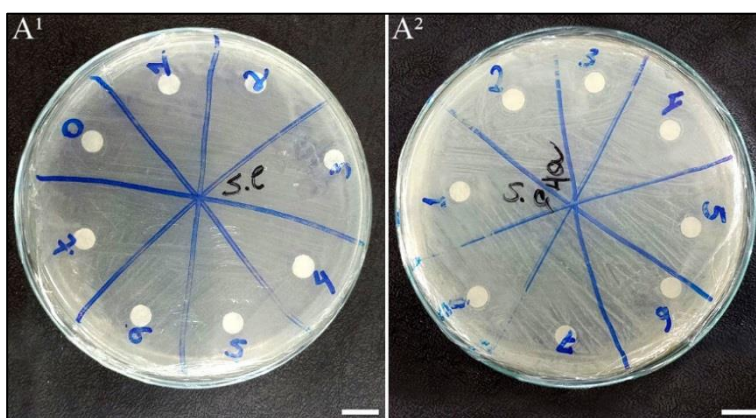
As soluções metabólicas dos fungos estudados não induziram a formação de halo de inibição do crescimento contra as cepas bacterianas testadas (Figura 04). Vanderlinde e Onofre (2010) observaram resultados diferentes utilizando metabólitos produzidos por fungos da espécie *Pycnoporus sanguineus*, que apresentou atividade antimicrobiana para quatro das cinco cepas analisadas.

Wisbeck et al. (2009), estudando diferentes espécies do gênero *Pleurotus*, observaram atividade antimicrobiana contra uma única cepa bacteriana das quatro testadas. Os autores relatam que uma das possíveis causas da ausência do halo de inibição está na baixa concentração dos metabólitos utilizados, que foi insuficiente para impedir o crescimento bacteriano. Considerando que a produção de

Lucas Leonardo da Silva; Izabel Cristina Moreira; Thâmara Machado e Silva;
Larissa Batista da Silva; Thales Antony Assis Santos; Leticia Mikaelly de Oliveira;
Denes Ferraz de Souza; Andressa de Oliveira Brito; Solange Xavier dos Santos

compostos bioativos por um microrganismo constitui uma estratégia de competição pelo substrato, a ausência da atividade antimicrobiana nos fungos testados também pode estar relacionada ao habitats que eles ocupam no ambiente estudado, em sua maioria madeira morta, que não coincide com o nicho ecológico das espécies bacterianas testadas, sendo essas presentes no solo, com exceção da *Escherichia coli*.

Figura 04. Atividade antimicrobiana do fungo *Diatrype* sp. (isolado 04), proveniente da “Reserva ambiental” de Cerrado Trilha do Tatu, Anápolis, Goiás, avaliada pelo método de disco-difusão. A¹: contra *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12223; A²: contra *S. aureus* ATCC 6538. Barra = 1 cm.



Fonte: Os Autores.

TOXICIDADE

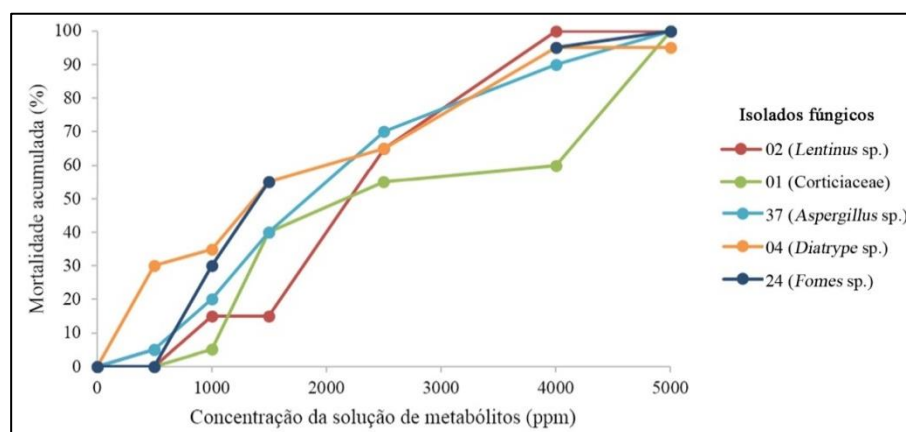
Moléculas bioativas têm sido isoladas e caracterizadas para diversas aplicações biotecnológicas. Muitas espécies de fungos são conhecidas por biossintetizar metabólitos secundários de grande interesse por apresentar diversas atividades biológicas (Keller et al. 2005). Por outro lado, esses compostos podem ser fatores limitantes para aplicação desses fungos em diferentes processos biotecnológicos, especialmente em se tratando da indústria alimentícia e farmacêutica, por oferecer riscos ao homem e ao ambiente (Perrone et al. 2007; Pereyra et al. 2010).

Por essa razão, a aplicação de fungos e seus produtos requer a realização de testes que visam analisar os possíveis efeitos tóxicos que ocorrem nos sistemas biológicos, e dimensionar a toxicidade relativa dessas substâncias (Forbes & Forbes 1994). Comumente, esses ensaios são realizados utilizando-se microcrustáceos pertencentes à ordem Anostraca, sendo *Artemia salina* a espécie mais utilizada para este fim, pois garante um método seguro, rápido, prático e de baixo custo (Luna et al. 2005).

Lucas Leonardo da Silva; Izabel Cristina Moreira; Thâmara Machado e Silva; Larissa Batista da Silva; Thales Antony Assis Santos; Leticia Mikaelly de Oliveira; Denes Ferraz de Souza; Andressa de Oliveira Brito; Solange Xavier dos Santos

As soluções metabólicas dos fungos testados no presente trabalho causaram 100% de mortalidade em *A. salina* quando em concentração igual ou superior a 4000 ppm, exceto o isolado 04 (*Diatrype* sp.) que não foi capaz de causar 100% de mortalidade em nenhuma das concentrações testadas (Figura 05). A tabela 02 apresenta a CL₅₀ dos fungos estudados, em que pode-se verificar que os extratos brutos de todos os fungos testados não apresentaram atividade citotóxica sobre as larvas de *A. salina*, sendo considerados inativos, pois apresentaram CL₅₀ superior a 1000 ppm. De acordo com Meyer et al. (1982), uma substância para ser considerada tóxica deve apresentar CL₅₀ inferior a 1000 ppm. Estes dados sugerem a ausência de componentes citotóxicos nos fungos estudados e demonstram que são potenciais candidatos para serem utilizados em processos biotecnológicos de aplicação direta ao homem ou ao meio ambiente, uma vez que não demonstraram toxicidade.

Figura 05. Mortalidade acumulada de larvas de *Artemia salina* submetidas a soluções de diferentes concentrações de metabólitos fúngicos provenientes de fungos isolados da “Reserva ambiental” de Cerrado Trilha do Tatu, Anápolis, Goiás.



Fonte: Os Autores.

Ramirez et al. (2008) investigaram a toxicidade de basidiomicetos agaricoides e constataram que os metabólitos extraídos de *Pleurotus ostreatus* e *P. pulmonarius* apresentam baixa toxicidade, enquanto que *P. involutus* demonstrou alta toxicidade frente a larvas de *A. salina*. Devido à baixa toxicidade apresentada por esses organismos, muitas espécies de fungos, principalmente micromicetos, são bastante exploradas para diversas aplicações industriais. Algumas espécies como *Acremonium chrysogenum*, *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Penicillium chrysogenum* e *Trichoderma reesei*, são empregadas no setor alimentício e farmacêutico (Radzio & Ulrich 1997).

Lucas Leonardo da Silva; Izabel Cristina Moreira; Thâmara Machado e Silva;
Larissa Batista da Silva; Thales Antony Assis Santos; Leticia Mikaelly de Oliveira;
Denes Ferraz de Souza; Andressa de Oliveira Brito; Solange Xavier dos Santos

CONCLUSÃO

Esse trabalho permitiu verificar que todos os isolados fúngicos testados foram capazes de produzir peroxidase e carboximetilcelulase, e não apresentaram atividade antimicrobiana ou toxicidade preliminar sobre *Artemia salina*, sugerindo a ausência de componentes citotóxicos nestes fungos. Ainda que para avaliação da toxicidade sejam necessários ensaios complementares, esses resultados estimulam a continuidade dos estudos para a bioprospecção do potencial biotecnológico destes fungos. Os resultados ressaltam ainda a importância em explorar a biodiversidade fúngica do Cerrado, contribuindo para expansão do conhecimento da riqueza do grupo e a possibilidade de caracterização de novas biomoléculas.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), à Universidade Estadual de Goiás (UEG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado aos autores Leticia Mikaelly de Oliveira e Lucas Leonardo da Silva (FAPEG), Denes Ferraz de Souza, Larissa Batista da Silva, Thales Antony Assis Santos (UEG) e Thâmara Machado e Silva (CAPES). Ao técnico de laboratório Osvaldo Gomes Pinto, pelo apoio na condução das atividades laboratoriais.

REFERÊNCIAS

- Abrahão MC, Gugliotta AM, Bononi VLR 2012. Xylophilous Agaricomycetes (Basidiomycota) of the Brazilian Cerrado. *Check List* 8(6):1102-1116.
- Abreu JAS, Rovida AFS, Pamphile JA 2015. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. *Uningá Review* 21(1):55-59.
- Abreu LD, Marino RH, Mesquita JB, Ribeiro GT 2007. Degradação da madeira de Eucalyptus sp. por basidiomicetos de podridão branca. *Arq Inst Biol* 74(4):321-328.
- Aguiar LMS, Machado BM, Marinho-Filho JA 2004. Diversidade Biológica do Cerrado. In Cerrado: ecologia e caracterização. *Embrapa Cerrados*, p.17-40.
- Barreto NM, Angelini R 2003. *Mapeamento topográfico e delimitação fitofisionômica da área natural do campus da UEG*. In mostra de iniciação científica da UEG, Anápolis. Anais. Universidade Estadual de Goiás, Anápolis.
- Bennet JW 1998. Mycothecology: the role of fungi in biotechnology. *J Biotechnol*, 66:101-107.
- Bhat M K 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol Adv*, 18(5):355-383.

Lucas Leonardo da Silva; Izabel Cristina Moreira; Thâmara Machado e Silva;
Larissa Batista da Silva; Thales Antony Assis Santos; Letícia Mikaelly de Oliveira;
Denes Ferraz de Souza; Andressa de Oliveira Brito; Solange Xavier dos Santos

- Braga GUL, Destéfano RHR, Messias CL 1999. Protease production during growth and autolysis of submerged *Metarhizium anisopliae* cultures. *Rev Microbiol*, 30(2):107-113.
- Chapla VM, Biasetto CR, Araujo AR 2013. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos. *Produtos Naturais*, 5(3):421-437.
- Costa-Rezende DH, Gugliotta AM, Góes-Neto A, Reck MA, Robledo GL, Drechsler-Santos ER 2016. *Amauroderma calcitum* sp. nov. and notes on taxonomy and distribution of *Amauroderma* species (Ganodermataceae). *Phytotaxa*, 244(2):101-124.
- Dianese EC, Fonseca MEN, Inoue-Nagata AK, Resende RO, Boiteux LS 2011. Search in *Solanum* (section *Lycopersicon*) germplasm for sources of broad-spectrum resistance to four Tospovirus species. *Euphytica*, 180(3):307-319.
- Felfili MC, Felfili JM 2001. Diversidade Alfa e Beta no Cerrado. *Acta Bot Bras*, 15(2):243-254.
- Forbes VE, Forbes TL 1994. *Ecotoxicology in theory and practice*. Chapman & Hall, 247pp.
- Gibertoni TB 2004. *Aphyllphorales (Basidiomycotina) em áreas de Mata Atlântica do Nordeste Brasileiro*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 200pp.
- Halpin BE, Lee CY 1987. Effect of blanching on enzyme activity and quality changes in green peas. *J Food Sci*, 52(4):1002-1005.
- Hawksworth DL 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res*, 105(12):1422-1432.
- Hawksworth DL, Lücking R 2017. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiol Spectr*, 5:1-17.
- Karim Z, Husain Q 2009. Guaiacol-mediated oxidative degradation and polymerization of bisphenol A catalyzed by bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase. *J Mol Catal B: Enzym*, 59:185-189.
- Keller NP, Geoffrey T, Joan WB 2005. Fungal secondary metabolism-from biochemistry to genomics. *Nature Rev Microbiol*, 3(12):937-947.
- Klink CA, Machado RB 2005. Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conser Biol*, 19(3):707-713.
- Kubicek CP, Messner R, Gruber F, Mandels M, Kubicek-Pranz EM 1993. Triggering of cellulase biosynthesis by cellulose in *Trichoderma reesei*. Involvement of a constitutive, sophorose-inducible, glucose-inhibited beta-diglycoside permease. *J Biol Chem*, 268(268):19364-19368.
- Kvaratskhelia M, Winkel C, Thorneley RNF 1997. Purification and characterization of a novel class in peroxidase isoenzyme from tea leaves. *Plant Physiol*, 114:1237-1245.
- Lealem F, Gashe BA 1994. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). *J Appl Bacteriol*, 77:337-352.

Lucas Leonardo da Silva; Izabel Cristina Moreira; Thâmara Machado e Silva;
Larissa Batista da Silva; Thales Antony Assis Santos; Leticia Mikaelly de Oliveira;
Denes Ferraz de Souza; Andressa de Oliveira Brito; Solange Xavier dos Santos

Lopes VDS 2013. *Avaliação de complexos enzimáticos obtidos a partir de fungos do cerrado para produção de etanol de segunda geração*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 74pp.

Luna JS, Santos AF, Lima MRF, Omena MC, Mendonça FAC, Bieber LW, Sant'Ana AEG 2005. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *J Ethnopharmacol*, 97(2):199-206.

Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin LJ 1982. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med*, 45:31- 34.

Motato-Vásquez V, Pires RM, Vitali VMV, Gugliotta ADM 2016. Cultural and ligninolytic activity studies of some polypores (Basidiomycota) from brazilian Atlantic Forest, São Paulo State, Brazil. *Hoehnea*, 43(2):289-300.

Namhyun C, Lee IS, Song HS, Bang WG 2000. Mechanisms used by white-rot fungus to degrade lignin and toxic chemicals. *J Microbiol Biotechnol*, 10(6):737-752.

Nielsen RI, Oxenboll K 1998. Enzymes from fungi: their technology and uses. *Mycologist*, 69-71p.

Pereira CB, 2016. *Avaliação da produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por fungos isolados do cerrado, costa marinha brasileira e da antártica, utilizando casca de soja como substrato*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 116pp.

Pereira DEP 2013. *Análise de celulases e xilanases por fungo isolado a partir do bioma cerrado*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 101pp.

Pereyra CM, Cavaglieri LR, Chiacchiera SM, Dalcerro AM 2010. Fungi and Mycotoxins in Feed Intended for Sows at Different Reproductive Stages in Argentina. *Vet Med Int*, 2010:1-7.

Perrone G, Susca A, Cozzi G, Ehrlich K, Varga J, Frisvad JJC, Meijer M, NO Onim P, Mahakarnchanakul W, Samson RA 2007. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Stud Mycol*, 59(9):53-66.

Radzio R, Ulrich K 1997. Synthesis of biotechnologically relevant heterologous proteins in filamentous fungi. *Process biochem*, 32(6):529-539.

Ramírez IJN, Salama RAM, Cataño J, Chegwin C 2008. Determinación de la toxicidad de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Paxillus involutus* sobre *Artemia salina*. *Rev Iberoam Micol*, 25:186-187.

Ribeiro MC, Soares MMSR 1998. *Microbiologia prática. Roteiro e manual. Bactérias e fungos*. Ed. Atheneu, São Paulo, 112pp.

Rocha BB 2012. *Caracterização do Perfil Enzimático de um Fungo Isolado do Cerrado Brasileiro*, tese de doutorado, Universidade de Brasília, 130pp.

Ruegger MJS, Tauk-Tornisielo SM 2004. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Rev Bras Bot*, 27(2):205-211.

Lucas Leonardo da Silva; Izabel Cristina Moreira; Thâmara Machado e Silva; Larissa Batista da Silva; Thales Antony Assis Santos; Leticia Mikaelly de Oliveira; Denes Ferraz de Souza; Andressa de Oliveira Brito; Solange Xavier dos Santos

Santos CT, Filho GA, Rocha TJO, Franco M 2011. Aplicação da fermentação em estado sólido sobre o farelo de cacau (*Theobroma cacao* L.): Obtenção de ligninases. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, 32(1):87-96.

Saparrat MCN, Martínez MJ, Cabello MN, Arambarri AM 2002. Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. *Rev Iberoame Micol*, 19:181-185.

Schulz B, Wanke U, Draeger S, Aust HJ 1993. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological Res*, 97:1447-1450.

Silva GT, Gibertoni TB 2006. Aphylophorales (Basidiomycota) em áreas urbanas da região Metropolitana do Recife, PE, Brasil. *Hoehnea*, 33(4):533-543.

Silva JBA, Frantz SC, Marques AK, Coelho CM, Morais PB 2015. Produção de enzimas extracelulares por fungos associados à decomposição de materiais de vegetais em riachos. *J Bioen Food Sci*, 4(2):208-212.

Silva NLC 2010. *Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 123pp.

Soares CHL 1998. *Estudos Mecanísticos de degradação de efluentes de indústria de papel e celulose por fungos basidiomicetes degradadores de madeira*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 133pp.

Souza HQ, Oliveira LA, Andrade JS 2008. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Food Sci Technol*, 28:16-124.

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

Tiago PV, Silva RJ 2007. Atividade proteolítica de isolados de *Metarbizium anisopliae* sobre substratos cuticulares e não cuticulares. *Ciênc Rural*, 37:26-30.

Vanderlinde DG, Onofre SB 2010. Atividade antimicrobiana de metabólitos produzidos pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* (Linnaeus: Fries) Murrill. *Rev Saud Pesq*, 3(1):11-16.

Wisbeck E, Robert A, Furlan AS 2009. Avaliação da produção de agentes antimicrobianos por fungos do gênero *Pleurotus*. *Revista Saúde e Ambiente*, 3(2):7-10.

Xavier-Santos S, Carvalho CC, Bonfá M, Capelari M, Gomes E 2004. Screening for pectinolytic activity of wood-rotting basidiomycetes and characterization of the enzymes. *Folia Microbiol*, 49(1):46-52.

Lucas Leonardo da Silva; Izabel Cristina Moreira; Thâmara Machado e Silva;
Larissa Batista da Silva; Thales Antony Assis Santos; Leticia Mikaelly de Oliveira;
Denes Ferraz de Souza; Andressa de Oliveira Brito; Solange Xavier dos Santos

Bio-Prospection of Fungi from a Fragment of Cerrado in Central Brazil for Biotechnological Applications

ABSTRACT

Considering the importance of bio-prospection studies involving species from threatened environments that are of great biological richness and endemism, this work aimed to investigate the biotechnological potential of fungi from different habitats in a fragment of Cerrado. The fungi were isolated in culture, and some were selected for the prospection of enzymes that are of industrial interest, for antimicrobial activity and preliminary toxicity. Carboxymethyl cellulose and peroxidase activity was detected in all isolates evaluated. In the tests for antimicrobial activity, the fungal metabolites did not show growth inhibition for the bacterial strains analyzed, and in the toxicity assays these metabolites were shown to be innocuous for *Artemia salina* larvae. Although the toxicity evaluation still requires complementary assays, these results justify the continuation of bio-prospection studies on the biotechnological potential of these fungi, showing them to be promising candidates for use in processes applied directly to humans or to the environment.

Keyword: Basidiomycetes; Ascomycetes; Lignocellulolytic Enzymes; Toxicity.

Submissão: 31/05/2017

Aceite: 21/11/2017