

## **Avaliação enzimática e morfológica de fungos associados a um basidiomiceto da região Amazônica**

### **Fungi's enzymatic and morphological evaluation associated with a basidiomycete from the Amazonic region**

DOI:10.34117/bjdv7n1-667

Recebimento dos originais: 01/01/2021

Aceitação para publicação: 25/01/2021

#### **Paulo Alexandre Lima Santiago**

Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia  
Instituição: Universidade do Estado do Amazonas – UEA  
Endereço: Avenida da Amizade, 74, Centro, Tabatinga – Brasil  
E-mail: santiago\_fRO@hotmail.com

#### **Sarah Raquel Silveira da Silva Santiago**

Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia  
Instituição: Universidade do Estado do Amazonas – UEA  
Endereço: Avenida da Amizade, 74, Centro, Tabatinga – Brasil  
E-mail: srhrael@hotmail.com

#### **Aldalúcia Macêdo dos Santos Gomes**

Mestrado em Educação em Ciências na Amazônia  
Instituição: Escola Superior Batista do Amazonas  
Endereço: Rua Joaquim Curado, 152, Parque 10 de Novembro, Manaus - Brasil  
E-mail: aldalucia.gomes@gmail.com

#### **Keila Dayane do Espírito Santo Pereira**

Mestrado em Biotecnologia  
Instituição: Escola Superior Batista do Amazonas  
Endereço: Rua Xanxerê, 77, Armando Mendes, Manaus – Brasil  
E-mail: keila\_dayane@yahoo.com.br

#### **Janderson da Costa Barroso**

Pós-graduação em Docência do Ensino Superior  
Instituição: Faculdade Tecnológica de Curitiba - FATEC  
Endereço: Rua Marquesa de Santos, 17, Coroado 3, Manaus – Brasil  
E-mail: janderbio2018@gmail.com

#### **Yuri Vinicius Veríssimo Lima**

Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia  
Instituição: Universidade do Estado do Amazonas – UEA  
Endereço: Rua Joaquim Marinho, 600, EN DBL 4AP 27, Parque 10 de Novembro,  
Manaus – Brasil  
E-mail: yuri.verissimo@gmail.com

**Elizabeth Cristina Abrantes de Oliveira**

Licenciada em Ciências Naturais

Instituição: Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Endereço: Avenida Nepal, 346, Quadra 54, Nova Cidade, Manaus – Brasil

E-mail: elizabethabranteso@gmail.com

**RESUMO**

A importância dos fungos para o ecossistema é amplamente conhecida, já que são capazes de decompor a matéria orgânica complexa em compostos simples como carbono e nitrogênio entre outras substâncias. Esses organismos têm sido utilizados como produtores de substâncias bioativas como enzimas e novos fármacos. O presente estudo teve como objetivo detectar a produção de enzimas pelas linhagens obtidas bem como alterações morfológicas provocadas pela alteração na composição do meio de cultura. Para a avaliação enzimática, os fungos foram cultivados em meios seletivos para detecção de álcool desidrogenase, lipase, amilase e celulase. Para a avaliação da alteração morfológica, foram estabelecidas duas estratégias, em uma alterou-se o pH do meio e em outra mudou-se a fonte nutricional. Foi verificada a alteração morfológica em duas linhagens de *Penicillium* spp. e em uma de *Aspergillus* sp. A avaliação enzimática revelou o potencial para a produção das enzimas álcool desidrogenase e lipase por *Aspergillus* sp. lipase pelas duas linhagens de *Penicillium* e amilase e lipase pelos basídios. Esses resultados ressaltam a importância de estudos da diversidade metabólica de fungos associados a outros fungos, uma vez que estes são fontes promissoras de novos metabólitos secundários bioativos.

**Palavras-Chave:** Atividade Enzimática, Morfologia de Fungos, Região Amazônica.

**ABSTRACT**

The importance of fungi to the ecosystem is widely known, since they are capable of decomposing complex organic matter into simple compounds like carbon and nitrogen among other substances. Such organisms have been used as producers of bioactive substances like enzymes and new drugs. The present study had as objective to detect the production of enzymes by the obtained lines as well as morphological alterations provoked by the alteration in the composition of the culture medium. For the enzymatic evaluation, fungi were cultured in selective media for the detection of alcohol dehydrogenase, lipase, amylase and cellulase. For the evaluation of the morphological alteration, two strategies were established, in one the pH of the medium was altered and in another one the nutritional source was changed. It was verified the morphological alteration in two strains of *Penicillium* spp. and in one of *Aspergillus* sp. The enzymatic evaluation revealed the potential for the production of the enzymes alcohol dehydrogenase and lipase by *Aspergillus* sp., Lipase by the two strains of *Penicillium* and amylase and lipase by the basidies. These results highlight the importance of studies of the metabolic diversity of fungi associated to other fungi, since these are promising sources of new bioactive secondary metabolites.

**Keywords:** Enzymatic Activity, Fungi Morphology, Amazon Region.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 FUNGOS

Os fungos são organismos eucariontes com crescimento multicelular filamentosos ou alongado (exceto as leveduras, unicelulares). Essas características similares às das plantas colaboraram para a permanência dos fungos durante muito tempo no reino *Plantae* (SILVA e COELHO, 2006), porém devido a diferenças de características bioquímicas, micro e macroscópicas, logo foi permitido a esses organismos um grupo independente e distinto do reino *Plantae*, o reino *Fungi* no qual estão inseridos os fungos filamentosos, leveduras e cogumelos. (RAVEN, et. al., 1976).

Sua nutrição é heterotrófica por absorção, isto torna estes organismos especializados na degradação de uma gama de substratos que beneficiam os fungos em seu desenvolvimento. Isso só é possível pois, um conjunto de enzimas degradam compostos complexos em compostos simples, e logo em seguida são distribuídos nas diversas vias metabólicas do organismo (DEWICK, 2009). Esses organismos não produzem clorofila isso impede que realizem fotossíntese, sendo esta, a principal característica que os diferencia das plantas (RAVEN, et. al., 1976). Outra característica importante na diferenciação de ambos os organismos, é a presença de quitina na composição da parede celular e a capacidade de armazenar energia na forma de glicogênio (JAMES, et. al., 2006; FUKUDA et. al., 2009).

### 1.2 ENZIMAS

Enzimas são proteínas constituídas por longas cadeias de aminoácidos, sendo unidos por ligações peptídicas em uma sequência geneticamente determinada. Devido aos grandes avanços do isolamento e identificação de novas enzimas, em 1956 a União Internacional de Bioquímica criou uma Comissão Internacional de Enzimas para estabelecer critérios para a sua nomenclatura e a classificação, a fim de evitar a nomenclatura aleatória de uma mesma enzima estudada por diferentes pesquisadores. As enzimas foram divididas em seis classes, de acordo com o tipo de reação por elas realizada (ENZIMAS CATALIZADORAS DE REAÇÕES, 2006).

### 1.3 OXIDORREDUTASES

Oxidoredutases são enzimas que oxidam ou reduzem substratos pela transferência de hidrogênio ou elétrons (ALICE, 2008) e podem ser divididas em três subgrupos. Dentre estes, as álcool desidrogenases são as responsáveis pela catálise da redução de diversos

substratos orgânicos em seus derivados, já as mono-oxigenases transformam substratos por reações de oxidação (KEPPLER, 2005).

Estas enzimas somente atuam com o auxílio de substâncias de caráter não proteico denominadas coenzimas, sendo a Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD) na sua forma oxidada (NAD<sup>+</sup>) e na sua forma reduzida (NADH) a principal. Estas substâncias são encontradas nas células de todos os seres vivos e funcionam de maneira geral como transportadores de elétrons, que são produzidos em diversas reações enzimáticas de um organismo vivo. As enzimas e coenzimas atuam conjuntamente para catalisar as reações, onde a coenzima e o substrato se ligam à enzima e após o substrato ser reduzido e a coenzima oxidada, todos se dissociam da enzima (MATSUDA et al., 2009; CAMPBELL e FARRELL, 2011).

#### 1.4 LIPASES

As lipases são biocatalisadoras que têm muitas aplicações, razão pela qual a sua participação no mercado mundial de enzimas industriais cresce de forma significativa. Estima-se que atualmente as lipases apresentam importância industrial comparável a das peptidases. Estas enzimas catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol em glicerol e ácidos graxos livres. Estas enzimas apresentam uma capacidade única de agir apenas na interface óleo/água (RAY, 2015).

Estas enzimas são em sua grande maioria extracelulares sendo facilitado o processo de extração, isolamento e purificação destes compostos. Em geral são encontradas em microorganismos, animais e vegetais, porém em termos industriais, os microorganismos são as fontes preferenciais, pois são geneticamente manipuláveis, apresentam elevadas taxas de reprodução e fácil adaptação ao meio de cultivo (XU, 2000).

Uma das principais aplicações das lipases é na manufatura de alimentos para a obtenção de ácidos graxos livres por hidrólise seletiva dos óleos e gorduras presentes nos alimentos. Dependendo do tamanho da cadeia carbônica e do seu grau de instauração, os alimentos beneficiados por estas enzimas apresentam aroma, sabor e características nutricionais aumentadas. Estas enzimas podem ainda ser utilizadas na indústria farmacêutica, no tratamento de efluentes e na produção de biodiesel (CARVALHO et al., 2003; MEHTA, 2017).

## 1.5 CELULASES

A celulose é um polímero linear, que contém cerca de 15 mil unidade de D-glicose unidas por ligações glicosídicas na forma  $\beta$ -1,4. Estas cadeias individuais estabelecem ligações de hidrogênio o que torna a estrutura rígida. Com o objetivo de degradar este composto, os microorganismos celulolíticos produzem uma mistura de enzimas denominadas celulases. Estas enzimas agem coletivamente e apresentam elevada especificidade para romper as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4. Dependendo do sítio de ação na celulose, as enzimas podem ser divididas em três grandes grupos, as endoglucanases que clivam as ligações internas da fibra celulósica, as exoglucanases que atuam na região externa da celulose e as  $\beta$ -glicosidases que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose. (CASTRO et al., 2010)

As endoglucanases são responsáveis por iniciar a degradação da celulose, estas enzimas hidrolisam de forma aleatória as regiões internas da estrutura amorfa da fibra de celulósica, sendo assim liberados diversos oligossacarídeos de diversos tamanhos (HENRISSAT, 1991).

O grupo das exoglucanases é formado por duas subclasses, a celobiohidrolases I e II que hidrolisam terminais redutores e não redutores respectivamente e a glucano-hidrolase com função semelhante. Por fim, o terceiro e último grupo de enzimas do complexo celulolítico, são as  $\beta$ -glicosidases cuja função é hidrolisar a celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose (ZHANG, 2004).

## 1.6 AMILASE

Os processos industriais do amido envolvem a hidrólise desse polímero. Através desses processos, podem ser obtidos diversos produtos para diferentes fins, alguns deles são xaropes de glicose, maltose, frutose, maltotetrose, dextrinas e ciclodextrinas. Durante muito tempo o amido foi hidrolisado quimicamente, por ação de ácidos. Porém, esse processo gerava subprodutos indesejáveis como furfurais ou compostos coloridos (GOMES et al., 2007).

O processamento enzimático do amido ocorre em altas temperaturas, sendo necessário o uso de enzimas termoestáveis e envolvem dois passos importantes, a liquefação e a sacificação. As  $\alpha$ -amilase de organismos como *Thermococcus aggregans* e *Pirococcus furiosus* produzem pullulanases que atuam a 100°C e 105 °C, respectivamente (VIEILLE e ZEIKUS, 2001).

Os fungos, embora sejam organismos mesófilos, também são bons produtores de amilases termoestáveis que atuam em temperaturas de até 70 °C, alguns exemplos de organismos produtores são o *Neosartorya fischeri*, *Aspergillus fumigatus*, *Mucor sp*, *Monascus sp* KB9, *Acremonium sp* e *Aspergillus niger* (SELVAKUMAR et al., 1998).

### 1.7 METABOLISMO E OSMAC

O conjunto de reações químicas que ocorrem em um organismo vivo é denominado de metabolismo e pode ser dividido em duas classes, as reações que liberam e as que requerem energia que ocorrem de forma simultânea, mas são reguladas de forma independente (NELSON e COX, 2014; MADIGAN, et. al., 2014). As moléculas orgânicas que são utilizadas como nutrientes são os carboidratos, ácidos graxos, proteínas e ácidos nucleicos, por mais que os organismos existentes tenham inúmeras diferenças em sua morfologia e fisiologia, as vias de modificação e síntese desses compostos são as mesmas, salvo algumas exceções (DEWICK, 2009). Por serem consideradas essenciais para a sobrevivência de todos os organismos, essas moléculas agrupam-se no metabolismo primário e podem ser modificadas através de reações como metilação, oxidação, acetilação, fosforilação e outros (BRAKHAGE & SCHROECKH, 2011).

Diferente dos metabólitos primários, os metabólitos secundários não são prioritariamente necessários para o desenvolvimento do organismo, mas participam diretamente nas questões adaptativas das espécies, são moléculas estruturalmente heterogêneas e de baixo peso molecular. Muitos microrganismos conseguem produzir metabólitos secundários em ecossistemas complexos onde há alta competição e interação entre as espécies locais. Logo, esses metabólitos são biossintetizados como sinais químicos para comunicação e isso propicia a defesa do organismo protegendo seu território ou inibindo o crescimento de competidores (JOEL & BHIMBA, 2013).

Isso se dá graças a enorme quantidade de genes localizados em diferentes clusters que são participantes no processo de biossíntese dos metabólitos secundários (BRAKHAGE & SCHROECKH, 2011). Esses clusters são regulados por uma rede complexa de múltiplas proteínas e complexos que respondem a diferentes estímulos ambientais, isso inclui a diferença do nível de carbono e nitrogênio, disponibilidade de luz, pH, temperatura, condições de hipóxia e estímulos derivados de outros organismos, entretanto, as respostas a esses estímulos são variadas de acordo com a espécie de fungo e podem produzir diferentes metabólitos em diferentes condições ambientais (BRAKHAGE, 2012).

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar o potencial enzimático das linhagens bem como induzir uma resposta metabólica e morfológica através da abordagem metodológica OSMAC (One Strain, MAny Compounds).

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE FUNGOS ASSOCIADOS À UMA ESPÉCIE DE BASIDIOMICETO.

O basidiomiceto coletado na Universidade Federal do Amazonas, posteriormente foi conduzido ao laboratório de microbiologia da Universidade do Estado do Amazonas, onde foi lavado com água destilada autoclavada, e logo depois foi fatiado em pedaços menores com auxílio de bisturi, em seguida foi realizada sua assepsia em cabine de fluxo laminar.

Após a assepsia, as diferentes partes do basidiomiceto (auréola, estipe e lamela) foram cortadas em diversos fragmentos de aproximadamente 4x4mm com o auxílio de uma pinça e bisturi. Os fragmentos foram inoculados em duplicata numa matriz do tipo 2x2 em placas de petri com meio batata dextrose ágar (BDA) contendo antibiótico. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave durante 15 minutos a 121°C e 1 atm. Após isto, as placas foram mantidas por 8 dias a 28 °C em incubadora do tipo BOD. Os microrganismos foram repicados conforme seu aparecimento.

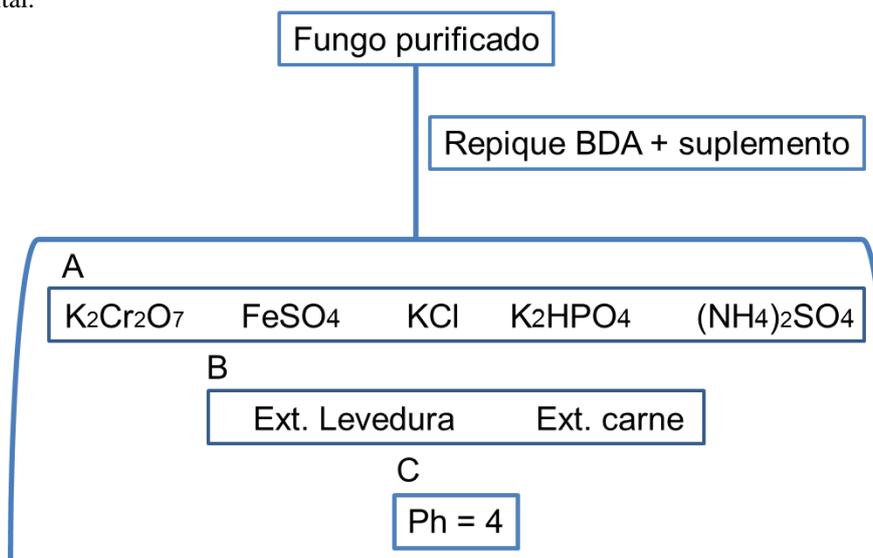
Em certos casos não foi possível observar um grau de pureza satisfatório para determinados fungos, para esses realizou-se o repique tripontual em meio BDA contendo antibiótico.

Posteriormente, foram preparadas lâminas de microcultivo para confirmação de sua pureza em nível microscópico. Em seguida os conídios dos microrganismos foram suspensos em tubos criogênicos estéreis de 2,0 mL contendo 1,5 mL de glicerol a 20%. As cepas obtidas foram mantidas em geladeira a 3 °C.

### 2.2 CULTIVO EM DIFERENTES MEIOS

O trabalho foi realizado utilizando a metodologia OSMAC (*One-strain, many compounds*) os fungos foram repicados em meio BDA contendo diferentes nutrientes conforme esquema apresentado na Figura 1. O controle de cada experimento foi a placa sem adição de nutriente algum. Os meios de cultivo utilizados foram devidamente esterilizados em autoclave durante 15 minutos a 121°C e 1 atm.

Figura 1: Esquema de experimento OSMAC. A: sais inorgânicos (0,5 g/L); B: fontes de aminoácidos (4 g/L) e C: diferente condição experimental.



Fonte: O autor

As placas foram incubadas em BOD a 28 °C por sete dias. Durante esse tempo foi possível observar se ocorreu alguma influência dos nutrientes no metabolismo dos fungos cultivados. O experimento foi realizado em duplicata.

Após sete dias, as cepas de cada organismo foram comparadas morfológicamente, sendo suas características macroscópicas (pigmentação do meio de cultura e aparência do micélio) registradas em fotos.

## 2.3 POTENCIAL ENZIMÁTICO

### 2.3.1 Atividade de álcool desidrogenase (ADH)

O meio de cultura utilizado na prospecção da atividade de ADH foi o proposto por Ribeiro *et al.* (2013). Foram dissolvidos 50 mg de fucsina básica em um litro de meio BDA que foi esterilizado em autoclave durante 15 minutos a 121°C e 1 atm. Em seguida o meio foi vertido em placas de *petri* estéreis e armazenado em geladeira até o dia do teste. Neste ensaio, o piruvato formado no metabolismo da glicose, segue para a rota da fermentação alcoólica produzindo o acetaldeído, que logo em seguida é reduzido a etanol pela ação da ADH.

A fucsina básica reage com o acetaldeído, ocasionando sua redução a álcool promovida pela ADH (Figura 8) mudando a coloração das colônias do fungo para rósea (WU *et al.*, 2007). A alteração na cor do micélio evidencia a presença da enzima.

### 2.3.2 Atividade de lipase em meio sólido

Para a detecção da atividade lipolítica, utilizou-se o meio de cultura contendo peptona (10g/L), cloreto de sódio (5g/L), cloreto de cálcio dihidratado (0,1g/L), ágar (20g/L) e *Tween* 20 (0,1mL/L). O meio foi esterilizado em autoclave durante 15 minutos a 121°C, 1 atm e em seguida foi distribuído em placas de petri. Após a solidificação foram inoculados um fragmento de 0,8 cm, aproximadamente. As placas foram incubadas em BOD a 28 °C por sete dias. O aparecimento de um halo em torno do fragmento, evidencia a presença da enzima. O experimento foi realizado em duplicata (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975).

### 2.3.3 Atividade de CMCase em meio sólido

Para a detecção de endocelulase, utilizou-se o meio de cultura contendo ágar (18g/L), carboximetilcelulose (10g/L) e acetato de sódio 0,1 M, pH 5 (SANTOS et. al, 2013). Os processos seguintes foram os mesmos citados acima no item 2.3.2.

### 2.3.4 Atividade de amilase em meio sólido

Para a detecção da amilase, utilizou-se o meio de cultura contendo ágar (18g/L), amido solúvel (10g/L) e tampão citrato fosfato de sódio 0,1 M, pH 5 (SANTOS et. al, 2013). Os processos seguintes foram os mesmos citados acima no item 2.3.2.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 DIVERSIDADE DE FUNGOS E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Verificou-se a presença de três fungos associados à espécie de Basidiomiceto, sendo dois *Penicillium spp* obtidos da auréola, com características macromorfológicas diferentes, um *Aspergillus sp.* obtido da lamela, além do próprio basidiomiceto isolado da auréola e da lamela (Quadro 1). A partir disto, foram realizados testes de comportamento morfológico cultivando as cepas em meios contendo diferentes xenobióticos além de verificar o seu possível potencial enzimático usando meios seletivos. Os resultados para esta etapa estão descritos no item 3.2.

Quadro 1: Diversidade de fungos obtidos.

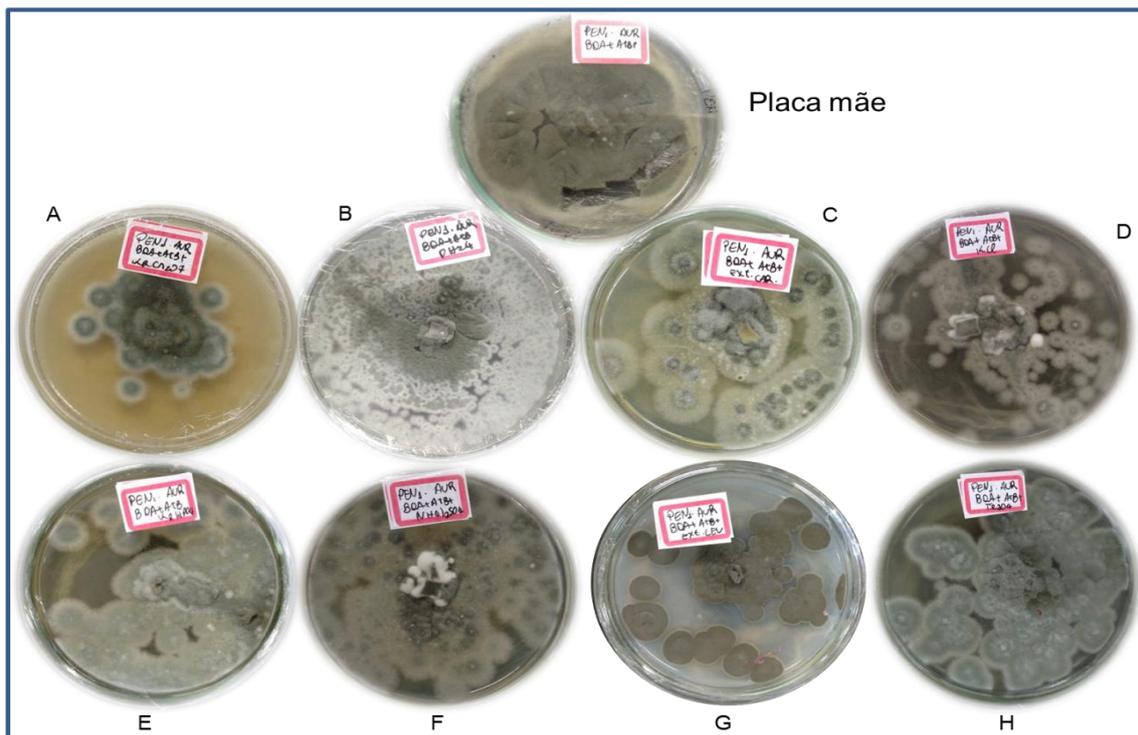
| Fungo                    | Origem  | Foto  |
|--------------------------|---------|---|
| Basidiomiceto 1          | Auréola |    |
| Basidiomiceto 2          | Lamela  |    |
| <i>Penicillium sp. 1</i> | Auréola |   |
| <i>Penicillium sp. 2</i> | Auréola |  |
| <i>Aspergillus sp.</i>   | Lamela  |  |

Fonte: o autor

### 3.2 CULTIVO FRENTE A DIFERENTES XENOBIÓTICOS

O resultado do cultivo de 14 dias do *Penicillium sp. 1* em meio BDA contendo antibiótico e suplementado com diferentes xenobióticos, fontes de aminoácidos e pH está apresentado na Figura 2.

Figura 2: Cultivo do *Penicillium* sp. 1. A:  $K_2Cr_2O_7$ , B: pH=4, C: extrato de carne, D: KCl, E:  $K_2HPO_4$ , F:  $(NH_4)_2PO_4$ , G: Extrato de levedura e H:  $FeSO_4$ .

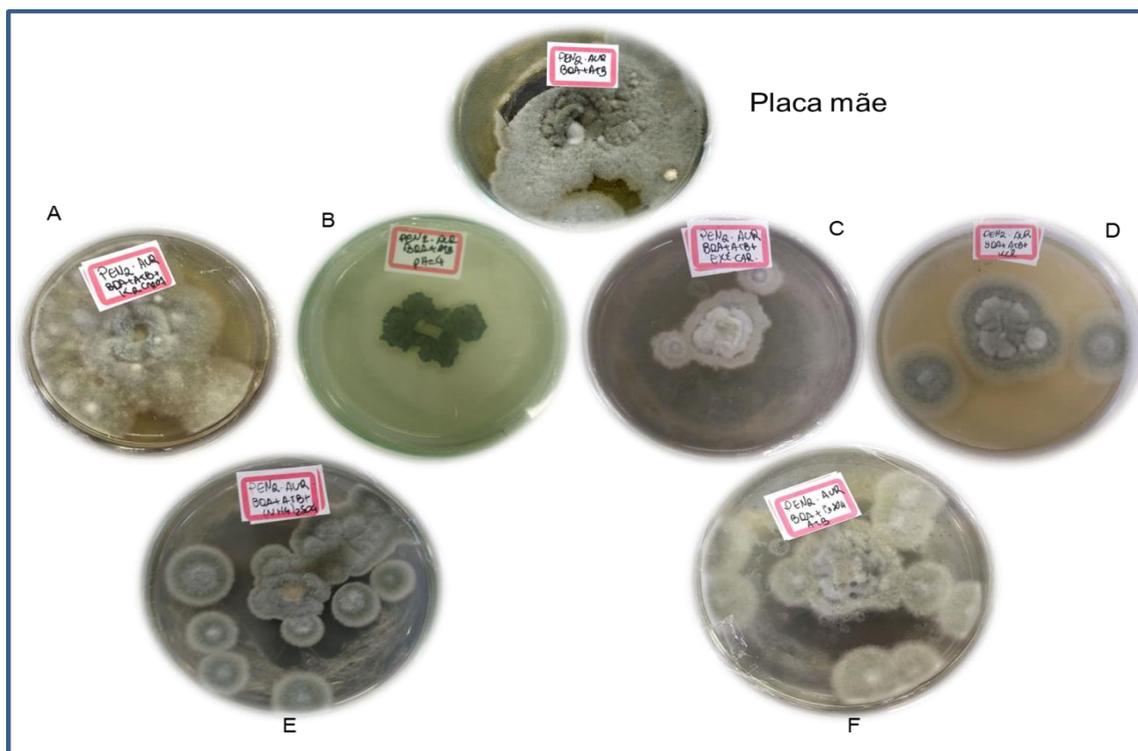


Fonte: O autor

Dos cultivos realizados, pode-se observar uma mudança na morfologia do fungo em todos os cultivos exceto em G, onde utilizou-se o extrato de levedura como suplemento. Através deste experimento, foi possível verificar o potencial deste fungo para estudo de OSMAC, pois de oito condições de cultivo, sete provocaram mudanças em sua morfologia. Em trabalhos como este, um dos objetivos é o de se obter novas moléculas com potencial farmacológico como realizado por Fill *et al.*, (2016).

O resultado do cultivo de 14 dias do *Penicillium* sp. 2 em meio BDA contendo antibiótico e suplementado com diferentes xenobióticos, fontes de aminoácidos e pH está apresentado na Figura 3.

Figura 3: Cultivo do *Penicillium* sp. 1. A:  $K_2Cr_2O_7$ , B: pH=4, C: extrato de carne, D: KCl, E:  $K_2HPO_4$ , F:  $(NH_4)_2PO_4$ , G: Extrato de levedura e H:  $FeSO_4$ .



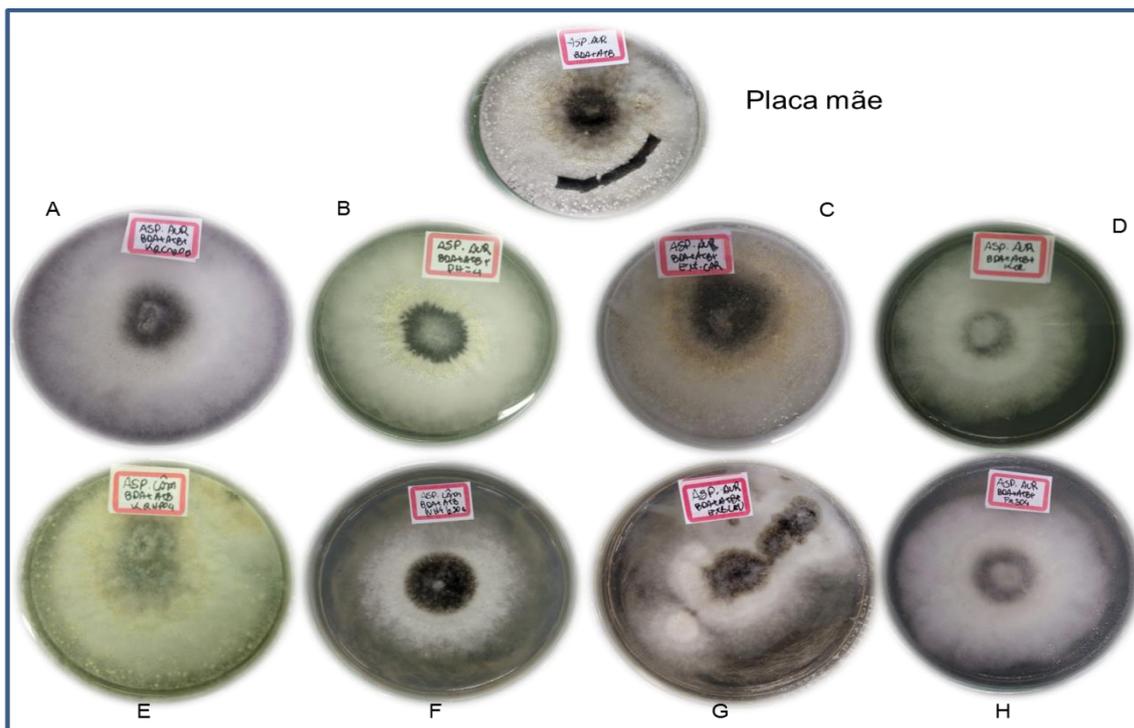
Fonte: O autor

Dos cultivos realizados, pode-se observar uma mudança na morfologia do fungo em todos os cultivos, porém podem ser destacados os experimentos B, C e D que além da mudança na morfologia houve ainda uma limitação no seu crescimento dentro do tempo estipulado no experimento. Através deste, foi possível verificar um elevado potencial deste fungo para estudos envolvendo a metodologia OSMAC.

No trabalho realizado por Meng *et al.*, (2017), realizou-se o cultivo do fungo *Penicillium brocae* em meios contendo diferentes xenobióticos. Obtiveram-se novos alcaloides com atividade contra os fungos *Alternaria brassicae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium graminearum*, e *F. oxysporum*.

O resultado do cultivo de 14 dias do *Aspergillus sp.* em meio BDA contendo antibiótico e suplementado com diferentes xenobióticos, fontes de aminoácidos e pH está apresentado na Figura 4.

Figura 1: Cultivo do *Aspergillus* sp. A:  $K_2Cr_2O_7$ , B: pH=4, C: extrato de carne, D: KCl, E:  $K_2HPO_4$ , F:  $(NH_4)_2PO_4$ , G: Extrato de levedura e H:  $FeSO_4$ .



Fonte: o autor

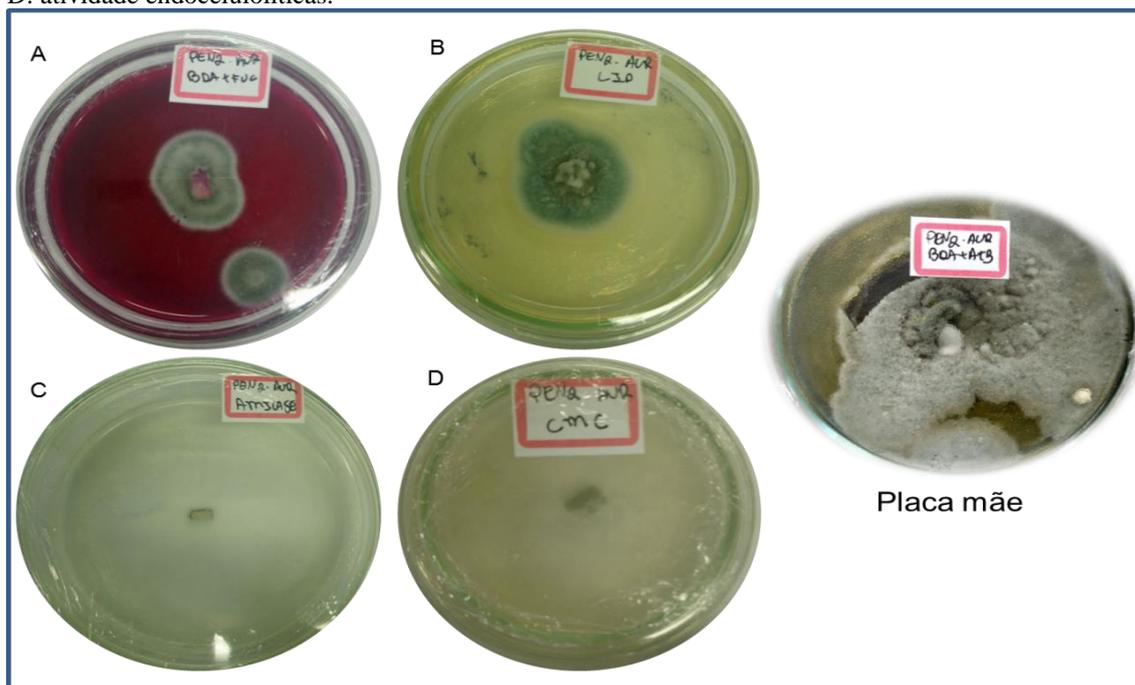
Dos cultivos realizados, pode-se observar uma leve mudança na morfologia do fungo nos diversos meios de cultivo. Em um recente estudo realizado por Lima *et al.* (2018) cultivou-se o fungo *Aspergillus sydowii* em meios contendo diferentes açúcares e aminoácidos obtendo-se moléculas que podem ser utilizadas no tratamento do Alzheimer.

Para os modelos de OSMAC utilizados neste trabalho, os basidiomicetos testados não apresentaram mudança em sua morfologia mesmo após os 14 dias de cultivo. Tais fungos são amplamente utilizados para a produção de enzimas celulolíticas e lignocelulolíticas (Cunha, 2014).

### 3.3 POTENCIAL ENZIMÁTICO

O resultado do cultivo de 14 dias do *Penicillium* sp. 1 em meios de cultura seletivos para as enzimas álcool desidrogenase, lipase, amilase e celulase, estão apresentados na Figura 5.

Figura 5: Cultivo do *Penicillium sp. 1*. A: atividade redutora, B: atividade lipolítica, C: detecção de amilase, D: atividade endocelulolíticas.



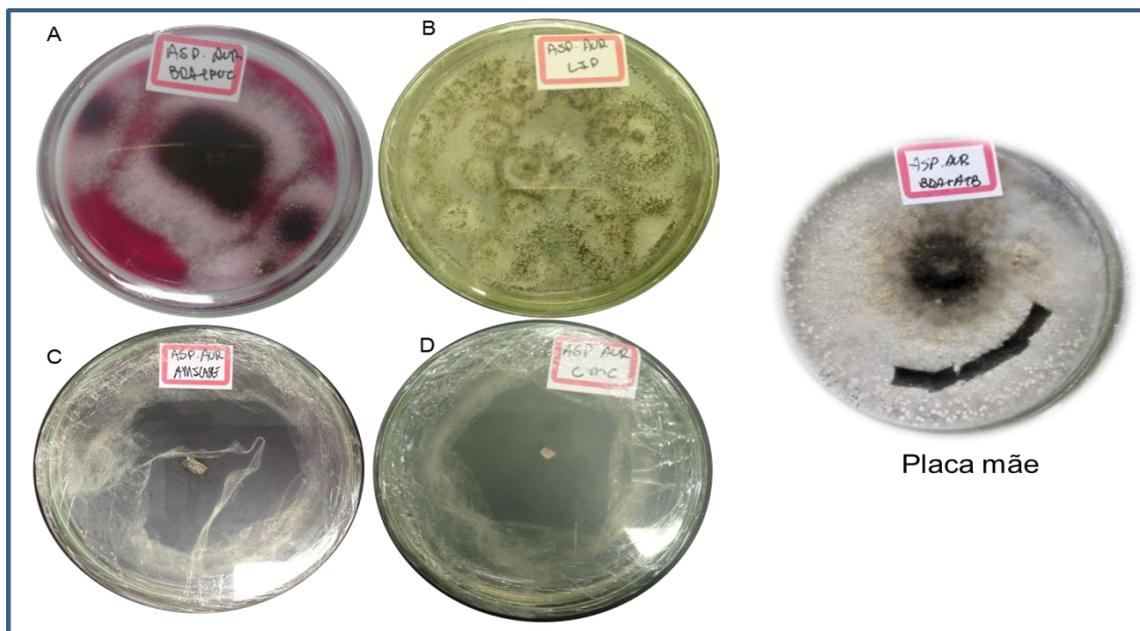
Fonte: O autor

Dos cultivos em meio seletivo realizados, pode-se observar que o fungo *Penicillium sp. 1* apresentou apenas atividade lipolítica devido a presença de um halo claro em torno da colônia ou incorporação do mesmo no micélio (de LIMA et al., 2014). Este tipo de atividade já foi comentada na literatura, como no estudo realizado por Rodrigues *et al.* (2015).

O fungo *Penicillium sp. 1* não apresentou atividade para a enzima álcool desidrogenase. Além disso, o fungo não foi capaz de degradar os substratos amido e celulose. O *Penicillium sp. 2* apresentou os mesmos resultados.

Os resultados enzimáticos qualitativos do *Aspergillus sp.* estão apresentados na Figura 6.

Figura 6: Cultivo do *Aspergillus sp.* A: atividade redutora, B: atividade lipolítica, C: detecção de amilase, D: atividade endocelulolíticas.



Fonte: O autor

Observou-se que o fungo *Aspergillus sp.* apresentou atividade redutora devido a incorporação de fucsina ao micélio (RIBEIRO *et al.*, 2013) e lipolítica devido a presença de um halo claro em torno da colônia ou incorporação do mesmo no micélio (de LIMA *et al.*, 2014). De acordo com a literatura, os fungos do gênero *Aspergillus sp.* produzem enzimas de interesse industrial como lipases, xilanases e endoglucanases (ORLANDELLI *et al.*, 2012).

Tão importantes quando as lipases, as enzimas álcool desidrogenases são enzimas utilizadas em biocatálise ou biotransformação, esta ferramenta visa a obtenção de compostos quirais ou blocos de construção de fármacos quirais (LIMA, 1997; BARREIRO *et al.*, 1997; RIBEIRO *et al.*, 2013).

Os resultados enzimáticos qualitativos do Basidiomicetos 1 e 2 foram semelhantes e estão apresentados na Figura 7 e Figura 8.

Figura 7: Cultivo do Basidimiceto1. A: atividade redutora, B: atividade lipolitica, C: detecção de amilase, D: atividade endocelulolíticas.

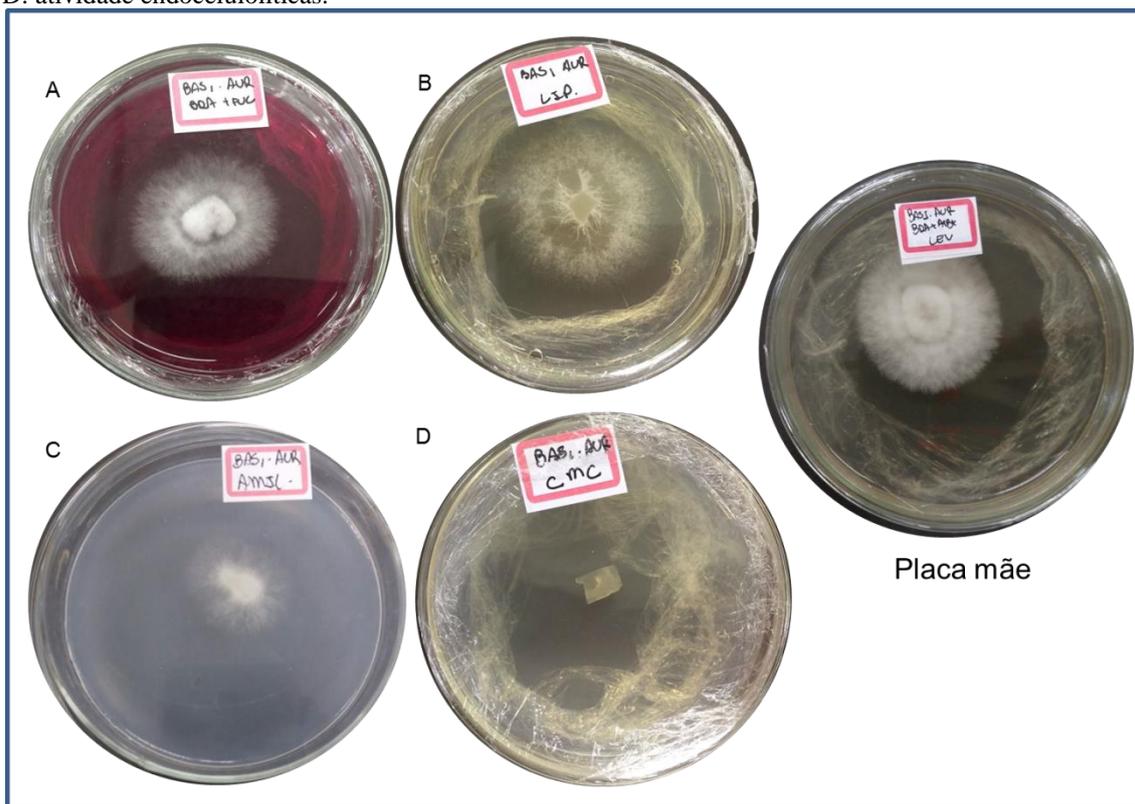
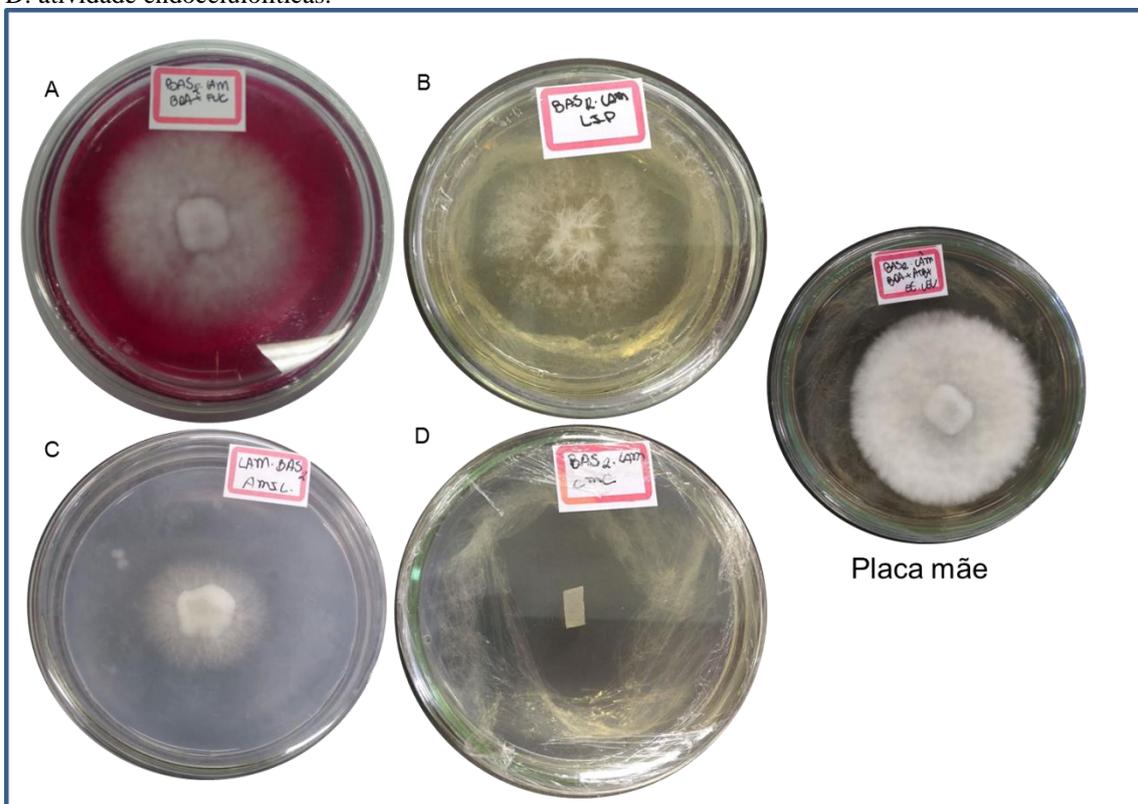


Figura 2: Cultivo do Basidimiceto1. A: atividade redutora, B: atividade lipolitica, C: detecção de amilase, D: atividade endocelulolíticas.



Observou-se que ambos os Basidiomicetos apresentaram atividade para as enzimas lipase e amilase. Mesmo crescendo no meio seletivo para álcool desidrogenase, a fucsina não foi incorporada ao micélio, fato esse comprovado pela falta de mudança na cor da colônia.

Em estudo realizado por Paludo *et al* (2017), foram avaliadas onze linhagens de basidiomicetos com potencial para a produção de amilase, todas foram capazes de degradar o amido, porém o fungo *Coprinus comatus* teve destaque por degradar 91% do substrato em 96 horas. Tal estudo corrobora com os resultados obtidos no presente trabalho.

A literatura reporta poucos trabalhos sobre a prospecção de lipases produzidas por basidiomicetos, mas o trabalho realizado por Gama *et al.*, (2011) avaliou 17 linhagens de basídios para a produção de lipases, destas somente duas apresentaram resultado positivo, porém pouco expressivo.

#### 4 CONCLUSÃO

Através do presente estudo, foi possível observar que o fungo *Aspergillus sp.* foi capaz de produzir álcool desidrogenase e lipase. Já os dois fungos do gênero *Penicillium sp* foram capazes apenas de produzir lipases. Os basidiomicetos foram capazes de produzir as enzimas lipase e amilase.

Em relação ao teste de OSMAC, as cepas que apresentaram alterações morfológicas mais aparentes foram as duas linhagens de *Penicillium* e o *Aspergillus sp.* mostrando portando o potencial da técnica OSMAC para estudo de obtenção de novas moléculas.

## REFERÊNCIAS

- ALICE, M. Z. C. Tecnologia Enzimática. Rio de Janeiro: **EPUB**, 2008.
- BRAKHAGE, A & SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites: strategies to activate silent gene clusters. **Elsevier Science**. Vol 48, 2011.
- BRAKHAGE, A.A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature Reviews Microbiology**. Vol10. n.1, 2012.
- CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O.; Bioquímica: Combo, **Cengage learning**, São Paulo, 2011.
- CARVALHO, P. de O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D'ADDIO.; de OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; da SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados. **Química Nova**, Vol. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.
- CUNHA, L. R. de F. **Avaliação da biodegradação de copos descartáveis de polipropileno (pp) e produção de enzimas celulolíticas e ligninolíticas por *psilocybe castanella* (ccibt 2781) na fermentação semissólida**. 2014.
- Dissertação de mestrado em Engenharia de Bioprocessos. Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, 2014. de CASTRO, A. M.; Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, Vol. 33, n.1, p. 181-188, 2010.
- OLIVEIRA Jr, S. D.; FILHO, P. F. de S.; MACEDO, G. R.; dos SANTOS, E. S.; ASSIS, C. F. Produção de enzimas pelo fungo *penicillium chrysogenum* um fungo isolado da casca do coco (*Aspergillus fumigatus*) em fss utilizando resíduo de coco como substrato. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 2014.
- DEWICK, P.M. **Medicinal Nature Products: a biosynthetic approach**. 3ª Edição. Editora John Wiley & Sons, 2009. p. 7-11.
- ENZIMAS CATALISADORAS DE REAÇÕES BIOLÓGICAS. São Paulo: FUNCIONAIS & NUTRACÊUTICOS. 2006. Disponível em: <[http://www.insumos.com.br/funcionais\\_e\\_nutraceuticos/materias/86.pdf](http://www.insumos.com.br/funcionais_e_nutraceuticos/materias/86.pdf)> Acesso em: 08 de nov. 2015.
- FILL, T. P.; PALLINI, H. F.; AMARAL, L. da S.; da SAILVA, J. V.; BIDÓIA, D.; PERON, F.; GARCIA, F. P.; NAKAMURA, C. V.; FILHO-RODRIGUES, E. Copper and Manganese Cations Alter Secondary Metabolism in the Fungus *Penicillium brasilianum*. **Journal of Brazilian Chemical Society**. Vol. 27. n. 8, p. 1444-1451, 2016.
- FUKUDA, E.K; VASCONCELOS, A.F.D; MATIAS, A.C; BARBOSA, A.M; DEKKER, R.F.H; SILVA, M.L.C. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. **Sem. Ciências Agrárias**. V.30. nº1, 2009.

GAMA, W. S.; RAMOS, T. C.; ALVAREZ, H. M.; LUCCHESI, A. M. Seleção de fungos basidiomicetos isolados do semiáridobaiano secretores de enzimas lipolíticas, 2011.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemistry Journal**. Vol. 280, p. 309-316, 1991.

JAMES, Y.T; KAUFF, F; SCHOCH, C.L; MATHENY, P.B; HOFSTETTER, V; COX, C.J; CELIO, G; GUEIDAN, C; FRAKER, E; MIADLIKOWSKA, J; LUMBSCH, T; RAUHUT, A; REEB, V; ARNOLD, A; AMTOFT, A; STAJICH, J.E; HOSAKA, K; SUNG, G.H; JOHNSON, D; ROURKE, B; CROCKETT, M; BLINDER, M; CURTIS, J.M; SLOT, J.C; WANG, Z; WILSON, A.W; SCHÜBLER, A; LONGCORE, J.E; O'DONNELL, K; STANDRIDGE, S.M; PORTER, D; LETCHER, P.M; POWELL, M.J; TAYLOR, J.W; WHITE, M.M; GRIFFITH, G.W; DAVIES, D.R; HUMBER, R.A; MORTON, J.B; SUGIYAMA, J; ROSSMAN, A.Y; ROGERS, J.D; PFISTER, D.H; HEWITT, D; HANSEN, K; HAMBLETON, S; SHOEMAKER, R.A; KOHLMAYER, J; VOLKMANN-KOHLMEYER, B; SPOTTS, R.A; SERDANI, M; CROUS, P.W; HUGHES, K.W; MATSUURA, K; LANGER, E; LANGER, G; UNTEREINER, W.A; LÜCKING, R; BÜDEL, B; GEISER, D.M; APTROOT, A; DIEDERICH, P; SCHMITT, I; SCHULTZ, M; YAHR, R; HIBBETT, D.S; LUTZONI, F; MCLAUGHLIN, D.J; SPATAORA, J.W; VILGALYS, R. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. **Nature**. Vol 443, 2006.

JOEL, E.L; BHIMBA, B.V. Biological activity of secondary metabolites isolated from mangrove fungi *Neurospora crassa*. **Journal of Environmental Biology**. Vol.34.n.4, 2013.

KEPPLER, A. F. **Biotransformação de cetonas aromáticas e cíclicas promovidas por fungos**. 2005. 76 p. Dissertação de mestrado em química. Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2005.

LI, J; GU, F; WU, R; YANG, J; ZHANG, K. Phylogenomic evolutionary surveys of subtilase superfamily genes in Fungi. **Scientific Reports by Nature**, 2017.

LIMA, G. da S.; da ROCHA, A. M.; dos SANTOS, G. F.; D'SILVA A. F.; MARRIEL, I. E.; TAKAHASHI, J. A. Metabolic response of *Aspergillus sydowii* to OSMAC modulation produces acetylcholinesterase inhibitors. **Phytochemistry Letters**. Vol. 24, p. 39-45, 2018.

MADIGAN, M.T; MARTINKO, J.M; BENDER, K.S; BUCKLEY, D.H; STAHL, D.A. **Microbiologia de Brock**. Edição 14. Porto Alegre, Artmed, 2016.

MATSUDA, R.; YAMANAKA R.; NAKAMURA K.; Recent progress in biocatalysis dorasymmetric oxidation and reduction. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, n° 108, p. 513 –557. 2009.

MEHTA, A.; BODH, U.; GUPTA, R. Fungal lipases: a review. **Journal of Biotech Research**. Vol. 8, n. 58-77, 2017.

MENG, L.H.; LI, XIAO-MING; LIU, Y.; XU, GANG-MING, WANG, BIN-GUI. Antimicrobial alkaloids produced by the mangrove endophyte *Penicillium brocae* MA-231 using the OSMAC approach†. **The Royal Society of Chemistry**. Vol. 7, p. 55026-55033, 2017.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FALBER, A. C.; PAMPHILE, L. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **Revista de Saúde e Biologia**. v. 7, n. 3, p. 97-109, 2012.

PALUDO, L. C.; JUNIOR, R. A.; DANTAS, T. L. P.; SPIER, M. R.; FRANTZ, S. C.; SANTA, H. S. D. Seleção de basidiomicetos produtores de amilases e aumento da produção por screening design em cultivo submerso. **XIV Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2017.

RAVEN, P. H.; EVERT, R.F; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 5º edição. Editora: Guanabara Dois, Washington DC, p. 196-210, 1976.

RAY, S.; Application of extracellular microbial lipase- a review. **International Journal of Research Biochemistry and Biotechnology**. Vol. 5, n. 1, p. 6-12, 2015.

RODRIGUES, M. L. F.; da SILVA, E. A.; BORBA, C. E.; OLIVEIRA, C. D.; KRUGER, C.; RAIMUNDO, R. 2.; SILVA, L. P.; RODRIQUES, M. L. F.; STUANI, B. T. Produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo endofítico *Penicillium sp.* isolado das folhas de *Ricinus communis L.* **Revista brasileira de energias renováveis**. Vol. 4, p. 129-145, 2015.

SELVAKUMAR, P.; ASHAKUMARY, A.; PANDEY, A. Biosynthesis of glucoamylase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using tea waste as the basis of a solid substrate. **Bioresource Technology**. Vol. 85, p. 65-83, 1998.

SILVA, R. R.; COELHO, G.D. Fungos: principais grupos e aplicações biotecnológicas. **IBT – Instituto de Botânica**, 2006.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. Vol. 65, n. 1, 2001.

XU, X.; Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. **European Journal of Lipid Science na Technology**. Vol. 102, n. 287, 2000.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplex cellulose systems. **Biotechnology and Bioengineering**, Vol. 88, p. 797-824, 2004.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; da SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química nova**. Vol. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.