

CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA QUALITATIVA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. Convolvulaceae (SALSA DA PRAIA)

Thalita pedon de Araujo¹, Janete Magali de Araújo² e Ivana Gláucia Barroso Cunha³

CHARACTERIZATION OF THE ENZYMATIC ACTIVITY OF ISOLATED ENDOPHYTES *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br Convolvulaceae (SALSA THE BEACH)

Endereço dos autores:

1. Faculdade Pernambucana de Saúde. E-mail: thalitapedon@hotmail.com.

2. Universidade Federal de Pernambuco. E-mail: janetemagali@yahoo.com.br

3. Faculdade Pernambucana de saúde. E-mail: glau_iv@yahoo.com.br

RESUMO

O estudo avaliou se fungos endofíticos isolados da salsa-da-praia possuem atividade enzimática. Os testes de atividade enzimática foram realizados através da avaliação hidrolítica em meio sólido para verificar a produção de celulases, amilases, proteases, lipases, xilanases e quitinases para 69 fungos endofíticos, sendo 20 isolados em meio não salino e 49 isolados em meio salino. Dos 20 fungos endofíticos isolados em meio não salino, 8 (40%) produzem enzimas amilase, celulase e lipase. Entre os endófitos testados, *Nigrospora sphaerica* apresentou maior área de degradação para amilase (610.53 mm²), celulase (678.24 mm²) e lípase (816.4 mm²). Já dos 49 fungos endofíticos isolados em meio salino, 22 (44,89%) produzem enzimas de interesse industrial. Destes 22 endófitos testados a maioria apresentou área de degradação para protease, seguida de amilase e lípase. Entre estes, o endófito 3R3/5 apresentou área de degradação para amilase, protease e celulase nos valores de (1448.86, 854.1 e 1884) mm² respectivamente. A avaliação da produção de enzimas por micro-organismos constitui uma característica importante que tem ampla aplicação no processamento de alimentos, na fabricação de detergentes e, também nas indústrias farmacêuticas e têxteis.

Palavras - chave: endofítico, enzimas, micro-organismos, atividade, fungos.

ABSTRACT

The study evaluated whether endophytic fungi isolated from salsa-the-beach have enzymatic activity. Enzymatic activity tests were performed by assessing hydrolytic solid medium to check the production of cellulases, amylases, proteases, lipases, chitinases and xylanases for 69 endophytic fungi, 20 isolates in a non-saline and 49 isolated in saline. Of the 20 isolated endophytic fungi in a non-saline, 8 (40%) yield amylase, cellulase and lipase. Among the endophytes tested *Nigrospora Sphaerica* showed greater area for amylase degradation (610.53 mm²), cellulase (678.24 mm²) and lipase (816.4 mm²). Already the 49 endophytic fungi isolated in saline, 22 (44.89%) produce enzymes of industrial interest. Of these 22 most endophytes tested area presented to protease degradation, followed by amylase and lipase. Among these, the endophyte 3R3 / 5 area presented to degradation amylase, protease and cellulase in values (1448.86, 854.1 and 1884) mm² respectively. The production of enzymes by micro-organisms is an important feature which has wide application in the food processing, the manufacture of detergents and also in pharmaceutical and textiles.

Key- words: endophytic, enzymes, micro-organisms, activity, fungi.

INTRODUÇÃO

Micro-organismos, vegetais e, em menor escala, animais apresentam um arsenal metabólico capaz de produzir, transformar e acumular inúmeras substâncias não relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo produtor. Como consequência de seu papel biológico, esses metabólitos podem exibir amplo espectro de atividades biológicas^{1,2}.

Evolutivamente as plantas vêm desenvolvendo complexos mecanismos adaptativos, muitos destes somente possíveis, graças às interações com os micro-organismos. Destes micro-organismos destacam-se os endofíticos. Eles são geralmente fungos e bactérias que habitam o interior das plantas e desempenham funções importantes no processo de adaptação do vegetal ao meio^{3,4}.

Os micro-organismos apresentam características peculiares que os conferem adaptação e sobrevivência em ambientes considerados hostis, desempenhando papel fundamental na manutenção de ecossistemas⁵.

Os estudos de fungos endofíticos são de grande importância científica, por sua aplicabilidade em estudos na prospecção de novas substâncias como os novos antimicrobianos, no controle de pragas, indicação de deficiências nutricionais de plantas, contribui como fonte de diversidade, variabilidade para os outros fungos, inibidores de enzimas e pigmentos, entre outras aplicações⁶⁻¹².

Os endofíticos foram descritos pela primeira vez por Bary , porém durante mais de um século eles foram quase que ignorados. No final dos anos 70 do século XX, confirmou-se então a hipótese de que estes micro-organismos vivem em uma interação mutualística na qual produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens às plantas tais como: a diminuição da herbivoria e do ataque de insetos, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros micro-organismos^{13,14}.

Os metabólitos bioativos produzidos por endofíticos têm mostrado capacidade de inibir ou matar uma ampla variedade de fitopatógenos. Apresentam ainda, ação antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral e atuam como agentes antidiabéticos e imunossupressores, evidenciando sua importância para a indústria farmacêutica¹⁵. Os fungos vêm sendo amplamente utilizados na produção de substâncias de interesse econômico, como as enzimas¹⁶.

As enzimas são catalisadores de reações químicas, envolvendo reações com substratos orgânicos e inorgânicos e geralmente são de natureza proteica, altamente específicas e apresentam grande poder catalítico¹⁷.

O estudo da produção de enzimas extracelulares por estes micro-organismos é muito importante na área da biotecnologia aplicada. Entre as enzimas extracelulares produzidas por fungos filamentosos, as lignases, celulasas, proteases, lipases e muitas outras são de grande importância em termos ambientais de remediação, um processo em que os sistemas biológicos são utilizados para degradar ou neutralizar poluentes, tais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Além disso, estas enzimas têm aplicações potenciais em um grande número de campos, incluindo as indústrias químicas, de combustíveis, de alimentos, agrícolas, têxteis, de papel e de cosméticos¹⁸.

As propriedades hidrolíticas das enzimas podem favorecer o desenvolvimento de novas tecnologias na indústria gerando processos menos agressivos, economicamente viáveis e ecologicamente aceitáveis¹⁹.

O objetivo deste estudo foi caracterizar a produção de enzimas extracelulares por fungos filamentosos endofíticos para que, micro-organismos com habilidade de produzir enzimas, biotecnologicamente importantes, fossem selecionados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios da atividade enzimática foram realizados de acordo com a metodologia de Neirotti e Azevedo (1988), Hankin et al. (1971), Wood et al. (1988), Anderson (1939) e Fernandes et al. (1999) para avaliação da produção de celulase, amilase, protease, lipase, quitinase e xilanase respectivamente²⁰⁻²⁴.

Os testes de atividade enzimática foram realizados em triplicata para os 69 fungos endofíticos, sendo 20 em meio não salino e 49 isolados em meio salino. Para o crescimento dos fungos, foram adicionados 15 mL de meio de cultura sólido em placa de Petri contendo fonte de carbono específica para cada hidrolise, e a visualização da atividade enzimática foi observada através de reveladores específicos.

Cada meio de cultura foi inoculado com fungos endofíticos de forma pontual, com o auxílio de uma alça de platina em forma de agulha e incubado a 30°C por 4 dias. Em seguida, foi realizada a revelação da atividade enzimática e medido o halo de degradação em milímetros com auxílio de uma régua. Para a quantificação da área total de degradação foi utilizada a seguinte equação $S = \pi(d_h/2)^2 - \pi(d_c/2)^2$ onde:

S= Área da degradação;

d_h = diâmetro do halo;

d_c = diâmetro da colônia

$\pi = 3,14$

Após 4 dias de cultivo a 30°C, as placas de Petri para análise da atividade celulolítica foram colocadas em estufa a 45°C por 16 horas para inibição do crescimento dos fungos endofíticos e seleção de enzimas termoestáveis. A revelação foi realizada com solução de vermelho Congo (0,025%) durante 30 minutos. O corante foi descartado e o excesso foi retirado pela adição de 1 mL de NaCl (0,5 M) e o halo de inibição foi observado como uma área alaranjada ao redor da colônia.

Para a visualização da atividade lipolítica, as placas com o cultivo das colônias, foram refrigeradas a 4°C por 48 horas e após este período foram visualizados cristais de cálcio ao redor da colônia, indicativo da presença de lipase.

As atividades amilolíticas, proteolítica foram avaliadas após 4 dias de cultivo a 30°C. A revelação da atividade amilolítica foi realizada através da coloração com vapor de cristais de iodo, que conferem ao meio de cultura coloração roxa, e o halo hidrolítico e visualizado como uma área incolor transparente circundando a colônia.

A atividade proteolítica foi revelada com a adição de 5 mL de solução saturada de sulfato de amônio, que proporciona ao meio de cultura cor branca – leitosa indicativo da presença de proteínas, enquanto a ação das enzimas proteolíticas foi visualizada como uma área transparente ao redor da colônia.

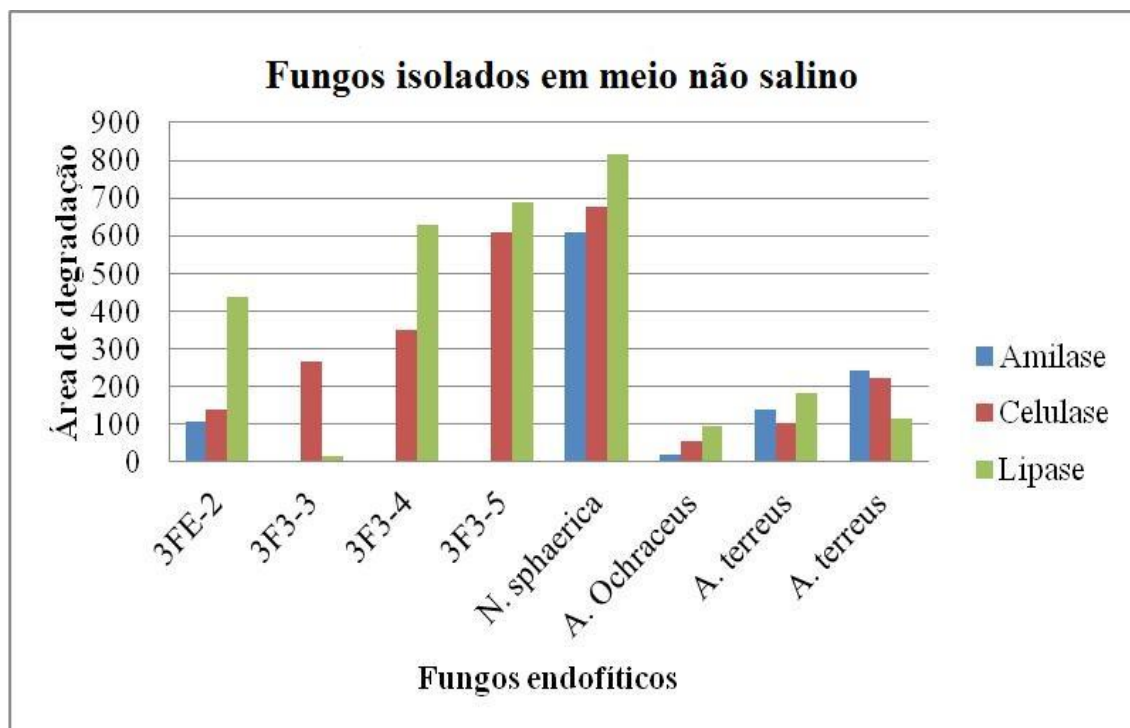
A avaliação das atividades xilanolíticas e quitinolíticas foi realizada com a adição de 5mL de vermelho Congo (0,25%) por 15 minutos. O corante foi descartado e o excesso removido com 10mL de NaCl (1M), sendo ambos os halos visualizados como áreas alaranjadas transparentes ao redor das colônias.

A identificação taxonômica dos fungos endofíticos está sendo realizadas através das observações da macro e micromorfologia no Departamento de Micologia no Laboratório da Coleção de Fungos – URM, Universidade Federal de Pernambuco.

RESULTADOS

Dos 20 fungos endofíticos isolados em meio não salino, 8 (40%) apresentam halo para amilase, celulase e lipase. Entre os endófitos testados, *Nigrospora sphaerica* apresentou maior área de degradação para amilase (610.53 mm²), celulase (678.24 mm²) e lípase (816.4 mm²) com pode ser observado na figura 01.

Figura 1 – Atividade enzimática dos fungos endofíticos isolados da folha, caule e raiz de *Ipomoea*



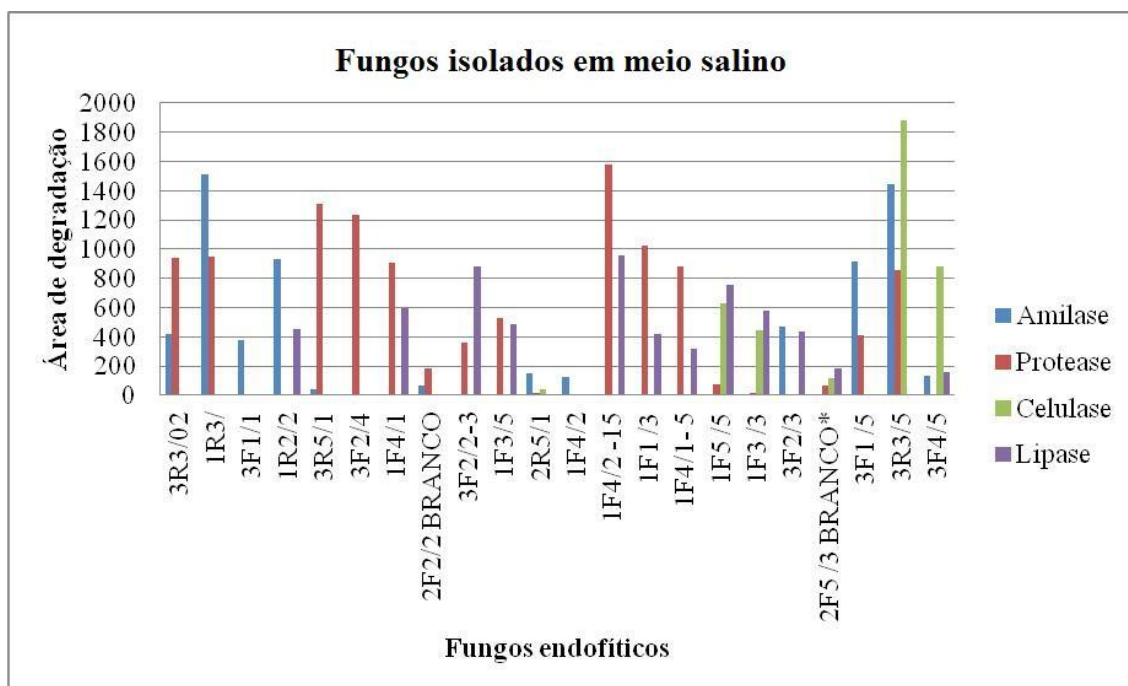
pes-caprae em meio não salino em janeiro de 2011.

Dos 49 fungos endofíticos isolados em meio salino, 22 (44,89%) produzem enzimas de interesse industrial. Destes 22 endófitos testados para atividade enzimática, a maioria apresentou área de degradação para protease, seguida de amilase e lípase.

Os endófitos 3R5/1, 3F2/4, 1F4/2-15, 1F1/3 apresentaram área de degradação proteolítica nos valores de (1314.3, 1236.3, 1575.7, 1020.5) mm² respectivamente (figura 02).

O endófito 3R3/5 apresentou área de degradação para amilase, protease e celulase nos valores de (1448.86, 854.1 e 1884) mm² respectivamente.

Figura 2 – Teste qualitativo enzimática dos fungos endofíticos isolados da folha, caule e raiz de *Ipomoea pes-caprae* em meio não salino em junho de 2011.



Para as enzimas xilanase e quitinase não foram visualizados halos de degradação, tanto em meio salino como em meio não salino.

Os endófitos isolados em meio salino apresentaram maior atividade enzimática do que os isolados em meio não salino. Talvez a utilização dos meios de cultura com água do mar artificial tenha favorecido o metabolismo destes fungos promovendo mais produção de metabólitos secundários *in vitro*. Estes resultados indicam boa atividade enzimática quando comparados com a atividade observada nos fungos endofíticos da planta *Conyza bonariensis* nos quais foram observada área de degradação de 455.88mm² para amilase e de 405.84mm² para lípase e com endófitos de *Eugenia uniflora* L. que apresentaram área de degradação de 1.560mm² 717,8 mm² para celulase e protease respectivamente.

Jaitly (1987); Jones e Alias (1997) relatam que a sobrevivência e adaptação microbiota é influenciada por vários fatores como pH, salinidade, temperatura, quantidade de água e que segundo Fenical e Jensen (1993) este habitat inóspito pode favorecer a produção de metabólitos secundários de interesse para a biotecnologia^{25,26,27}.

A produção de diversas hidrolases produzidas por fungos é citada por Pandey e cols (2000a), por Azevedo e Esposito (2004) onde celulases, proteases, poligalacturonases, lípases e amilases foram obtidas por fermentação em meio sólido utilizando vários fungos filamentosos: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Thermomyces*, *Humicola*,

Mucor e Rhizopus entre outros^{28,29}.

Silva et al.(2006) relatam que fungos endofíticos isolados de *Annona* spp. apresentam atividade enzimática extracelular³⁰.

CONCLUSÕES

- A solução de água do mar artificial foi um fator diferencial na produção enzimática dos fungos utilizados. Desta forma, dentro das condições experimentais desta pesquisa, ocorreu maior diversidade na produção de metabólitos secundários entre os micro-organismos isolados em meio salino.
- Os fungos endofíticos *Nigrospora sphaerica* e 3R3/5 apresentam potencial biotecnológico para a produção de enzimas de grande interesse industrial.
- A caracterização da atividade enzimática de fungos endofíticos constitui uma ferramenta importante na descoberta de novas moléculas bioativas ativas que possuem ampla aplicação nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e têxteis.

AGRADECIMENTOS

A Faculdade Pernambucana de Saúde e a Universidade Federal de Pernambuco que colaboraram com o desenvolvimento dessa pesquisa.

REFERÊNCIAS

- 1- WINK, M. Physiology of secondary product formation in plants. In: CHARLWOOD, B. V.; RHODES, M.J.C. (ed). Secondary products from plant tissue culture, Oxford, Clarendon, 1990.
- 2- PUPO, M. T.; GUIMARÃES, D. O.; FURTADO, N. A. J. C.; BORGES, W. S. **Microbial natural products: a promising source of bioactive compounds.** In: *Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry*. Taft, C. A. Ed. Research Signpost, Kerala. pp. 51-78, 2006.
- 3- NETO, A.S.P.; AZEVEDO, J.L.; CAETANO, L.C. (2004). **Microorganismos endofíticos em plantas: Status atual e perspectivas.** In: *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. **03**: 69-72.
- 4- AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada. Revista Brasileira de Botânica. 22 (supl. 2) : 117, 1999.
- 5- ROZSAK DB & COLWELL RR 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiology Review* 51: 365-379.
- 6- VINING, L.C. Secondary metabolism In: REHM, H.J.; REED, G.(Ed). Biotechnology. Weinheim: VCH. v.4, p 21-29, 1996.
- 7- PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; HYDE, D. Endophyte fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. *Mycology Research*, v. 105, n. 12 p. 1508-1513, 2001.
- 8- KUMARESAN, V.; SURYANARYANAN, T. S. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. *Mycology Research*, v. 105, n. 11, p. 1388-1391, 2001.

- 9- ARAÚJO, W. L. et al. Variability and interactions between endophytic Bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. Canadian Journal Microbiology, Ottawa, v. 47, p. 229-236, 2000.
- 10- VILA-AIUB, M. M.; MARTINEZ-GHERSA, M. A.; GHERSA, C. M. Evolution of herbicide resistance in weeds: vertically transmitted fungal endophytes as genetic entities. Evolutionary Ecology, v. 17, p. 441-456, 2003.
- 11- OTERO, J. T. et al. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia-like* fungi from tropical orchids. American Journal of Botany, v. 89, n. 11, p. 1852-1858, 2002.
- 12- GAMBOA, M. A.; BAYAN, P. Communities of endophytic fungi in leaves of a timber tree (*Guarea guidonia* : meliaceae). Biotropica, v. 33, n. 2, p. 352-360, 2001. NETO, P. A. S. P., AZEVEDO, J. L., ARAÚJO, W. L. Microorganismos endofíticos, Interação com plantas e potencial biotecnológico. Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. 29 : 62, 2002.
- 13- RODRIGUES, A. A. (2009). *Atividade antimicrobiana e produção de enzimas de interesse biotecnológico de bactérias isoladas de diferentes habitats*. Dissertação de mestrado em microbiologia. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – Universidade Federal de Goiás, 04p.
- 14- VIEIRA, P.D.S. (2012). **Primeiro registro de fungos endofíticos em folhas de *Ixoro coccinea* L. em Pernambuco, Brasil.** In: *Revista Brasileira de Biociência*. **10**: 1-4.
- 15- BAPTISTA, N.M.Q.; SANTOS, A.C.; ARRUDA, F.V.F.; GUSMÃO, N.B.; **Produção das enzimas ligninas peroxidases e lacase por fungos filamentosos.** In: *Scientia Plena*. v. 08 pp.1-7, 2012.

- 16- WONG C, Whitesides M 1994. Tetrahedron organic chemistry series. 1a ed. Pergamon, v.12, Enzymes in synthetic organic chemistry.
- 17- SANTOS,R.C.B.;DURRANT,L.R.;SILVA,M.;SETTE,L.D.; **Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi.** In: *Enzyme and Microbial Technology.* pp. 32-37,2010.
- 18- LIMA VLE 1997. Os Fármacos e a Quiralidade uma Breve Abordagem,*Química Nova*, v.20, p.657.
- 19- NETO, P. A. S. P., AZEVEDO, J. L., ARAÚJO, W. L. Micro-organismos endofíticos, Interação com plantas e potencial biotecnológico. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.* 29 : 71, 2002.
- 20- NEIROTTI, E.; AZEVEDO, J. L. **Semiquantitative Method to Evaluate Cellulases Production in *Hemicella* sp.** *Revista de Microbiologia*, 19:78 – 81, 1988.
- 21- HANKIN, L.; ZUCHER, M.; SANDS, D. C. **Improved Solid Medium for Detection and Enumeration of Pectolytic Bacteria.** *Applied Microbiology*, 22:205 – 209, 1971.
- 22- WOOD, P. J.; ERFLE, J. D.; TEATHER, R. M. **Use of Complex Formation Between Congo Red and Polysaccharides Hydrolases in Detection and Assay of Polysaccharide Hydrolases.** *Methods in Enzymology*, 160:59 – 74, 1988.
- 23- ANDERSON, J. A. A. **The Use of Tributyrinase in Dairy Bacteriology.** *Ber. 3 Int. Mikrobiol. Kongress*, 3:726-728, 1939.
- 24- FERNANDES, A. C. G.; FONTES, C. M. G. A.; GILBERT, H. J.; HAZLEWOOD, G. P.; FERNANDES, T. H.; FERREIRA, L. M. A. **Homologous Xylanases from *Clostridium thermocellum*: Evidence for Bi-**

Functional Activity, Synergism Between Xylanase Catalytic Modules and the Presence of Xylan-Binding Domains in Enzyme Complexes.

Biochemical Journal, 342:105-110, 1999.

25- JAITLEY, A. K. pH optima of the fungi isolated from mangrove soils in India. Transactions of the Mycological Society of Japan, n. 28, p. 137-143, 1987.

26- JONES, E.B.G.; ALIAS, S.A. 1997. Biodiversity of Mangrove Fungi. In: Biodiversity of Tropical Microfungi 6: 71 – 92.

27- FENICAL, W.; JENSEN, P.R. Marine micro-organisms: a new biomedical resources, marine biotechnology, v.1: pharmaceutical and bioactive natural products (D.H. Attaway and O. R. Zahorsky eds.) plenum press., New York, p. 419- 458, 1993. Jaitly, A.K.; Rai, J.N. 1982. Thermophilic and thermotolerant fungi isolated from mangroves swamps. Mycologia, 6 (74): 1021 -1022.

28- PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C. R.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. Biotechnol. Appl. Biochem., 31:135-152, 2000c.

29- AZEVEDO. J. L.; ESPOSITO, E. Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Editora da Universidade de Caxias do Sul – EDUCS, p. 510, 2004.

30- SILVA, R. L. DE O.; LUZ, J. S.; DA SILVEIRA, E. B.; E CAVALCANTE, U. M. T Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.) Acta bot. bras. 20(3): 649-655. 2006.

