

**INSTITUTO FEDERAL GOIANO – CAMPUS CERES
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ISABEL THAYSE BARBOSA**

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FUNGOS PRESENTES EM CAULES DE ÁRVORES
FRUTÍFERAS DO CERRADO GOIANO**

**CERES – GO
2019**

ISABEL THAYSE BARBOSA

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FUNGOS PRESENTES EM CAULES DE ÁRVORES
FRUTÍFERAS DO CERRADO GOIANO**

Trabalho de curso apresentado ao curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal Goiano – Campus Ceres, como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas, sob orientação da Prof^a. Dra. Flávia Oliveira Abrão Pessoa.

**CERES – GO
2019**

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

Barbosa, Isabel Thayse

B238a ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FUNGOS PRESENTES EM
CAULES DE ÁRVORES FRUTÍFERAS DO CERRADO GOIANO /

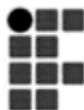
Isabel Thayse Barbosa; orientadora Flávia
Oliveira Abrão Pessoa; co-orientadora Moisés Sena
Pessoa. -- Ceres, 2019.

15 p.

Monografia (em Licenciatura em Ciências
Biológicas) -- Instituto Federal Goiano, Campus
Ceres, 2019.

1. Cepas fúngicas. 2. Pectinase. 3. Protease. I.
Pessoa, Flávia Oliveira Abrão, orient. II. Pessoa,
Moisés Sena, co-orient. III. Título.

Responsável: Johnathan Pereira Alves Diniz - Bibliotecário-Documentalista CRB-1 nº2376



INSTITUTO FEDERAL

Goiano

Repositório Institucional do IF Goiano - RIIF

Goiano

Sistema Integrado de Bibliotecas

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES
TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO**

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese | <input type="checkbox"/> Artigo Científico |
| <input type="checkbox"/> Dissertação | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input checked="" type="checkbox"/> TCC - Graduação | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ | |

Nome Completo do Autor: Isabel Thayse Barbosa

Matrícula: 2016103220510028

Título do Trabalho: Atividade Enzimática De Fungos Presentes Em Caules De Árvores Frutíferas Do Cerrado Goiano

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 10/12/ 2019

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Ceres, 25/11/2019.

Local Data

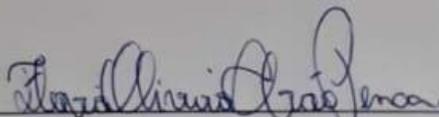
Isabel Thayse Barbosa

Ciente e de acordo:

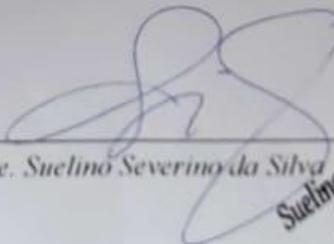
Flávia Oliveira Abrão Pessoa

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CURSO

Ao(s) 22 dia(s) do mês de novembro do ano de dois mil e dozenove, realizou-se a defesa de Trabalho de Curso do(a) acadêmico(a) Isabel Thaysy Barbosa, do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, matrícula 2016103220510022, cujo título é "Atividade enzimática de fungos presentes em caules de anêmonas fúrfíferas do cerrado goiano". A defesa iniciou-se às 8 horas e 23 minutos, finalizando-se às 9 horas e 23 minutos. A banca examinadora considerou o trabalho aprovado com média 9,8 no trabalho escrito, média 10 no trabalho oral, apresentando assim média aritmética final de 9,9 pontos, estando o(a) estudante apto para fins de conclusão do Trabalho de Curso. Após atender às considerações da banca e respeitando o prazo disposto em calendário acadêmico, o(a) estudante deverá fazer a submissão da versão corrigida em formato digital (pdf) no Repositório Institucional do IF Goiano – RIIF, acompanhado do Termo Ciência e Autorização Eletrônico (TCAE), devidamente assinado pelo autor e orientador. Os integrantes da banca examinadora assinam a presente.

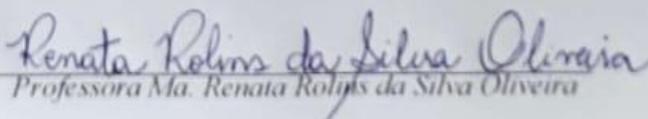


Professora Dra. Flávia Oliveira Abrão Pessoa



Professor Me. Suelmo Severino da Silva

Suelmo Severino da Silva
Professor EBT
SIAPE Nº: 1543733



Professora Ma. Renata Rolins da Silva Oliveira

*Dedico este trabalho aos meus pais. Vocês são minha
inspiração diária de amor, luta e humanidade. Quando crescer
quero ser como vocês!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sustentar-me durante todos os dias.

Aos meus pais, João Gonzaga e Maria Aparecida, por todo amor, compressão e ensinamentos. Amo vocês! Ao meu irmão, João Junior, pela motivação e ajuda. À minha companheira e amiga Karen Beatriz, por todo apoio, carinho e amor.

À minha orientadora e mãe acadêmica, Flávia Oliveira Abrão, pelas oportunidades e ensinamentos. Aprendi muitíssimo em nossa trajetória. Obrigada por todas as oportunidades!

Aos meus parceiros de laboratório e irmãos acadêmicos por todo auxílio na pesquisa, e, pela amizade. A meu amigo Thiago Dias, obrigada por compartilhar seus conhecimentos.

À minha amiga Joice Macedo e ao Rickson Bernardo por toda ajuda. “I miss you”! Ao professor Ribas Antônio por me auxiliar com os pormenores da língua da portuguesa.

Aos membros da banca por aceitarem o convite. As observações de vocês contribuirão muito com o trabalho, bem como para minha formação.

À minha psicóloga, Ana Paula, pela importante escuta terapêutica. Aos amigos/amigas que me ouviram sobre os desafios da faculdade.

RESUMO

O Cerrado é considerado uma das savanas com maior biodiversidade do mundo. Apesar dos estudos que existem voltados para compreender a micologia, poucos são os trabalhos que visam elucidar o perfil enzimático produzido por fungos filamentosos associados ao bioma. O objetivo com esse estudo foi avaliar as atividades proteolítica e pectinolítica de isolados fúngicos oriundos do caule de seis árvores frutíferas: pequi, mangabeira, lobeira, muricizeiro, pimenta de macaco e marmelada. Submeteu-se 18 cepas fúngicas, em triplicata, a ensaio enzimático conforme as metodologias adaptadas de Strauss et al. (2001) e Brizzio et al. (2007), em distintos períodos (24, 48 e 72 horas). Para tratamento dos dados, utilizou-se o delineamento inteiramente ao acaso e aplicaram-se testes não paramétricos, Friedman ($\alpha= 5\%$) (efeito dos períodos de incubação) e Kruskal-Wallis ($\alpha= 5\%$) (fonte do substrato). Os isolados fúngicos apresentaram maior índice de atividade pectinolítica às 24 e 48 horas de incubação ($P<0,05$). As cepas epifíticas em meio caseína tiveram índice de atividade enzimática superior ($P<0,01$). No tocante à planta nativa, os isolados da marmelada tiveram maior índice enzimático no respectivo meio, enquanto os das cepas oriundas da lobeira, mangabeira e pequi apresentaram baixos índices ($P<0,01$). Todos os isolados fúngicos apresentaram atividade enzimática relevante, em destaque, as cepas do gênero *Malbranchea* spp. obtiveram maior índice de atividade proteolítica ($P<0,01$) e pectinolítica, em conjunto com *Aspergillus* spp. e *Aureobasidium* spp. ($P<0,05$). Dessa forma, conclui-se que os isolados fúngicos do Cerrado possuem potencial enzimático. Como o gênero *Malbranchea* spp. apresentou maiores índices de atividade proteolítica, é o mais indicado para realização de futuros testes enzimáticos objetivando a aplicação das enzimas. Quanto aos outros isolados, sugere-se que novas pesquisas sejam realizadas com intuito de analisar condições ótimas para produção de proteases e pectinases.

Palavras-chave: Cepas fúngicas. Pectinase. Protease.

ABSTRACT

The Cerrado is considered one of the most biodiverse savannas in the world. Despite the studies that exist aimed to understand mycology, few are the works that aim to elucidate the enzymatic profile produced by filamentous fungi associated with the biome. The objective of this study was to evaluate the proteolytic and pectinolytic activities of fungal isolates from the stalk of six fruit trees: Pequi, Mangabeira, Lobeira, Muricizeiro, Monkey pepper and Marmalade. Eighteen fungal strains, in triplicate, were submitted to enzymatic assay according to the adapted methodologies of Strauss et al. (2001) and Brizzio et al. (2007), in different periods (24, 48 and 72 hours). For data treatment, a completely randomized design was used and non-parametric tests were applied, Friedman ($\alpha = 5\%$) (Effect of incubation periods) and Kruskal-Wallis ($\alpha = 5\%$) (substrate source). The fungal isolates had a higher index of pectinolytic activity at 24 and 48 hours of incubation ($P < 0.05$). The epiphytic strains in casein medium had higher enzymatic activity index ($P < 0.01$), about native plant, the marmalade isolates had higher enzymatic index in the respective medium, while those of the strains originated from the Lobeira, Mangabeira and Pequi showed low indices ($P < 0.01$). All fungal isolates presented relevant enzymatic activity, in prominence, the strains of the genus *Malbranchea* spp. obtained a higher index of proteolytic activity ($P < 0.01$) and pectinolytic, in conjunction with *Aspergillus* spp. and *Aureobasidium* spp. ($P < 0.05$). Therefore, it is concluded that the fungal isolates from the Cerrado have enzymatic potential. As the genus *Malbranchea* spp. presented higher indices of proteolytic activity it is the most suitable for conducting future enzymatic tests aiming the application of enzymes. As for the other isolates, it is suggested the development of new researches in order to analyze optimal conditions to produce proteases and pectinases.

Keywords: Fungal strains. Pectinase. Protease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Isolado fúngico oriundo da marmelada em meio pectina às 72hs de incubação.....	04
--	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Halo médio da colônia (HC em mm), halo médio enzimático (HE em mm) e índice enzimático (IE) em função do substrato e período de incubação (em horas).....	05
Tabela 2 – Halo médio da colônia (HC em mm), halo médio enzimático (HE em mm) e índice enzimático (IE) em função do substrato para fungos endofíticos e epifíticos.....	07
Tabela 3 – Halo médio da colônia (HC em mm), halo médio enzimático (HE em mm) e índice enzimático (IE) em função do substrato e planta nativa	08
Tabela 4 – Halo médio da colônia (HC em mm), halo médio enzimático (HE em mm) e índice enzimático (IE) em função do substrato e do gênero do isolado fúngico.....	10

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	01
METODOLOGIA	02
RESULTADOS E DISCUSSÃO	04
CONCLUSÃO	11
REFERÊNCIAS.....	11

1. INTRODUÇÃO

Há séculos a humanidade faz uso de enzimas. Todavia, o emprego para produzir bens de consumo, desde os tempos antigos, precede o conhecimento sobre sua natureza e propriedades. O termo enzima veio a ser utilizado pela primeira vez em 1878 pelo alemão Wilhelm Kühne, mas o aumento de conhecimentos sobre suas características ocorreu no início do século XX. A partir desse momento houve uma expansão da tecnologia enzimática, impulsionada pela constatação de que microrganismos podem produzir as enzimas que são empregadas em indústrias (Coelho et al., 2008).

As enzimas microbianas têm grande destaque na aplicação industrial devido sua alta produtividade, viabilidade econômica e fornecimento regular, sendo que os microrganismos em condições ótimas apresentam rápido crescimento, estabilidade, e ainda, alta atividade catalítica (Gurund et al., 2013). São empregadas em uma gama de indústrias em diversos setores, para produção de ração para animais, alimentos, produtos para cuidados domésticos, produtos farmacêuticos e produtos químicos, por exemplo (Adrio e Demain, 2014). De modo geral, as enzimas de fontes microbianas são utilizadas na indústria, ora em um processo, ora em outro, podendo assim serem consideradas um dos produtos mais importantes obtidos a partir de microrganismos (Pandey et al., 1999).

Dentre os grupos de microrganismos que produzem enzimas com aplicabilidade industriais, os fungos filamentosos têm grande destaque. Apresentam características inerentes à adaptação em condições adversas, como variação de temperatura, pH e baixa umidade (Oliveira Júnior, 2014). Além disso, seu cultivo é simples e apresenta alta produção de enzimas celulares (Guimarães et al., 2006). Os fungos filamentosos encontram-se dispersos na natureza, predominantemente, no ambiente terrestre (Raven et al., 1996), estando presentes no solo, animais e vegetais. No tocante a esses últimos, os fungos podem ser encontrados na parte interna do tecido vegetal, denominados de fungos endofíticos, bem como na porção externa das plantas, denominados de epifíticos (Azevedo, 1998). Os fungos são cosmopolitas (Raven et al., 1996), e assim podem ser encontrados em todo planeta, em todos ambientes e biomas.

O Cerrado é a maior região de savana da América do Sul (Castro et al., 2016), e ainda, é classificado como a savana com maior biodiversidade do planeta (Vasconcelos et al., 2015). No Cerrado são encontrados 5% da biodiversidade do planeta, contribuindo assim para que seja a mais rica. Todavia, mesmo com toda sua riqueza de espécies, é considerado um dos biomas mais ameaçados do Brasil (BRASIL, 2010).

No território brasileiro, estima-se que existam cerca de 40.989 espécies de plantas e fungos, sendo que no Cerrado encontram-se registradas 12.070 espécies de plantas terrestres e 291 espécies de fungos (Forzza et al., 2010), mas tais dados não são consenso. Outro estudo aponta que, embora os conhecimentos sobre a diversidade micológica do Cerrado ainda sejam escassos, há a estimativa de dez fungos para cada espécie de plantas, caracterizando como uma das maiores diversidades (Armando, 2014).

Frente às lacunas de conhecimentos a respeito da micologia do Cerrado, nota-se que são poucos os estudos sobre a diversidade de sua microbiota autóctone (Rocha, 2012). Ademais, a disponibilidade de informações sobre enzimas produzidas por fungos filamentosos ainda é insuficiente para compreender o perfil enzimático microbiano associado a espécies vegetais nativas do bioma, evidenciando assim a necessidade de apropriar de conhecimentos sobre a produção enzimática deste bioma.

Visto isso, este trabalho tem como objetivo avaliar as atividades proteolíticas (caseinase) e pectinolítica (pectinase) de isolados fúngicos oriundos do caule de seis espécies arbóreas frutíferas do Cerrado conhecidas pela população e possuem valor econômico. Sendo estas: *Caryocar brasiliense* (pequizeiro), *Harconia speciosa* (mangabeira), *Solanum lycocarpum* (lobeira), *Byrsonima laxiflora* (muricizeiro), *Xylopiia aromatica* (pimenta de macaco) e *Alibertia sessilis* schum (marmelada).

2. METODOLOGIA

Local de condução e aquisição dos isolados

O experimento foi conduzido no Campus Ceres do Instituto Federal Goiano, no Laboratório de Microbiologia. Foram selecionados, randomicamente, 18 isolados fúngicos, sendo três para cada vegetal, previamente estocados na micoteca em tal laboratório. Os isolados fúngicos foram obtidos na trilha “Ver o Rio”, área de mata

preservada que abriga uma vasta biodiversidade da fauna e da flora do Cerrado presente na referida instituição de ensino, que localiza-se na latitude S 15° 21' 00", longitude W. 49° 35' 57" e altitude de 564 m; e identificados conforme o gênero, segundo a metodologia de Lacaz et al. (2002), em ensaios paralelos. Ao início desta pesquisa, os fungos de interesse foram reativados em meio Sabouraud acrescido de cloranfenicol para manipulação experimental.

Das cepas utilizadas no experimento, sete são de natureza endofítica e onze epifítica. Isolados do gênero *Aspergillus* spp. foram amostrados em todas as espécies de plantas, oriundos tanto da parte externa como da parte interna do caule. No que concerne aos isolados endofíticos, avaliou-se *Rhizopus* spp. (da marmelada) e *Leichtermia* spp. (da lobeira). Quanto aos epifíticos, fizeram parte do experimento os isolados de *Malbranchea* spp. (da marmelada), *Aureobasidium* spp. (da mangabeira), *Trichoderma* spp. e *Glicocadium* spp. (todos do pequiheiro).

Avaliação da Produção Enzimática

As dezoito cepas distintas foram avaliadas por meio da relação entre atividade enzimática frente a dois substratos e distintos períodos de incubação (24, 48 e 72 horas), em triplicata para cada intervalo de tempo. O diâmetro do halo de desenvolvimento das colônias (HC) e o halo enzimático (HE) foram mensurados. Já o índice da atividade enzimática (IE), que expressa a capacidade dos microrganismos em degradar o substrato, foi determinado por meio do quociente entre HE e HC ($IE = \frac{HE}{HC}$).

Para avaliação das atividades proteolíticas e pectinolíticas empregou-se as metodologias de Strauss et al. (2001) e Brizzio et al. (2007), adaptadas. Utilizou-se meio Base, em que cada 1L foi constituído por 5g de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), 1g de fosfatomonobásico de potássio (KH₂PO₄), 0,5g de sulfato magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O) e 21 g de ágar. Conforme o objetivo do estudo, foi adicionada caseína (1%) ou pectina cítrica (1%) como fonte de proteína ou carboidrato, respectivamente.

Subsequentemente, foi realizada a inoculação das cepas no centro das placas de petri e incubação a 37°C em estufa BOD (demanda bioquímica de oxigênio), conforme os respectivos intervalos de tempo. Transcorridos os ínterins, foi mensurado o HC e aplicado 5 ml de solução de ácido acético (5%) nas placas com caseína, ao

passo que as placas com pectina foram tratadas com solução de ácido clorídrico (2%). Após 60 minutos do tratamento, adicionou-se o corante lugol fraco (1%).

Posterior ao processo, o halo de cor clara foi formado ao redor da colônia (HE) indicando a degradação do substrato e foi mensurado com o auxílio de um paquímetro graduado em milímetros (mm) (Figura 1).

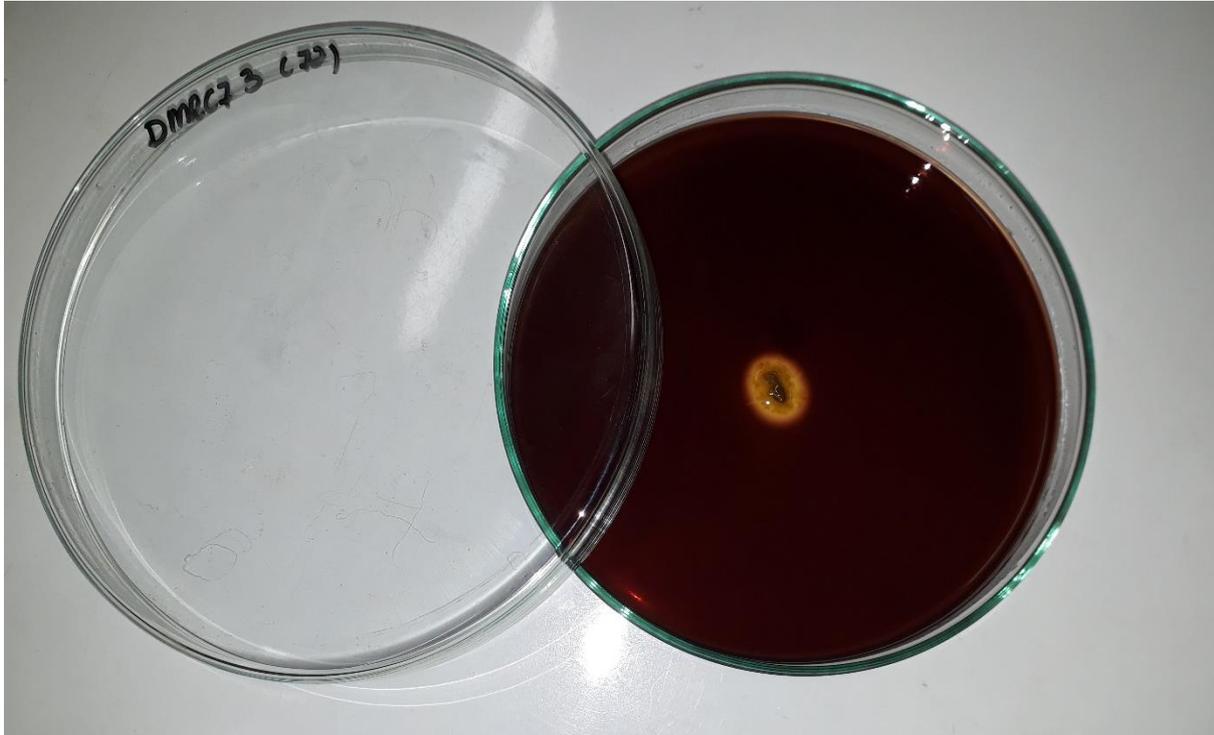


Figura 1: Isolado fúngico oriundo da marmelada em meio pectina às 72hs de incubação (Fonte: Arquivo pessoal, 2019).

Análise Estatística dos Dados

O delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso, com diferentes números de repetições (11 fungos epifíticos e 07 endofíticos). Para as variáveis HC, HE e IE foram aplicados testes não paramétricos. O teste de Friedman ($\alpha= 5\%$) foi utilizado para verificação do efeito dos períodos de incubação (24, 48 e 72 horas). Já o teste Kruskal-Wallis ($\alpha= 5\%$) para examinar os índices em função da fonte de carbono, origem endofítica e epifítica, planta nativa e gênero fúngico. As análises estatísticas foram feitas por meio do software estatístico R3.4.3.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O halo da colônia fúngica (HC) e o halo enzimático (HE) aumentaram gradualmente conforme a elevação do período de incubação, sendo distintos nos três

períodos ($P < 0,05$). Nos substratos avaliados, às 72 horas observou-se os maiores HC e HE e às 24 horas de incubação os menores HC e HE (Tabela 1).

Todavia, ao analisar isoladamente os substratos em cada período de incubação, verificou-se que às 24 horas de incubação, as cepas apresentaram um maior HC no substrato com caseína ($P < 0,05$). Nos demais períodos não houve diferença significativa ($P > 0,05$) para o crescimento das isolados (Tabela 1), assim como não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) no HE formado nos meios caseína e pectina entre os tempos de incubação avaliados.

No estudo, averiguou-se que o índice enzimático (IE) dos isolados inoculados em pectina foram superiores, às 24 e 48 horas de incubação, quando comparado à caseína (comparação na coluna). Com 72 hs, o IE não difere entre substratos ($P > 0,05$).

As cepas cultivadas em caseína obtiveram IE semelhantes em todos os períodos de incubação ($P > 0,05$) (comparação na linha). Para pectina, o IE às 24h foi superior aos demais tempos de incubação (Tabela 1). Apontando, dessa maneira, que os isolados fúngicos avaliados apresentam capacidades distintas para degradar o substrato nos períodos de tempo avaliados. Nesse estudo à medida que os períodos de incubação aumentavam o IE reduzia, visto que em termos de proporcionalidade HE teve menor crescimento que HC.

Tabela 1: Halo médio da colônia (HC em mm), halo médio enzimático (HE em mm) e índice enzimático (IE) em função do substrato e período de incubação (em horas).

	Períodos de Incubação								
	24			48			72		
Substrato	HC	HE	IE	HC	HE	IE	HC	HE	IE
Pectina	4.38 Bc	9.73 Ac	2.53 Aa	19.76 Ab	26.28 Ab	1.43 Ab	31.10 Aa	36.71 Aa	1.21 Ab
Caseína	9.72 Ac	11.69 Ac	1.20 Ba	23.29 Ab	26.27 Ab	1.24 Ba	33.26 Aa	38.64 Aa	1.28 Aa

Nota: Letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($\alpha = 5\%$) e letras minúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Friedman ($\alpha = 5\%$).

As enzimas produzidas no experimento pelas cepas têm uma gama de aplicações industriais. As pectinases, de modo geral, podem ser caracterizadas como enzimas que atuam na degradação de substâncias pectinas. Em virtude disso, são empregadas para hidrolisar pectina presente na parede celular, melhorando a

extração do suco de frutas por meio da redução da viscosidade e manutenção da textura (Uenojo e Pastore, 2007). Logo, são bastante utilizadas em indústrias de bebidas e sucos para otimizarem a qualidade do processo (Gonzalez e Rosso, 2011), uma vez que as pectinas fazem parte da composição da parede celular, sendo um dos principais polímeros e importante componente da lamela média (Silva et al., 1997), podendo assim, serem encontradas em todas as partes do vegetal, como na raiz, folhas, caule, sementes, flores e frutos (Seyfried et al., 2016).

Outrossim, as pectinases são usadas na indústria alimentícia (na produção de polpas de frutas, purês, compostos prebióticos e ração animal); farmacêutica (reduzir as taxas de colesterol e em tratamentos de problemas intestinais); têxtil (tratar fibras naturais); de papel (para branqueamento da polpa *kraft*); de chá e café (favorece a fermentação); de óleos (melhora a extração dos óleos e de agentes antioxidantes, contribui para recuperação de óleos essenciais de cítricos); e para produção de bioetanol (por meio da degradação da matéria orgânica e liberação de açúcares) (Uenojo e Pastore, 2007; Santi, Berger e Silva, 2014).

As proteases podem ser encontradas em animais, plantas e microrganismos, estando presentes em todos os seres vivos, pois sua atividade de hidrolisar ligações peptídicas é imprescindível para a diferenciação celular e crescimento dos organismos. Na aplicação industrial, as enzimas microbianas são amplamente utilizadas, sendo aplicadas em variados processos industriais, tais como o têxtil, de couros, detergentes, laticínios e produtos farmacêuticos (Souza et al., 2015; Razzaq et al., 2019).

Na indústria de detergentes, o uso de proteases confere maior fixação de cor aos tecidos. Também, as enzimas possibilitam que o produto seja menos agressivo à natureza, uma vez que reduzem o consumo de água, energia e adição de produtos cáusticos e solventes tóxicos. Já na indústria de alimentos ao serem utilizadas, as proteases melhoraram o sabor, aroma, textura, qualidade nutricional e funcionalidade, catalisam a hidrólise de ligações específicas, viabilizando modificações intencionais no alimento. Enquanto na indústria farmacêutica são empregadas para a produção de fármacos (inibidores proteolíticos) (Vermelho et al., 2008).

Embora todos os microrganismos possam produzir enzimas, não são todos que são classificados como bons produtores. Os microrganismos são considerados bons produtores de enzimas extracelulares, em meio sólido, quando o índice enzimático (IE) é maior ou igual a dois. Assim, o IE indica o quão hábil o microrganismo é para

degradar substratos específicos (Lealem e Gashe, 1994). Nesse experimento, ao agrupar os isolados fúngicos em endofíticos e epifíticos, observou-se que os índices enzimáticos de ambos são menores que dois (Tabela 2).

No que se refere à origem das cepas, os fungos endofíticos apresentaram diferença significativa ($P < 0,01$) no substrato com caseína, em que HC e HE foram maiores (Tabela 2). Já o IE dos epifíticos foi estatisticamente significativo ($P < 0,01$). No meio pectina os fungos endofíticos apresentaram maior halo de degradação enzimático ($P < 0,01$). Já o crescimento das cepas (HC) e IE não foram significativos para pectinases ($P > 0,05$).

Tabela 2: Halo médio da colônia (HC em mm), halo médio enzimático (HE em mm) e índice enzimático (IE) em função do substrato para fungos endofíticos e epifíticos

Origem	Substrato					
	Caseína			Pectina		
	HC*	HE*	IE*	HC	HE**	IE
Endofítico	36.68 A	41.09 A	1.13 B	20.76A	27.10 A	1.33A
Epifítico	24.47 B	29.28 B	1.32 A	16.92A	22.42 B	1.30A

Nota: Letras maiúsculas na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis.

*Significativo a 1% de probabilidade ($P < 0,01$).

**Significativo a 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

Ao avaliarem a atividade proteolítica de vinte isolados fúngicos epifíticos da vassourinha (*Baccharis dracunculifolia*) pertencentes a três grupos (*Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp.), Link e Onofre (2010) averiguaram a ausência de atividade proteolítica em todos. Já Wenzel et al. (2013) no experimento a respeito da atividade enzimática e microbiana de fungos endofíticos do milho, dos vinte isolados fúngicos testados, três demonstraram atividade proteolítica fortemente positiva.

Bezerra et al. (2013) coletaram noventa e cinco fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Bauhinia forficata* de vinte oito espécies fúngicas, sendo os fungos de diversas partes da planta (folha, hastes, sépalas e sementes). Dentre as cepas submetidas à análise, treze apresentaram produção de protease. Os autores destacaram em tal trabalho que a proteolítica averiguada foi baixa.

Já Lisboa (2015) ao submeter setenta e cinco fungos endofíticos, de dezenove espécies de vegetais do Cerrado e Mata Atlântica, à análise enzimática, observou que

cinquenta apresentaram atividade proteolítica. Por sua vez, Bezerra (2017) destaca que a produção de enzimas proteolíticas por fungos endofíticos está relacionada com a capacidade da síntese de enzimas para gerar aminoácidos que permitam seu crescimento. Diferentemente do que ocorre em endofíticos patogênicos cujas enzimas são sintetizadas com finalidade de aplicação na patogênese.

Ademais, Cuzzi et al. (2011) ao avaliarem a atividade enzimática (Pz) de onze espécies de fungos endofíticos isolados da vassourinha, verificaram que cinco espécies apresentaram IE positivo (Pz= 2), cinco IE negativo (Pz= 1) e uma espécie o IE demonstrou fortemente positivo (Pz= 3). É ressaltado pelos autores que mesmo que as enzimas possuam um perfil semelhante de ação no substrato, requerem condições ótimas para atuação. Logo, as enzimas devem ser selecionadas conforme as condições que serão utilizadas. Acrescentam ainda, que embora as enzimas possuam um amplo espectro de características físico-químicas, essas relacionam-se ao habitat e microrganismo que a produz.

No tocante à degradação enzimática das cepas em relação à planta nativa, averiguou-se que apesar de os isolados da mangabeira apresentarem maior HC e HE, o IE dos fungos oriundos da marmelada foi maior ($P < 0,01$). O muricizeiro e a pimenta de macaco apresentaram IE semelhantes e maiores que os encontrados na mangabeira, lobeira e pequizeiro ($P < 0,01$). Para o meio pectina não houve diferença estatística ($P > 0,05$) no HC, HE e IE para as cepas oriundas de diferentes árvores frutíferas do Cerrado (Tabela 3).

Tabela 3: Halo médio da colônia (HC em mm), halo médio enzimático (HE em mm) e índice enzimático (IE) em função do substrato e planta nativa.

	Substrato					
	Planta Nativa	Caseína			Pectina	
		HC**	HE*	IE*	HC	HE
Mangabeira	26.00 A	39.87 A	1.10 D	21.62A	28.24A	1.78A
Lobeira	19.00 B	30.53 AB	1.16 BC	19.98A	25.29A	1.82A
Pequizeiro	21.00 B	23.00 BC	1.15 CD	19.31A	24.96A	1.44A
Muricizeiro	17.50 BC	21.00 BC	1.22 B	18.48A	24.38A	1.81A
Pimenta de Macaco	18.00 BC	19.00 BC	1.22 B	16.61A	23.11A	1.66A

Marmelada	9.00 C	16.00 C	1.79 A	14.50A	19.46A	1.84A
-----------	--------	---------	--------	--------	--------	-------

Nota: Letras maiúsculas na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis.

*Significativo a 1% de probabilidade ($P < 0,01$).

**Significativo a 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

Werneck (2016) avaliou cinquenta e oito fungos endofíticos de folhas de treze espécies endêmicas do Cerrado, em que em 36 isolados houve formação de halos, indicando a produção de proteases. Dentre as plantas do Cerrado que tiveram os isolados avaliados pela autora, duas: o pequi e a lobeira, estão em consonância com nosso estudo, visto que em ambos os estudos as cepas autóctones dessas árvores apresentaram atividade proteolítica.

Ao verificar a ocorrência de leveduras em treze frutos do Cerrado, identificar e realizar análise enzimática, Oliveira (2015) observou atividades pectinolítica e proteolítica. Foram avaliados caju do cerrado, cagaita, pitomba, araçá, coco guariroba, jatobá do cerrado, maracujá do cerrado, coquinho azedo, buriti, araticum e frutos de árvores frutíferas cujos isolados fúngicos foram avaliados em nosso estudo, o pequi, mangaba e lobeira. De modo geral, 35% das leveduras obtiveram atividade proteolítica e 16% atividade pectinolítica. Enquanto aquelas isoladas da mangaba apresentaram ausência de pectinases, uma levedura isolada do pequi produziu pectinase. Somado a isso, nos isolados de tais frutos o autor verificou maior produção de proteases.

Estudos referentes ao isolamento de microrganismos do Cerrado, identificação e avaliação do potencial enzimático ainda são escassos. Pereira (2017) aponta em seu estudo que poucos são os trabalhos a respeito da atividade enzimática de fungos oriundos de plantas do Cerrado. Ademais, elucida que há necessidade de mais pesquisas voltadas para comportamento da microbiota do bioma em relação a substratos distintos, origem (endofítica e epifítica) e diferentes períodos de incubação.

No que concerne aos gêneros fúngicos avaliados nesse experimento, notou-se que em meio caseína os gêneros *Leichtemia* spp., *Rhizopus* spp. e *Glicocadium* spp. têm IE's semelhantes entre si, mas inferiores ao *Trichoderma* spp. e ao *Malbranchea* spp. ($P < 0,01$). Ademais, *Glicocadium* spp. em meio pectina possui IE inferior a *Aspergillus* spp., *Malbranchea* spp. e *Aurobasidium* spp. ($P < 0,05$). Já o *Malbranchea* spp., embora tivesse menor HC e HE nos dois substratos analisados, apresentou os maiores IE em caseína e pectina ($P < 0,05$) (Tabela 4).

Silva et al. (2018) ressaltam que a baixa atividade pectinolítica (<2) não é um empecilho para aplicação dos isolados na indústria como produtores de enzimas. Ao contrário, novos estudos devem ser realizados objetivando conhecer as melhores condições para estimular a produção enzimática. Em particular, no que é tangível a essa pesquisa, com exceção da atividade proteolítica (caseasse) das cepas fúngicas do *Malbranchea* spp., todos os outros isolados devem ter suas condições ótimas investigadas para potencializar a atividade enzimática.

Tabela 4: Halo médio da colônia (HC em mm), halo médio enzimático (HE em mm) e índice enzimático (IE) em função do substrato e do gênero do isolado fúngico.

Gêneros dos Isolados	Substrato					
	Caseína			Pectina		
	HC*	HE*	IE*	HC**	HE**	IE**
<i>Leichtermia</i> spp.	47.00 A	51.11 A	1.09 D	26.44 A	31.00 A	1.59 AB
<i>Rhizopus</i> spp.	44.05 AB	48.22 AB	1.08 D	24.77 A	30.11 A	1.53 AB
<i>Glicocadium</i> spp.	25.05 BC	26.88 BC	1.05 D	21.27 A	24.27 A	1.13 B
<i>Aspergillus</i> spp.	20.71 C	21.50 C	1.46 BC	18.28 A	24.54 A	1.81 A
<i>Trichoderma</i> spp.	17.88 C	22.00 C	1.20 B	19.22 A	23.66 A	1.45 AB
<i>Aureobasidium</i> spp.	17.88 C	20.66 D	1.13 CD	14.00 AB	21.55 A	1.66 A
<i>Malbranchea</i> spp.	4.44 D	12.5 D	2.90 A	6.44 B	10.00 B	1.88 A

Souza (2015) avaliou dezessete espécies diferentes de fungos dos gêneros *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Mucor* spp., *Penicillium* spp., *Paecilomyces* spp., *Trichoderma* spp., isolados do solo em Brasília e no entorno. Oito não apresentaram atividade proteolítica e nove demonstraram a degradação do substrato. Dentre os fungos produtores de protease, no referido estudo estão dois fungos do gênero *Aspergillus* spp. (*Aspergillus foetidus* e *Aspergillus versicolor*). Diferentemente dos dados obtidos pela autora, em nossa pesquisa, cepas de *Trichoderma* spp. apresentaram produção de protease. Todavia, em ambas as pesquisas os isolados *Aspergillus* spp. degradaram o substrato, tendo assim, atividade proteolítica.

No tocante à produção de proteases (caseasse), os dados obtidos em nosso experimento não corroboram com os obtidos por Abe et al. (2015), visto que, ao investigarem os gêneros fúngicos *Talaromyces* spp., *Stenocarpella* spp., *Penicillium* spp., *Phlebiopsis* spp., *Cladosporium* spp., *Hyphopichia* spp., *Epicoccum* spp., *Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp., *Irpex* spp., *Fusarium* spp., *Microdochium* spp.,

Mucor spp. e *Sarocladium* spp., os produtores de protease foram *Cladosporium* spp. e *Sarocladium* spp..

A média do IE observada nas cepas de *Aspergillus* spp. nesse experimento foi maior do que a encontrada por Silva et al. (2011), ao incubarem as cepas por cinco dias a 28 ± 1 °C. Visto que em tal estudo a avaliação dos índices enzimáticos para degradação de caseína variaram entre 0 a 1,00 mm, enquanto no presente estudo, o índice enzimático teve 1,46 mm.

Como observado, diferentes gêneros fúngicos podem ser utilizados para produção de enzimas. De acordo com Souza et al. (2015), para produção de proteases destacam-se os gêneros *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Humicola* spp., *Thermoascus* spp., *Thermomyces* spp., conquanto, para produção de enzimas pectinolíticas, Silva et al. (1997) destacam-se os gêneros fúngicos *Aspergillus* spp., *Rhizopus* spp., *Trichoderma* spp. e *Penicillium* spp. No que é referente ao presente estudo, ao analisar o comportamento enzimático das cepas fúngicas oriundas das árvores frutíferas do Cerrado, nota-se, que as do gênero *Aspergillus* spp. tiveram atividade pectinolítica significativa, enquanto outros gêneros referidos na literatura produziram pectinase. Do mesmo modo, os gêneros citados por Souza et al. (2015) apresentaram produção de protease.

4. CONCLUSÃO

Os isolados fúngicos de todos os gêneros avaliados apresentaram atividades proteolítica e pectinolítica, evidenciando dessa forma o potencial enzimático dos fungos presentes no Cerrado. Além disso, o gênero *Malbranchea* spp. apresentou maior índice de atividade proteolítica (casease) significativa. Logo, é indicado para realização de futuros testes visando para aplicação industrial da enzima, tais como em indústrias têxtil, farmacêutica, de couros, de detergente e alimentícia. Recomenda-se que novos estudos sejam realizados com o intuito de desvendar as condições ótimas para demais cepas, afim de aumentar sua potencialidade enzimática.

5. REFERÊNCIAS

Abe CA, Faria CB, de Castro FF, Souza SR, Santos FB, Silva CN et al. Fungi Isolated

from Maize (*Zea mays L.*) Grains and Production of Associated Enzyme Activities. *Int J Mol Sci.* 2015;16(7):15328–15346.

Adrio JL, Demain AL. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. *Biomolecules.* 2013;(4):117-139.

Armando EAS. Fungos Epifíticos e Fitopatogênicos Associados a Plantas do Cerrado, Distrito Federal [dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília;2014. 205 p.

Azevedo JL. Microrganismos Endofíticos. In: MELO IS.; Azevedo JL. (Ed.) *Ecologia Microbiana.* São Paulo: EMBRAPA; 1998. p.117-137.

Bezerra, CS. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE *Colletotrichums* pp. ISOLADOS DE *Paullinia cupana* Kunth. var. *sorbilis* (Mart.). Amazônia [dissertação]. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; 2017. 105 p.

Bezerra JDP, Nascimento CCF, Barbosa RN, Silva DCV, Svedese VM, Silva-Nogueira EB, et al. Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2015; 46(1):49-57.

Brasil. Plano de Ação para Prevenção e Controle do Desmatamento e das Queimadas no Cerrado. Brasília. 2010. 173 p.

Brizzio S, Turchetti B, Garcia V, Libkind D, Buzzini P, Van Broock M. Extracellular Enzymatic Activities of Basidiomycetous Yeasts Isolated from Glacial and Subglacial Waters of Northwest Patagônia (Argentina). *Canadian Journal of Microbiology.* 2007; (53):519-525.

Castro AP, Silva MRSS, Quirino BF, Bustame MMC, Krüger, RH. Microbial Diversity in Cerrado Biome (Neotropical Savanna) Soils. *Plos One.* 2016;11(2):1-16.

Coelho MAZ, Salgado AM, Ribeiro, BD. *Tecnologia Enzimática.* Rio de Janeiro: EPUB; 2008. 288p.

Cuzzi C, Link S, Vilani A, Onofre, SB. Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* DC (ASTERACEAE). *Global Science and Technology.* 2011; 4(2):47-57.

Forzza, RC, Baumgratz, JF, Bicudo CA, Canhos DAL, Carvalho Jr AA, Costa A et al. Introdução-Síntese da Diversidade Brasileira. In: Forzza RC, Leitman PM, Costa A, Carvalho Jr AA, Peixoto AL, Walter BMT et al (Eds). Catálogo de plantas e fungos do Brasil [online]. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Rio de Janeiro, 2010. 871 p.

Guimarães LHS, Peixoto-Nogueira SC, Michelin M, Rizzatti ACS, Sandrim VC, Zanoelo FF et al. Screening of Filamentous Fungi for Production of Enzymes of Biotechnological Interest. Brazilian Journal of Microbiology. 2006;37:474-480.

Gurung N, Ray S, Bose S, Raiz V. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. BioMed Research International.2013;2013:1-18.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Vaccari EV, Melo, NT. Tratado de Micologia Médica. São Paulo: Sarvier; 2002. 1104 p.

Link S, Onofre, SB. Microrganismos epifíticos da vassourinha – *Baccharis dracunculifolia* D.C. (*Asteraceae*). Revista em Agronegócios e Meio Ambiente. 2010;3:131-143

Lealem F, Gashe BA. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). Journal of Applied Bacteriology. 1994;(77):348-352.

Lisboa LCF. Fungos endofíticos: prospecção de atividade biocatalítica e aplicação biotecnológica, São Paulo [tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista; 2015. 222 p.

Pereira JM. Atividade enzimática de fungos naturalmente encontrados em plantas nativas do cerrado, Goiás [Monografia]. Ceres: Instituto Federal Goiano;2017. 57 p.

Oliveira Júnior, S.D. Produção de Enzimas por Fungos em Fermentação Semi-Sólida Utilizando Bagaço de Coco e Pedúnculos de Caju como Substrato, Rio Grande do Norte [dissertação]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte;2014. 103p.

Pandey A, Selvakumar P, Soccol CR, Nigam P. Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes. *Current Science*. 1999;77(1):149-162.

Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. *Biologia Vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;1996. 830p.

Rocha BB. Caracterização do Perfil Enzimático de um Fungo Isolado do Cerrado Brasileiro, Distrito Federal [dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília;2012.130 p.

Razzaq A, Shamsi S, Ali A, Ali Q, Sajjad M, Malik A, et al. Microbial Proteases Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2019; 7(110).

Santi L, Berger M, Silva WOB. Pectinases e Pectina: Aplicação Comercial e Potencial Biotecnológico. *Caderno pedagógico*. 2014;11(1):130-139.

Seyfried M, Soldera-Silva A, Bovo F, Stevan-Hancke FR, Maurer JBB, Zawadzki-Baggio SF. Pectinas de plantas medicinais: características estruturais e atividades imunomoduladoras. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas. 2016; 18(1):201-214.

Silva DCV, Tiago PV, MATTOS JLS, PAIVA LM, SOUZA-MOTTA CM. Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agrofloreais do Município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. *Revista Brasil. Bot.*, 2011;34(4):607-610.

Silva R, Franco CML, Gomes ECML. Pectinases, Hemicelulases e Celulases, Ação, Produção e Aplicação no Processamento de Alimentos: Revisão. *Bol. SBCTA*, 1997; 31(2):249-260.

Silva TD, Barbosa IT, Vieira RIM, Mendes JS, Dias RMF, Abrão FO et al. 55ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia e 28º Congresso Brasileiro do Zootecnia; 2018 Ago 27-30; Goiânia, BR. Goiás: Adaltech; 2018. Disponível em: <http://www.adaltech.com.br/anais/zootecnia2018/resumos/trab-1516.pdf>

Souza PM, Bittencourt MLA, Caprara CC, Freitas M, Almeida RPC, Silveira D, et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2015; 46(2):337-346.

Souza PM. Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste brasileiro, São Paulo [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo.2015. 125 p.

Strauss MLA, Jolly NP, Lambrechts MG, Van Rensburg P. Screening for the Production of Extracellular Hydrolytic Enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*. 2001;(91):182-190.

Uenojo M, Pastore GM. Pectinases: Aplicações Industriais e Perspectivas. *Quim. Nova*. 2007; 30(2):388-394.

Vermelho AB, Melo ACN, Branquinha MH, Santos ALS, d'Avila-Levy CM, Couri S, et al. Enzimas Proteolíticas: Aplicações Biotecnológicas. In: Bon EPS, Ferrara MA, Corvo ML (Ed.). *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 273-287.

Vasconcelos TNC, Silva JS, Ianhez ML, Proença CEB. Floristic survey of the Brazilian Ages Memorial: a Cerrado sensu stricto area with an educational relevance. *CheckList*. 2015;11(4):1-9.

Werneck GC. Produção de Proteases por Fungos Endofíticos Isolados de Plantas do Cerrado, Distrito Federal [dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília;2016.91 p.

Wenzel JB, Moresco AAA, Boas EV, Burin FAG, Souza RO. Atividade Enzimática E Antimicrobiana De Fungos Endofíticos Isolados De Soja. *Persp. Online: biol. & saúde*. 2013; 9(3):01-15.