

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE *Penicillium chrysogenum* ISOLADOS DA SALA DE MEMORIAL DO IFPE – CAMPUS RECIFE

Cassiel Ruan Barreto da Silva¹
Eliana Santos Lyra da Paz²
Lindeberg Rocha Freitas³
Francisco Braga da Paz Júnior⁴

RESUMO

Os fungos anemófilos são aqueles que utilizam o ar para disseminar seus esporos. Esporos que, quando inalados, causam infecções respiratórias e rinites, cujos danos podem alcançar outros órgãos do corpo. O alto poder de patogenicidade desses microrganismos está relacionado à sua capacidade em produzir uma grande variedade de enzimas. Neste sentido, isolados de *Penicillium chrysogenum* coletados da sala do Memorial Joseph Mesel do IFPE – *Campus* Recife, foram avaliados quanto a capacidade em produzir protease. Para determinação da atividade proteolítica, discos de micélio de três isolados - MEM C4(12), MEM C4(21) e MEM C4 (36)- de *P. chrysogenum* foram cultivados em placas de Petri contendo meio ágar-leite, em regime de alternância luminosa por 7 dias, sendo realizadas cinco repetições para cada isolado fúngico. A atividade enzimática foi delineada pelo Índice de Relação Enzimática. Nos testes enzimáticos, todos os isolados apresentaram atividades proteolítica evidenciados pelo halo de degradação ao redor da colônia. Dentre os isolados testados, MEM C4(21) apresentou maior índice enzimático. Os resultados obtidos nesse trabalho configuram o isolado em questão como agente promissor na produção da enzima extracelular protease.

Palavras-chave: Fungos anemófilos; Atividade enzimática; Protease; *Penicillium*.

INTRODUÇÃO

Existem diversos fungos que podem ser encontrados na água, no solo e no ar, vivendo como parasitas, mutualistas ou saprófitos. Os fungos anemófilos são aqueles que utilizam o ar atmosférico como meio para a dissipação dos seus esporos. Tal dispersão pode ser ampliada pelas condições atmosféricas, como presença de umidade, aumento de temperatura e vento (SAMSON; HOEKSTRA; FRISVAD, 2000).

Os fungos anemófilos estão entre os principais contaminantes no ar de ambientes fechados e climatizados artificialmente de uso público e coletivo e a relevância desses seres se deve a serem causadores de infecções respiratórias e de rinites, ocasionadas pela inalação de

¹Bolsista PIBIC Técnico do IFPE – *Campus* Recife, cassielruann2018@gmail.com;

²Professora co-orientadora, Doutora, Faculdade de Odontologia de Pernambuco – UPE, eliana.lyra@upe.br;

³Professor Doutor, IFPE – *Campus* Pesqueira, lindeberg@pesqueira.ifpe.edu.br;

⁴Professor orientador, Doutor, IFPE – *Campus* Recife, franciscobraga@recife.ifpe.edu.br

seus esporos (AL-DOORY; DOMSON, 1984). Neste contexto, o gênero *Penicillium* surge como um dos fungos mais frequentes em ambiente climatizados (SOUZA et. al. 2018; PAZ JUNIOR et. al. 2019).

Esse gênero em específico compreende uma gama de espécies com grande potencial biotecnológico. O *Penicillium camemberti* e o *Penicillium roqueforti* são exemplos dessa aplicação na indústria, sendo utilizados no setor alimentício - produção de queijo. Já o *P.rubens* é um exemplo de aplicação em área medicinal, sendo feito seu uso para a síntese de penicilina (antibiótico). Pertencente a esse gênero, o *P.marneffe* causador é o agente causador da peniciliose – infecção respiratória que acomete a humanos e roedores, que, com o decorrer do estágio, pode atingir outros órgãos além do pulmão (HOUBRAKEN; DE VRIES; SAMSON, 2014).

Para a execução do seu metabolismo, os fungos liberam enzimas. Dentre essas estão as proteases. Esse tipo de enzima hidrolítica apresenta potencial fisiológico e patológico, possuindo a capacidade de degradação de proteínas, um dos constituintes fundamentais das células – portanto sendo indicadas como responsáveis pelo início das infecções (COOPER, 2000). Apresenta capacidade biotecnológica, podendo atuar em degradação de resíduos agrários, e na síntese de detergentes e de produtos na indústria alimentícia (SOUZA et al., 2015).

Portanto o presente estudo teve por objetivo avaliara atividade proteolítica dos isolados de *Penicillium crhysogenum* coletados da sala do Memorial Joseph Mesel do IFPE – Campus Recife.

METODOLOGIA

Local do estudo

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Biologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, *Campus* Recife.

Amostras fúngicas

Foram selecionados três isolados de *Penicillium crhysogenum* coletados da Sala de Memorial da Biblioteca do IFPE – campus Recife. Os isolados receberam as seguintes identificações: MEM C4(12), MEM C4(21) e MEM C4 (36).

Atividade proteolítica

Discos de micélio provenientes de colônias jovens de cada isolado foram inoculados centralmente em placas de Petri contendo meio ágar-leite (500 mL de leite desnatado, 500 mL de água destilada e 17 g de ágar-ágar), e em seguida incubadas em regime de alternância luminosa por 07 dias, com cinco repetições por isolado (SARATH et al., 1989). A formação de halos translúcidos ao redor da colônia indicou atividade positiva para enzima.

A determinação da atividade de protease foi determinada pelo Índice de Relação Enzimática ($IRE = D/d$), em que “d” corresponde ao diâmetro da colônia sem o halo de degradação e “D” à soma total entre a colônia e o halo.

O estudo foi inteiramente ao acaso, com cinco repetições e as médias das medições dos halos de degradação foram submetidas à Análise de Variância (ANOVA) e teste Tukey ($p < 0,05$) com auxílio do programa ASSISTAT versão Biostat 5.4 7.7 beta (AYRES et al. 2007).

DESENVOLVIMENTO

Fungos filamentosos, com ressalva aos fungos anemófilos, possuem uma potencial habilidade em síntese de secreções ricas em proteínas, metabólitos e substâncias orgânicas em geral. Essas tais proteínas secretadas possuem um papel patogênico para outros indivíduos e nutritivo para o fungo, quando atuam como enzimas (PEBERDY, 1994). As indústrias alimentícia, farmacêutica e a biotecnológica visaram essa capacidade e aplicaram, especialmente, essas substâncias – as enzimas, em alta escala. Como um exemplo, o *Penicillium chrysogenum* que com sua alta capacidade de secreção de enzimas foi tradicionalmente utilizado em fermentação de alimentos (CONESA et al., 2001).

A partir do metabolismo fúngico, é possível obterem-se diversos compostos naturais bioativos que apresentam grande importância para a humanidade, graças às atividades antibióticas e de importância farmacêutica (ABREU; RODOVIDA; PHAMPHILE, 2015). Os fungos filamentosos e anemófilos, dentre tantas variações, se destacam devido a sua facilidade de cultivo, secreção de enzimas no meio de produção e elevados níveis de produção enzimática, com potencial para aplicações industriais. Exemplos desses metabólitos são as penicilinas que se identificam como antibióticos profundamente utilizados no tratamento de infecções causadas por bactérias, esse medicamento é sintetizado a partir de metabólitos do

fungo *Penicillium notatum*, com potencial de combate a doenças infecciosas por bactérias. Esteróides e hormônios para crescimento vegetal são oriundos também de metabólitos, do *Penicillium chrysogenum*. (ABREU; RODOVIDA; PHAMPHILE, 2015).

A maioria das enzimas pode causar três tipos de degradação: branca – degrada componentes da madeira, marrom – degrada polissacarídeos, macia – pode degradar lignina e polissacarídeos, porém lentamente. Essas degradações classificam os fungos, portanto, como agentes decompositores da madeira, o que resulta em um controle na produção de biomassa em um ecossistema florestal (MUZZI et al., 2013).

As enzimas proteases quebram as moléculas de proteínas de cadeia longa em fragmentos mais curtos, a partir de hidrólise de ligações peptídicas, sendo proteínas encontradas em todos os organismos vivos e essenciais para o crescimento e diferenciação celular. Essas enzimas desempenham papéis importantes nos seres vivos, além de possuírem valor comercial com múltiplas aplicações em vários setores industriais (SERRANO,2013).

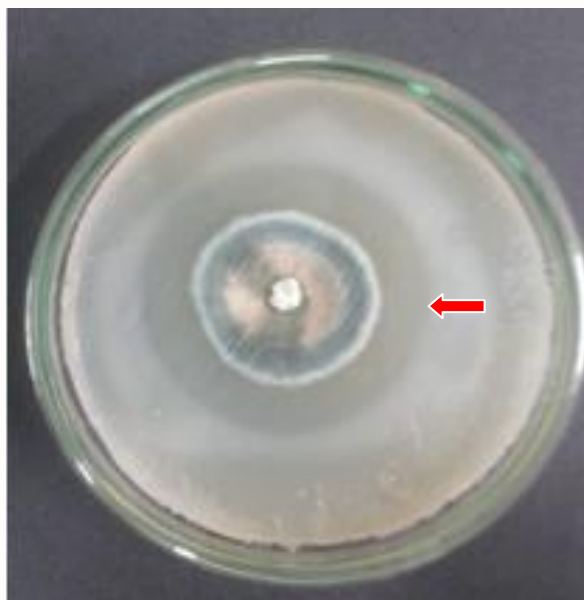
Caracterizadas no mercado, as proteases são um ingrediente padrão de todos os tipos de detergentes. Recentemente, estão em desenvolvimento métodos médico-terapêuticos com essa enzima, já que vários processos metabólicos, como a coagulação sanguínea - induz a agregação plaquetária por sua atividade negativa fibrinolítica e hemorrágica, e a fagocitose, são regulados por proteases (SERRANO, 2013).

Além de aplicações industriais, as proteases fúngicas possuem importante papel nas infecções. Elas são tidas como *start* do processo, por quebrarem cadeias longas de proteínas em fragmentos mais curtos, a partir das hidrólise de ligações peptídicas (SERRANO,2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisados, quanto a atividade proteolítica, três isolados fúngicos identificados como pertencentes à espécie *Penicillium chrysogenum* coletados na sala do memorial da Biblioteca do IFPE – campus Recife. Todos os fungos analisados no presente trabalho apresentaram atividade protease, evidenciada pela formação de um halo translúcido durante seu crescimento no meio específico (Figura 1). De acordo, com Park et al. (2015), o gênero *Penicillium* é conhecido por seu potencial biotecnológico na produção de enzimas, especialmente as proteases.

FIGURA 1 – Crescimento do isolado fúngico MEM C4 (21) – *Penicillium chrysogenum*, em meio ágar-leite (seta indicando o halo de degradação).



Após a confirmação da reação positiva a protease, foi realizada a avaliação da produção enzimática através do cálculo do Índice de Relação Enzimática (IRE). Para esta análise, todos os isolados analisados apresentaram índice enzimático superior a 1 (um), destacando-se o isolado MEM C4 (21) que apresentou índice enzimático de 1,42 (Tabela 1).

TABELA 1 – Índice de Relação Enzimática da atividade proteolítica dos isolados fúngicos tratados em meio ágar-leite.

ISOLADOS	ESPÉCIE	IRE
MEM C4(12)	<i>P.chrysogenum</i>	1,07 a
MEM C4(36)	<i>P.chrysogenum</i>	1,03 a
MEM C4(21)	<i>P.chrysogenum</i>	1,42 b*

** F = 5,45

*** p < 0,5%

*Médias com letras iguais em sua sequência não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

** F = Teste de F.

*** p = valor de p determina se a diferença nos desvios padrão ou variâncias é estatisticamente significativa, quanto menor, melhor é a precisão dos dados.

Silva et al. (2011) obtiveram resultados semelhantes aos encontrados na nossa pesquisa em seus estudos com *Penicillium chrysogenum*. Em sua análise enzimática, os IRE

encontrados variaram de 1,0 a 1,3. Resultados apresentados por Cunha et al. (2016) demonstraram atividade positiva proteolítica para diferentes espécies de *Penicillium*, onde foram obtidos índices para a atividade da enzima com valores entre 1,0 e 1,5.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos quanto à caracterização enzimática conclui-se que todos os isolados apresentaram atividade enzimática positiva para protease, com índice enzimático superior a 1,0. A análise semiquantitativa da enzima demonstrou variação no potencial enzimático entre os isolados testados de mesma espécie, destacando-se o isolado MEM C4(21) de *Penicillium chrysogenum* como maior produtor proteolítico. A forte atividade enzimática apresentada pelos isolados indica o potencial destes para utilização na degradação de substâncias oriundas de atividades industriais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao IFPE - *Campus* Recife pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. **Fungos de Interesse: Aplicações Biotecnológicas**. Universidade Estadual de Maringá – UEM. Revista UNINGÁ Review - Vol.21,nº 1, pp.55-59, 2015.
- AL-DOORY, Y.; DOMSON, J. F. **Mouldallergy**. Lea &Febiger, Philadelphia, 1984.
- AYRES, M., AYRES JÚNIOR, M., AYRES, D.L. & SANTOS, A.A. **BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. Ong Mimiraua. Belém, PA, 2007.
- CONESA A., PUNT P. J., VAN LUIJK N., VAN DEN HONDEL C. A. **The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view**. Fungal Genet. Biol, 2001.
- COOPER, G. M. **The Cell: A Molecular Approach**. Sinauer Associates, Sunderland, 2000.

CUNHA, J. R. B. et al . **Cultivo de *Penicillium* spp. em resíduos da colheita de soja para produção de celulase, protease e amilase.** Rev. Ceres, Viçosa , v. 63, n. 5, p. 597-604, Oct. 2016. Available from <[http://www.scielo.br /scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-737X2016000500597&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-737X2016000500597&lng=en&nrm=iso)>. access on 20 Feb. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/0034-737x201663050002>.

HAKI, G.D.; RAKSHIT, S.K. **Developments in industrially important thermostable enzymes: a review.** Bioresource Technology. p.17-34, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1016/S0960-8524%2803%2900033-6>

HOUBRAKEN, J.; DE VRIES, R. P.; SAMSON, R. A. **Modern taxonomy of biotechnologically important aspergillus and penicillium species.** Advances in Applied Microbiology, 2014.

MUZZI, M. R. S.; NEVES, L.; PAULA, M. T.; BRITO, M.; BRAVO, M.; DINIZ, N. **Taxonomia de criptógmas fungos: filo Basidiomycota.** Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciências Biológicas – ICB - Departamento de Botânica – Belo Horizonte, 2013.

PARK, M.S., et al.. **New record and enzyme activity of four species in *Penicillium* section Citrina from marine environments in Korea.** *J. Microbiol.*, Korea, p.219–225, 2015

PAZ JUNIOR, F. B. da *et al.* ISOLAMENTO DA MICOTA ANEMÓFILA PRESENTE NA SALA DE MEMORIAL DA BIBLIOTECA JOSEPH MESEL DO IFPE – CAMPUS RECIFE. In: GONÇALVES, Felipe Antonio Machado Fagundes *et al.* **Ensino de ciências e educação matemática 2.** Ponta Grossa: Atena Editora, 2019. *E-book*.

PEBERDY J. F. **Protein secretion in filamentous fungi—trying to understand a highly productive black box.** Trends Biotechnol, 1994.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. **Introduction to food and airborne fungi.** Centraalbureau voor Schimmelcultures, Netherlands, 2000.

SARATH, G.; DE LA MOTTE, R. S.; WAGNER, F. W. **Protease assay methods.** In: Beynon. R. J and Bond. J.S. (Eds.). *Proteolytic Enzymes. A Practical Approach.* Oxford University, 1989.

SERRANO, S. M. **The long road of research on snake venom serine proteases.** Toxicon, v. 62, p. 19 - 26, 2013.

SILVA, D. C. V. et al. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do Município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas.** Rev. Bras. Bot., São Paulo, v. 34, n. 4, p. 607-610, Dec. 2011. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84042011000400014&lng=en&nrm=iso>. Acessado em 20 Mar. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042011000400014>.

SOUZA, D. N. M.; Paz Junior, F. B.; Lyra da Paz, E.S. **Isolamento da micota anemófila presente na sala de memorial da biblioteca Joseph Mesel do IFPE – campus recife. III CONAPESC.** Disponível em http://www.editorarealize.com.br/revistas/conapesc/trabalhos/TRABALHO_EV107_MD4_SA17_ID1361_28052018210543.pdf, 2018.

SOBRAL, L. V. **Fungos anemófilos em ambientes climatizados: prevalência, produção de enzimas e atividade antibacteriana.** Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2016.

SOUZA, P. M. et al. **A biotechnology perspective of fungal proteases.** Braz. J. Microbiol., São Paulo, v.46, n.2, p.337-346, 2015. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151783822015000200337&lng=en&nrm=iso>. Accesson 20 Feb. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246220140359>.