

# CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E PROTEOLÍTICA DE *ASPERGILLUS NIGER* ISOLADO DO MEMORIAL DA BIBLIOTECA DO IFPE - CAMPUS RECIFE

Jonas Oliveira Varela da Costa <sup>1</sup>

Eliana Santos Lyra da Paz<sup>2</sup>

Lindeberg Rocha Freitas <sup>3</sup>

Francisco Braga da Paz Júnior <sup>4</sup>

## RESUMO

Os fungos anemófilos tem se destacado como um dos principais agentes causadores de infecções respiratórias em ambientes climatizados artificialmente, devido a sua potencialidade como produtor de enzimas extracelulares, principalmente as proteases. Em virtude disso, o presente trabalho teve como objetivo identificar e avaliar a habilidade do fungo anemófilo *Aspergillus niger* em produzir proteases. Para determinação da atividade proteolítica, discos de micélio provenientes de colônias jovens foram inoculados centralmente em placas de Petri contendo o meio ágar-leite. Avaliou-se a atividade enzimática pela formação de halos de degradação do fungo crescido no meio específico. O isolado fúngico testado mostrou reação positiva para produção enzimática, apresentando índice de relação enzimática superior a 2,0. Este dado sugere que o fungo em estudo é um micro-organismo promissor na produção de protease.

**Palavras-chave:** Fungo, Morfologia, *Aspergillus*, protease.

## INTRODUÇÃO

Enzimas são proteínas que atuam como catalisadores orgânicos, ou seja, acelerando reações químicas, apresentando grande interesse industrial, como exemplo têm-se as proteases. Devido à demanda cada vez maior da biotecnologia pelos catalisadores de

---

<sup>1</sup> Bolsista PIBIC do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia - Campus Recife - IFPE, [jovc@discente.ifpe.edu.br](mailto:jovc@discente.ifpe.edu.br);

<sup>2</sup> Profa. co-orientadora, Doutora, Universidade Estadual de Pernambuco - UPE, [eliana.lyra@upe.br](mailto:eliana.lyra@upe.br);

<sup>3</sup> Professor, Doutor, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco – Campus Pesqueira-IFPE, [lindebergrocha@pesqueira.ifpe.edu.br](mailto:lindebergrocha@pesqueira.ifpe.edu.br);

<sup>4</sup> Professor orientador: Prof. Doutor do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco – Campus Recife, [franciscobraga@recife.ifpe.edu.br](mailto:franciscobraga@recife.ifpe.edu.br).

Artigo proveniente de Projeto de pesquisa, com bolsa custeada pelo IFPE.

proteínas, uma ampla faixa de microrganismos (p.ex. fungos e bactérias) está sendo usada para obter enzimas. No setor industrial, as enzimas fúngicas equivalem a 60% da demanda do mercado (SOARES et al.,2010). Dentre os tipos de fungos utilizados para sintetizar enzimas, os fungos filamentosos possuem a capacidade de produzir uma ampla quantidade de biocatalisadores. Além da utilização dessas enzimas sintetizadas por fungos na área industrial, também há a importância delas na área médica, em virtude da virulência dos fungos serem associadas à produção de protease (TOMEI et al., 1997).

Devido à importância médica e biotecnológica das enzimas fúngicas, este trabalho teve como objetivo identificar e, após isso, avaliar a síntese proteolítica do fungo anemófilo da espécie *Aspergillus niger* para as proteases.

## METODOLOGIA

- **Local da pesquisa**

Os procedimentos experimentais foram realizados no laboratório de Biologia do IFPE – Campus Recife.

- **Amostra fúngica**

Utilizou-se nessa pesquisa a amostra C4(27) isolada e identificada como *Aspergillus* no Plano de Atividades intitulado “Prevalência de fungos anemófilos na Sala de Memorial da Biblioteca do IFPE – Campus Recife” (PIBIC 2017-2018) pertencente ao Projeto de Pesquisa “Fungos anemófilos isolados de setores do IFPE – Campus Recife: Prevalência e atividade enzimática”.

- **Identificação do fungo**

A confirmação do gênero e a identificação do isolado fúngico ao nível de espécie foi realizado através do estudo de características macroscópicas (diâmetro, cor e textura da colônia, presença ou ausência de rebordo, zonação e rugosidade) e microscópicas (hifas, conídios e esporos) e comparação com literaturas especializadas, tais como Singh et al (1991), Samson et al. (1996). Para melhor visualização das microestruturas, utilizou-se a técnica de microcultivo segundo metodologia de Riddell (1950). Após identificação, o isolado foi

Artigo proveniente de Projeto de pesquisa, com bolsa custeada pelo IFPE.

cultivado em placa de petri contendo meio Sabourand-Dextrose-Ágar e armazenados a 4°C para posterior análise enzimática

- **Atividade Proteolítica**

A atividade proteolítica da amostra foi testada mediante a hidrólise de caseína em meio ágar-leite, conforme metodologia descrita por Sarath et al. (1989). Cada placa contendo o citado meio foi inoculada centralmente com um disco de micélio (5 mm de diâmetro) de colônia jovem para crescimento em regime de alternância luminosa por 05 dias, em sala climatizada ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ). A leitura das placas foi feita a cada 24 horas.

A produção positiva de proteases foi observada nas placas de Ágar-leite pela formação de halos claros ao redor da colônia, os quais foram medidos com auxílio de uma régua e os resultados expressos em mm. O ensaio foi realizado com cinco repetições.

A atividade proteolítica foi determinada pelo Índice de Relação Enzimática ( $\text{IRE} = \mathbf{D/d}$ ), em que **D** corresponde à soma do diâmetro total da colônia com o diâmetro do halo de degradação e **d** equivale ao diâmetro da colônia sem o halo.

## DESENVOLVIMENTO

Os fungos são organismos eucariontes, aclorofilados, heterótrofos por absorção, de reprodução sexuada ou assexuada que produzem esporos (ALEXOPOULOS et al., 1996). Os fungos que se dispersam pelo ar são chamados de anemófilos. Dentre os diversos gêneros de fungos presentes no grupo dos anemófilos, o gênero *Aspergillus* destaca-se por possuir grande distribuição no ambiente e apresentar extensa utilização na biotecnologia devido a sua capacidade de produzir diversos tipos de substâncias, como exemplo as enzimas proteases que possuem ampla utilização nas indústrias alimentícias, de bebidas, farmacêuticas, têxteis, entre outras.

Com o avanço no conhecimento das enzimas, os fungos vêm adquirindo um status de destaque para vários tipos de indústrias uma vez que existe a possibilidade de utilizá-las para melhorar vários aspectos do produto final. (SOARES, et al., 2010, p.701).

Além da importância industrial e comercial as enzimas proteolíticas, possuem importante atuação na virulência dos fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente o

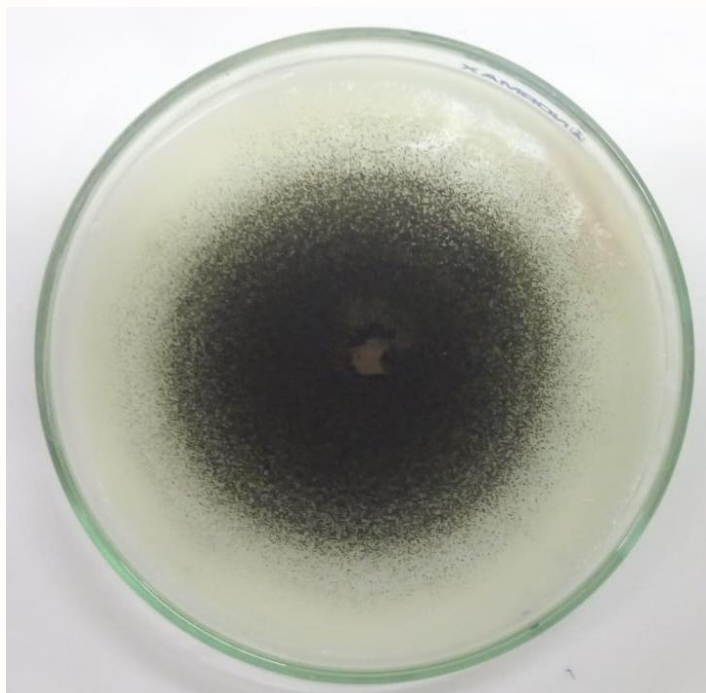
Artigo proveniente de Projeto de pesquisa, com bolsa custeada pelo IFPE.

*Aspergillus fumigatus*. A protease faz com que as células pulmonares descamem, diminuindo a barreira física e facilitando a fixação e invasão do fungo (TOMEI et al., 1997). Alguns gêneros de *Aspergillus* têm grande importância na área médica por serem responsáveis por doenças graves em pacientes imunodeprimidos (KOSMIDIS; DENNING, 2015) atuando como oportunistas, se aproveitando do estado imunodeprimido do hospedeiro e se fixando em locais do corpo, principalmente as vias aéreas superiores. Conforme observado por Lima et al. (2017), fungos *Aspergillus* de águas de consumo da população apresentaram capacidade de produzir enzimas proteases.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto a identificação o isolado fúngico foi identificado como pertencente a espécie *Aspergillus niger* por apresentar colônia bastante pulverulenta de coloração negra (figura 1). Microscopicamente por apresentar conídios globosos, rugosos e negros; conidióforos com estipe de parede lisa, longo e hialino; vesículas esféricas e hifas hialinas ou levemente pigmentadas próximo ao ápice, presença de métulas e fiálides.

Figura 1. Aspectos macroscópicos da colônia de *Aspergillus niger* em meio Sabourand-Dextrose-Ágar .



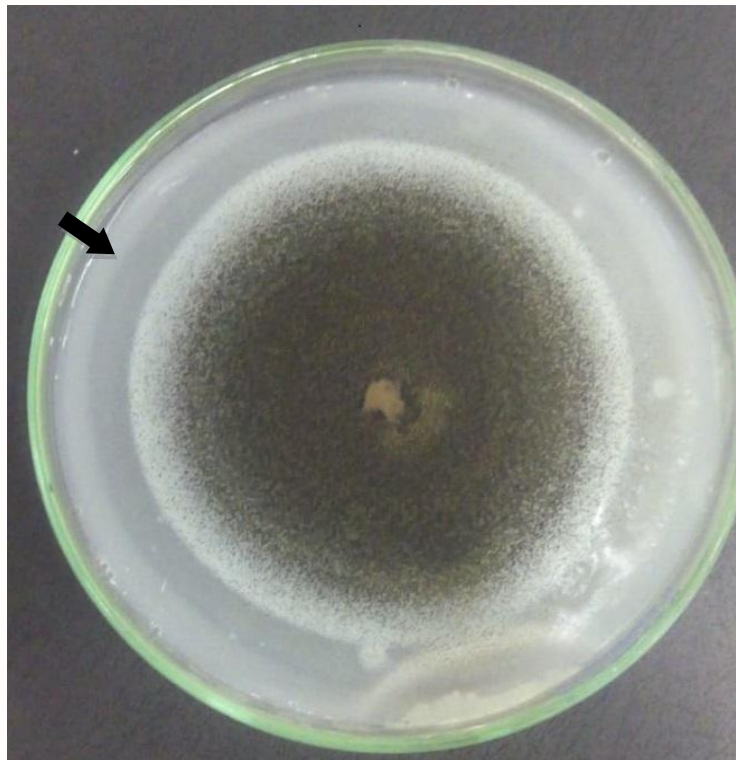
Fonte: Autor, 2018.

Artigo proveniente de Projeto de pesquisa, com bolsa custeada pelo IFPE.

Em estudos sobre a prevalência de fungos anemófilos isolados de ambientes fechados e climatizados realizados por Souza et al. (2019) e Almeida et al. (2019) relataram uma grande incidência de fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus*.

Quanto à capacidade em degradar o meio específico, o isolado apresentou reação positiva para protease, evidenciado pela formação de um halo translúcido ao redor da colônia (figura 2). Os resultados para produção de protease contrastam com os obtidos por Wenzel et al. (2013), em que fungos endofíticos do gênero *Aspergillus* isolados de soja não apresentaram atividades proteolítica, enquanto que neste trabalho apresentaram alto índice enzimático.

Figura 2. Aspectos macroscópicos de *Aspergillus niger* em placa de Petri contendo meio ágar-leite (seta indicando o halo de degradação).

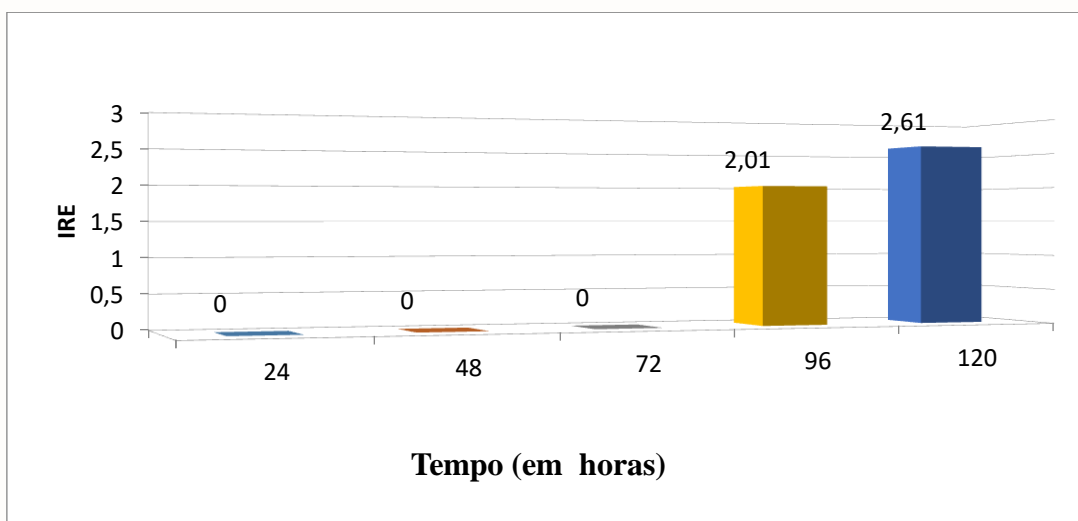


Fonte: O autor, 2018.



Quanto ao Índice de Relação Enzimática, *Aspergillus niger* alcançou valor do índice superior a 2,0 nas primeiras 96 horas de crescimento no meio específico (figura 3), o que indica esse isolado como promissor na produção de protease. Índices enzimáticos semelhantes foram obtidos por Maffessoni et al. (2017) ao avaliarem a atividade de *Aspergillus niger* nas 120 horas iniciais de incubação em meio suplementado com hemácia suína. De acordo com Lealem e Gashe (1994) um microrganismo bom produtor de enzimas deve apresentar o valor do índice de relação enzimático igual ou maior que dois.

**Figura 3.** Gráfico dos valores médios de IRE ao longo do tempo de crescimento da colônia de *Aspergillus niger* em meio proteolítico.



**Fonte:** O autor, 2019.

Estudos realizados por Malathi (1990) e Charles et al. (2008) também reforçam os nossos achados na pesquisa quanto a capacidade de síntese enzimática de proteases pelo gênero *Aspergillus*.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O *Aspergillus niger* apresentou forte produção enzimática, apresentando reação positiva e índice enzimática superior a 2, sugerindo que esse micro-organismo tem alto potencial biotecnológico.

Artigo proveniente de Projeto de pesquisa, com bolsa custeada pelo IFPE.

## Agradecimentos

Ao IFPE - *campus* Recife pela concessão de bolsa do PIBIC- técnico.

## REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4 ed. New York: John Wiley & Sons, 1996, p.865.
- ALMEIDA, T. L. et al. PREVALÊNCIA DE FUNGOS ANEMÓFILOS COLETADOS NA SALA DE ACERVOS DA BIBLIOTECA DO IFPE – CAMPUS RECIFE. *In*: GONÇALVES, F. A. M. F (Org). **Ensino de Ciências e Educação Matemática 2**. Minas Gerais: Atena Editora, 2019, p.177-182.
- SOUZA, D. N. M. et al. ISOLAMENTO DA MICOTA ANEMÓFILA PRESENTE NA SALA DE MEMORIAL DA BIBLIOTECA JOSEPH MESEL DO IFPE – CAMPUS RECIFE. *In*: GONÇALVES, F. A. M. F (Org). **Ensino de Ciências e Educação Matemática 2**. Minas Gerais: Atena Editora, 2019, p.149-154.
- CHARLES, P. et al. Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v.48, p.347-352, 2008.
- DE LIMA, A. K. S. et al. Fungos isolados da água de consumo de uma comunidade ribeirinha do médio Rio Solimões, Amazonas-Brasil: Potencial patogênico. **Revista Ambiente e Água**, 2017.
- KOSMIDIS, C.; DENNING, D. W. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. **Postgraduate Medical Journal**, v. 91, n. 1077, p.403-410, 2015.
- LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, p. 348-352, 1994.
- MAFFESSIONI, C.; SCHUSTER, F.P.W, SCHITTLER, L.; KEMPKA, A.P. Atividade proteolítica de *Aspergillus niger* em meio suplementado com hemácia suína. **27º Seminário de Iniciação Científica**, 2017, p.1-2.
- MALATHI, S.; CHAKRABORTY, R. Production of Alkaline Protease by a New *Aspergillus flavus* Isolate under Solid-Substrate Fermentation Conditions for Use as a Depilation Agent. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, Madra, v.57, n.3, p.712-716, 1991.
- SAMSON, R. A. et al. Introduction to food-borne fungi. Inglaterra: **Centraalbureau voor Schimmelculture**, 1996.
- 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 Oxford. p. 22-55.

Artigo proveniente de Projeto de pesquisa, com bolsa custeada pelo IFPE.

SOARES, I. A. et al. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo Filamentoso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 700–705, 2010.

TOMEI, J. F. C. et al. Proteases from *Aspergillus fumigatus* Induce Release of Proinflammatory Cytokines and Cell Detachment in Airway Epithelial Cell Lines. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.176, n.1, p.300-303, 1997.

WENZEL, J. B. et al. ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ANTIMICROBIANA DE FUNGOS Endofíticos Isolados De Soja. **Perspectivas on line, Ciências biológicas da saúde**, v. 9, n. 3, p. 1–15, 2013.