

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E POS GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

**CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE FUNGOS LIPOLÍTICOS  
AMAZÔNICOS PARA MELHORAMENTO BIOTECNOLÓGICO DE  
ÓLEO DE PESCADO**

Bolsista: Euclides Luis Queiroz de Vasconcelos Santos

**Manaus  
2012**

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E POS GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL  
PIB – A – 0038/2011

**CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE FUNGOS LIPOLÍTICOS  
AMAZÔNICOS PARA MELHORAMENTO BIOTECNOLÓGICO DE  
ÓLEO DE PESCADO**

---

Bolsista: Euclides Luis Queiroz de Vasconcelos Santos, CNPq.

---

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Antônio José Inhamuns

---

Co-orientador: M. Sc. Hérlon Mota Atayde

**Manaus  
2012**

## Resumo

Foram avaliadas 10 cepas de fungos amazônicos provenientes da Coleção de Culturas DPUA, Departamento de Parasitologia, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), para posterior aplicação no melhoramento biotecnológico do óleo de peixes. As cepas foram reativadas em meios seletivos e submetidas à autenticação (confirmação de espécie) conforme literatura especializada. Todas as culturas foram reativadas, salientando a eficácia do método de conservação aplicado. No entanto, apenas 7 cepas expressaram as características específicas conforme a chave taxonômica utilizada. As outras 3 cepas não autenticadas expressaram tamanhos e formas distintos daqueles atribuídos para aquelas espécies. As cepas autenticadas foram caracterizadas quanto ao potencial lipolítico e ao grau de toxicidade. Após 7 dias de crescimento em meio CYA. As espécies potencialmente lipolíticas foram submetidas à produção de biocompostos por fermentação submersa em Caldo Extrato de Levedura (YES) contendo  $10^6$  esporos/mL, durante 7 dias, a 25°C e 180 rpm. Após esse período, a biomassa foi separada do extrato bruto por filtração a vácuo e o pH desses extratos foram ajustados a 6,5. Esses extratos foram posteriormente utilizados no bioensaio de toxicidade contra larvas de *Artemia salina*, cultivada a 30°C/140 rpm/24 horas, sob iluminação constante, em solução de sal marinho não-iodado 3% (p/v), pH 6,5 previamente esterilizada a 121°C/45 min. Todos os fungos foram considerados altamente tóxicos, considerando a alta taxa de mortalidade (100%) das larvas, verificada no bioensaio. Devido esse resultado, os fungos analisados são potenciais produtores de metabólitos tóxicos ao homem e, portanto, considerados inviáveis para utilização como fonte de enzimas importantes para o melhoramento biotecnológico de óleos de peixes.

**Palavras-chave:** Microrganismos amazônicos, potencial de toxicidade, concentração de lipídios.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	5
2	JUSTIFICATIVA .....	8
3	OBJETIVOS .....	9
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	10
4.1	Importância dos óleos de pescado para a saúde humana e animal.....	10
4.1.2	Formas de extração de óleo de pescado .....	10
4.1.3	Formas de utilização de óleo de pescado .....	10
4.1.4	Generalidades sobre fungos, enzimas lipolíticas e sua aplicação em óleos de pescado .....	11
4.1.5	Fungos filamentosos .....	11
4.2	Formas de conservação de fungos em coleções de cultura .....	12
4.2.1	Enzimas lipolíticas.....	12
4.2.2	Generalidades sobre <i>Artemia salina</i> e ensaios de toxicidade .....	13
4.2.3	Aspectos bioecológicos da <i>Artemia salina</i> .....	13
4.2.4	Utilização da <i>Artemia salina</i> em ensaios de toxicidade .....	14
5	METODOLOGIA.....	15
5.1	Material e métodos.....	15
5.1.2	Bioensaio de toxicidade contra <i>Artemia salina</i> .....	16
5.1.3	Eclosão de cistos de <i>Artemia salina</i> .....	17
5.1.4	Bioensaio de toxicidade .....	17
5.2	Seleção do microorganismo a ser utilizado para produção de lipase.....	18
5.2.2	Produção de lípases por fermentação submersa.....	18
5.2.3	Determinação da atividade lipolítica.....	19
5.2.4	Análise estatística .....	20
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
7	CONCLUSÃO.....	24
8	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....	25
9	CRONOGRAMA DE ATIVIDADES .....	28

## 1 INTRODUÇÃO

Óleos de pescado despertam grande interesse na indústria por serem usados em uma variedade de produtos farmacêuticos, incluindo anticolesterolêmicos, antiinflamatórios e trombolíticos, além de aplicação como aditivo alimentício. Os efeitos observados são devidos os ácidos graxos de cadeia longa presentes nesses óleos, entre eles os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), considerados essenciais para o desenvolvimento físico e mental de crianças (CARVALHO et al., 2003; SIJTSMA; SWAAF, 2004; ESPINOSA, 2008; LEE et al., 2008).

Na indústria de alimentos, a maioria das enzimas lipolíticas é de origem microbiana, principalmente obtidas de fungos e aplicadas para a obtenção de ácidos graxos livres, conferindo particularidades físico-químicas, organolépticas e nutricionais a diversos alimentos (PINHEIRO, 2006). No entanto, para utilização de metabólitos microbianos pela indústria de alimentos, necessita-se de avaliação quanto a capacidade de produzirem compostos tóxicos a saúde dos consumidores. Entre as diversas técnicas desenvolvidas e atualmente utilizadas com esta finalidade, destacam-se os ensaios de toxicidade utilizando o micro crustáceo *Artemia salina*, devido a praticidade, rapidez, baixo custo financeiro e alta correlação ( $r=0,85 - p<0,05$ ) com os demais ensaios dessa natureza empregando ratos de laboratório (PARRA et al., 2001; CARBALLO et al., 2002; RICE; MANESS, 2004; FAVILLA et al., 2006).

Segundo Stappen (1996), a temperatura ótima para eclosão de cistos e manutenção de náuplios de *Artemia salina* está entre 25°C e 28°C, entretanto, Treece (2000) afirma que a *Artemia* tolera ampla variação de temperatura, com valores entre 15°C e 50°C. As mortalidades na eclosão da *Artemia* inferiores a

10% são observadas quando os náuplios são mantidos em temperaturas entre 20°C e 25°C (LAVES; SORGELOOS,1996), observando-se redução da sobrevivência conforme diminuição da salinidade ou origem dos cistos (STAPPEN, 1996; TREECE, 2000).

Nas décadas passadas, se considerava que somente peixes marinhos apresentavam quantitativo expressivo de EPA e DHA. Porém, várias pesquisas utilizando peixes de água doce, oriundos da Região Amazônica, incluindo as partes consideradas resíduos, contrariaram essa afirmação (INHAMUNS; FRANCO, 2001; 2008). Apesar dessa riqueza, dados sobre o uso de espécies de fungos isolados de substrato amazônico no enriquecimento desses óleos são inexistentes.

Fungos	Autenticação (+/-)	Potencial lipolítico (+/-)	Mortalidade (%)	Toxicidade
<i>Aspergillus carneus</i> DPUA 1560	+	+	100	AT
<i>Aspergillus flavo-furcatis</i> DPUA 1539	+	+	100	AT
<i>Aspergillus flavus</i> DPUA 933	+	+	100	AT
<i>Penicillium citrinum</i> DPUA 1617	+	+	100	AT
<i>Penicillium janczewskii</i> DPUA 1669	+	+	100	AT
<i>Penicillium janthinellum</i> DPUA 1668	-	NR	NR	NR
<i>Penicillium lividum</i> DPUA 1661	+	+	100	AT
<i>Penicillium miczynskii</i> DPUA 1667	+	+	100	AT
<i>Penicillium simplicissimum</i> DPUA 1666	-	NR	NR	NR
<i>Penicillium waksmanii</i> DPUA 1670	-	NR	NR	NR

Tabela 1. Autenticação de cepas, potencial lipolítico e toxicidade de fungos reativados da Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas

Legenda: (+)positivo; (-)negativo; NR=não realizado; AT = Altamente tóxico

Na etapa preliminar desse trabalho, NASCIMENTO (2011) - (Tabela 1), foram selecionados dez fungos isolados de peixes, os quais apresentaram significativo potencial lipolítico, não foram reconhecidamente inócuos à saúde humana (GRAS – *Generally Recognized As Safe*) os respectivos extratos brutos apresentaram alto índice de mortalidade. O único exemplar previamente apontado como não tóxico não apresentou viabilidade após conservação em água destilada.

## 2 JUSTIFICATIVA

Diante desses dados e do conhecimento de pesquisas locais em andamento cujo objeto de estudo, são óleos de pescado da região, foram necessárias pesquisas complementares selecionando-se outros exemplares de fungos isolados de substratos com menor conteúdo protéico, preferencialmente frutos com alto conteúdo lipídico. Nesse estudo, efetuou-se a quantificação do potencial lipolítico, adicionalmente ao reconhecimento de perfil GRAS pelo bioensaio de toxicidade utilizando *Artemia salina*, para posterior apresentação de uma alternativa de uso e valorização do potencial biotecnológico regional na obtenção e melhoramento de produtos genuinamente amazônicos.



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Caracterizar fungos isolados de substrato amazônico e selecionar espécies GRAS para obtenção de enzimas lipolíticas destinadas ao melhoramento biotecnológico de óleo de pescado.

#### **3.2 Específicos**

- Reativar e autenticar fungos conservados na Coleção de Culturas da Universidade Federal do Amazonas.
  
- Analisar potencial de toxicidade dos fungos autenticados contra *Artemia salina*.
  
- Quantificar a atividade lipolítica desses fungos.

## **4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1 Importância dos óleos de pescado para a saúde humana e animal**

Estudos têm demonstrado que o consumo de óleo de pescado rico em ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) da família ômega-3 está associado a uma série de benefícios ao sistema cerebral, sistema cardiovascular e na prevenção de determinados tipos de câncer (CREXI, 2005).

Durante o armazenamento e processamento do peixe, são os ácidos graxos altamente insaturados que primeiramente sofrem o processo oxidativo, quando o oxigênio atmosférico é dissolvido no óleo e reage com os mesmos. Tais ácidos são mais reativos quanto maior o número de insaturações em sua cadeia (ANDRADE, 2009).

#### **4.1.2 Formas de extração de óleo de pescado**

Um subproduto que vem da indústria processadora de pescado é o óleo de peixe, extraído industrialmente a partir da elaboração da farinha de peixe, a partir de processos hidrotérmicos e mecânicos. Essas operações, na qual se estima a utilização de um terço da captura mundial, fornecem um óleo bruto de baixa qualidade, não podendo ser utilizado para consumo direto pela população humana (ANDRADE, 2009).

#### **4.1.3 Formas de utilização de óleo de pescado**

O óleo do peixe tem sido utilizado há vários anos na elaboração de alimentos, principalmente margarina, porque são de considerável interesse bioquímico, metabólico, nutricional e farmacêutico. Outros produtos

alimentícios em que são utilizados os óleos de peixes são os óleos de enlatados (ANDRADE, 2009).

No Brasil, o óleo de peixe é usado basicamente em curtumes, na fabricação de tintas e vernizes, como lubrificante, impermeabilizante e acabamentos de couro e em cápsulas contendo concentrado de ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (ANDRADE, 2009), além de fornecer as vitaminas lipossolúveis A, D e E (CREXI, 2005).

#### **4.1.4 Generalidades sobre fungos, enzimas lipolíticas e sua aplicação em óleos**

##### **4.1.5 Fungos filamentosos**

Fungos filamentosos constituem um grupo onipresente de organismos que exploraram quase todos os nichos ecológicos na Terra. Estima-se que eles são responsáveis pela deterioração de até 25% de todos os derivados de plantas e alimentos produzidos anualmente. Os mais conhecidos são *Penicillium* e *Aspergillus* que produzem uma gama extensiva de metabólitos secundários após completarem sua fase exponencial de crescimento (CORRÊA, 2003; FREIRE et al., 2005).

Muitos destes fungos também são responsáveis por uma elevada incidência global de micotoxinas, um tipo de metabólito secundário responsável pela resposta tóxica chamada micotoxicose após animais superiores e humanos ingerirem gêneros alimentícios contaminados (FREIRE et al., 2005).

#### **4.2 Formas de conservação de fungos em coleções de cultura**

A manutenção de fungos em certos meios de cultura exige muitos cuidados porque esses meios são consumidos rapidamente, as culturas

exigem amostragens freqüentes e, conseqüentemente, tempo para manipulação. Devido a estas dificuldades, métodos alternativos para a conservação dos fungos foram desenvolvidos, por exemplo, óleo mineral, areia, sílica-gel, água destilada. A liofilização e a conservação em nitrogênio líquido são alternativas mais recentes e inovadoras, mesmo que os resultados sejam variados (DIOGO et al., 2005).

#### **4.2.1 Enzimas lipolíticas**

Pelo uso de enzimas criou-se oportunidade para o desenvolvimento perfeito em química industrial sustentável e moderna, devido à especificidade econômica excelente, tendo condições de reação suave, processo de economia de energia e simplicidade (LI; ZONG, 2010).

Entre as diversas enzimas existentes, as enzimas lipolíticas verdadeiras (triacilglicerol acilhidrolases E.C.3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol (TAG) fornecendo diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), glicerol e ácidos graxos livres. Esta definição exclui as enzimas que agem em ésteres solúveis em água (esterases) ou que hidrolizam outros lipídios (acilidrolases, colesterolsterase, tioesterases e outras) (CARVALHO et al., 2003; TREICHEL et al., 2009).

Estas enzimas encontram-se largamente distribuídas na natureza, inclusive produzidas por microrganismos, sendo as mais utilizadas industrialmente porque, além de apresentarem procedimentos mais simples de isolamento a partir do caldo fermentativo, são mais estáveis e com propriedades bem mais diversificadas que as lipases de outras fontes e são, em sua maioria, extracelulares. O interesse em utilizar estes biocatalisadores na modificação estrutural de óleos e gorduras tem recebido considerável

atenção devida sua especificidade em relação ao substrato (CARVALHO et al., 2003).

#### **4.2.2 Generalidades sobre *Artemia salina* e ensaios de toxicidade**

#### **4.2.3 Aspectos bioecológicos da *A. salina***

*A. salina* tem uma distribuição geográfica ampla. As espécies do gênero possuem uma rara adaptabilidade às condições extremas, assim sendo encontrados em ambientes com outras formas de vida não sustentáveis. As diferentes espécies do gênero *Artemia* apresentam uma característica comum, ou seja, sua forte adaptabilidade a ambientes de salinidade alta, tais como, lagos de água salgada, lagoas costeiras e salinas provocadas pelo homem onde a evaporação da água do mar resulta em concentrações elevadas de cloreto de sódio (NUNES et al., 2005). É uma espécie de microcrustáceo marinho da ordem Anostraca. É considerado um bioindicador devido ao seu reduzido e específico grau de tolerância a um determinado fator ambiental, de modo que apresente uma resposta nítida face a pequenas variações na qualidade do ambiente. Tem sido utilizada em testes de toxicidade devido à sua capacidade para formar cistos dormentes, fornecendo, desse modo, material biológico que pode ser armazenado durante longos períodos de tempo (superiores a seis meses) sem perda de viabilidade e sem necessidade de se manter culturas contínuas de organismos-teste, além de ser uma espécie de fácil manipulação (BAROSA et al., 2003).

#### **4.2.4 Utilização da *A. salina* em ensaios de toxicidade**

Bioensaios de toxicidade são úteis para avaliar a exposição de uma grande variedade de extratos (microbiano, animal, vegetal ou mineral) no crescimento ou sobrevivência de um determinado organismo – coelhos, ratos, camundongos, entre outros (RICE; MANESS, 2004).

Em condições favoráveis, cistos de *A. salina* são eclodidos e as larvas podem ser usadas em testes toxicológicos in vitro, quando se verifica uma boa relação entre a letalidade alcançada no teste e a detecção de compostos tóxicos (CARBALLO et al., 2002; RICE; MANESS, 2004; FAVILLA et al., 2006).

Na região amazônica ensaios de toxicidade contra *Artemia* utilizaram extratos brutos de fungos filamentosos isolados de rações extrusadas para peixe, constatando-se maior ocorrência de potenciais produtores de metabólitos tóxicos (ATAYDE, 2010).

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Material e Métodos

1 – *Microrganismos* - Os microrganismos utilizados nos ensaios foram dez cepas de fungos, todos provenientes de substratos amazônicos (Tabela 2), conservados sob água destilada esterilizada e armazenados na Coleção de Culturas DPUA – UFAM.

1	<i>Aspergillus candidus</i> DPUA 1577	6	<i>Penicillium janczewskii</i> DPUA 1673
2	<i>Aspergillus flavo-furcatis</i> DPUA 1623	7	<i>Penicillium janthinellum</i> DPUA 1660
3	<i>Aspergillus oryzae</i> DPUA 1624	8	<i>Penicillium miczynskii</i> DPUA 1674
4	<i>Penicillium bilaiae</i> DPUA 1602	9	<i>Penicillium paxilli</i> DPUA 1574
5	<i>Penicillium janczewskii</i> DPUA 1672	10	<i>Penicillium simplicissimum</i> DPUA 1671

Tabela 2: Relação dos fungos conservados sob água destilada e armazenados na Coleção de Culturas DPUA – UFAM pré-selecionados para esta pesquisa

2 – *Reativação* - Todos os microrganismos provenientes da Coleção DPUA – UFAM foram reativados em meios seletivos para cada taxa, como exemplo o Ágar CYA, conforme literatura especializada.

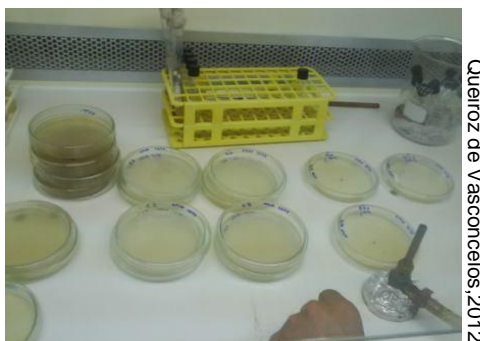


Figura 1 :Reativação dos fungos

3 – *Autenticação* - Todos os microrganismos reativados foram submetidos à confirmação da espécie (Figura 2). Previamente, as espécies de *Penicillium* foram cultivadas em vários meios de cultura, sob variadas temperaturas de incubação (Figura 3). Por sua vez, as espécies de *Aspergillus* foram cultivadas em dois diferentes meios de cultura (CYA e CZ), ambos utilizando a mesma temperatura de incubação. Em seguida, foram efetuadas

comparações das características macro e microscópicas com aquelas presentes em literatura especializada para cada taxa.



Queiroz de Vasconcelos, 2012

Figura 2: Autenticação dos fungos

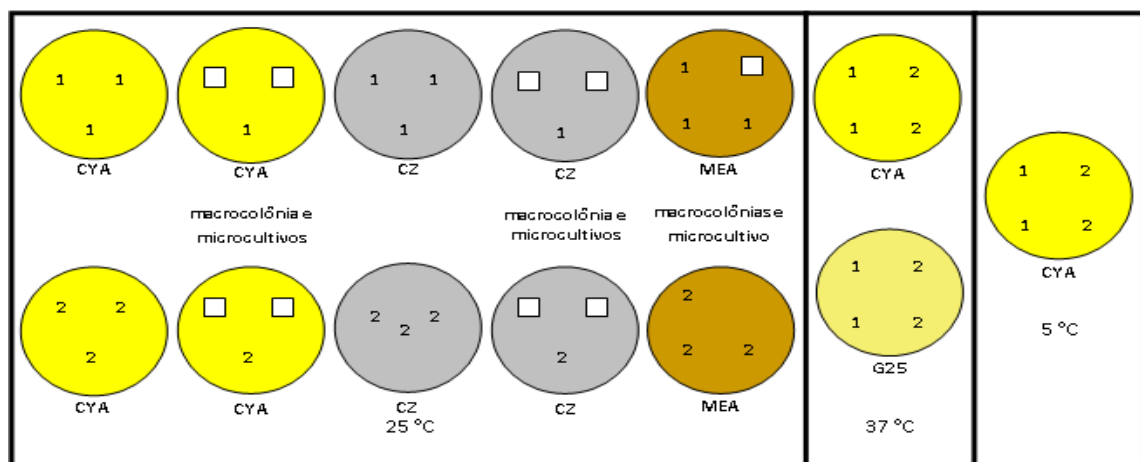


Figura 3. Esquema para autenticação de espécies de *Penicillium*

As espécies autenticadas foram submetidas ao ensaio de toxicidade.



### **5.1.2 Bioensaio de toxicidade contra *Artemia salina***

*Produção de biocompostos - fermentação submersa* - Para produção de biocompostos foi utilizado 20 mL de meio líquido: extrato de levedura 2% (p/v) sacarose 15% (p/v) – YES, em frasco de Erlenmeyer de 125 mL. Uma alíquota de suspensão de esporos de culturas puras foi transferida para o YES, de maneira a se obter  $5 \times 10^6$  esporos/mL. Os cultivos foram incubados a 25°C, 180 rpm, durante sete dias (HARWIG; SCOTT, 1971; SALLENAVE-NAMONT et al., 2000; ATAYDE, 2008).

Após esse período, a biomassa foi separada do extrato bruto por filtração a vácuo. O pH dos extratos brutos foram ajustados a 6,5 e posteriormente utilizados no bioensaio em larvas de *A. salina* (HARWIG; SCOTT, 1971; SALLENAVE-NAMONT et al., 2000; ATAYDE, 2008).

### **5.1.3 Eclosão dos cistos de *A. salina***

Para eclosão dos cistos de *A. salina* foi adicionado 0,1 mg de cistos comerciais em 100 mL de solução de sal marinho não-iodado 3% (p/v), marca OCEANIC®, pH 6,5, esterilizada a 121°C/45 min em frasco de Erlenmeyer de 500 mL. Os frascos de Erlenmeyer foram incubados a 30°C, 140 rpm, durante 28 horas, sob iluminação constante (HARWIG; SCOTT, 1971; RICE; MANESS, 2004; ATAYDE, 2008).

### **5.1.4 Bioensaio de toxicidade**

Cada bioensaio foi realizado em placa multipoço 6x4. Em cada poço inoculou-se 300 µL de extrato bruto e 1000 µL de suspensão de larvas de *A. salina*. Como controle utilizou-se larvas em solução salina. Todos os testes

foram realizados em triplicata. As placas foram mantidas sob luminosidade (40 watts) e temperatura (30°C) constantes, por 24 horas. Após esse período, a mortalidade de *A. salina* foi determinada em estereomicroscópio com base na imobilidade interna ou externa, durante 20 segundos (HARWIG; SCOTT, 1971; FORGIARINI, 2006).

Ao término da contagem dos náuplios mortos, 500 µL de formol foi adicionado em cada poço para contagem do total de larvas presentes. A taxa de mortalidade foi determinada em  $\% \text{ mortalidade} = (\text{número de indivíduos mortos} \times 100) \div \text{número total de indivíduos}$  e o grau de toxicidade foi classificado de acordo a mortalidade observada: 0-9% = não tóxico(NT); 10-49% = ligeiramente tóxico(LT); 50-89% = tóxico(T); 90-100% = altamente tóxico(AT) (HARWIG; SCOTT, 1971; FORGIARINI, 2006). Quando se constatar à mortalidade no controle, o índice de mortalidade observado nos extratos será corrigido conforme a fórmula:  $\% \text{ mortalidade corrigido} = \% \text{ entre sobreviventes no branco} - \% \text{ de sobreviventes no tratamento}$  (HARWIG; SCOTT, 1971; GONZÁLEZ et al., 2007).

## **5.2 Seleção do microrganismo a ser utilizado para produção de lipases**

Todos os fungos submetidos ao bioensaio de toxicidade contra *A. salina* foram submetidos à fermentação em meio líquido, conforme descrição abaixo (HABA et al., 2000).

### **5.2.2 Produção de lipases por fermentação submersa**

A produção das lipases pelas espécies selecionadas foi realizada por fermentação submersa em meio de cultivo contendo peptona 8%, extrato de levedura 1%, cloreto de sódio 3% e óleo de oliva extra-virgem 1% esterilizados

a 121 °C, durante 15 minutos. Uma alíquota de suspensão de esporos de culturas puras foi transferida para o meio de cultivo, de maneira a se obter  $2 \times 10^6$  esporos/mL. Os cultivos foram incubados a 28°C, 150 rpm, durante 72 horas.

Após esse período, as amostras foram filtradas em papel de filtro Whatman nº 4 e o sobrenadante será utilizado para determinação da atividade lipolítica.

### **5.2.3 Determinação da atividade lipolítica**

Para determinação da atividade lipolítica foi utilizada emulsão contendo óleo de oliva 10% (p/v), goma arábica 5% (p/v) e tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0. Dessa emulsão, 18 mL foram acondicionados em erlenmeyers de 125 mL, no qual foram adicionados 2 mL das amostras provenientes da fermentação submersa. A incubação foi realizada a 37°C, 150 rpm, durante 15 minutos.

Ao final desse período, a reação foi interrompida e os ácidos graxos foram extraídos após adição de 20 mL de solução de acetona:etanol (1:1, v/v) e titulados com hidróxido de sódio 0,05 M, até pH 11 (Figura 4). Os brancos foram as amostras da fermentação imediatamente misturadas ao etanol e submetidos à titulação.



Figura 4: Determinação da atividade lipolítica

Os ensaios foram realizados em triplicata e a média obtida foi utilizada para o cálculo de atividade lipolítica, através de fórmula adequada  $[A = [(V_a - V_b) \times M \times 1000] / (T \times V_c)]$ , onde A = atividade lipolítica (em U/mL),  $V_a$  = volume de amostra titulada (em mL),  $V_b$  = volume do branco titulado (em mL),  $V_c$  = volume da amostra usada na reação (em mL), t = tempo de reação (em min) e M = molaridade da solução de NaOH. Todos os experimentos foram conduzidos na Unidade de Procedimentos Microbiológicos do Laboratório de Tecnologia do Pescado, da Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas.

#### **5.2.4 Análises estatísticas**

Foram determinadas as médias dos resultados obtidos, sendo estas comparadas com as tabelas específicas.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos experimentos aplicados nessa pesquisa estão demonstrados na Tabela 3.

Fungos	Autenticação (+/-)*	Potencial lipolítico (U/mL)**	Mortalidade (%)	Toxicidade
<i>Aspergillus candidus</i> DPUA 1577	-	NR***	NR	NR
<i>Aspergillus flavo-furcatis</i> DPUA 1623	-	NR	NR	NR
<i>Aspergillus oryzae</i> DPUA 1624	+	24,9±0,8	100	AT****
<i>Penicillium bilaiae</i> DPUA 1602	+	23,2±1,2	100	AT
<i>Penicillium janczewskii</i> DPUA 1672	+	25,8±0,8	100	AT
<i>Penicillium janczewskii</i> DPUA 1673	+	20,0±0,9	100	AT
<i>Penicillium janthinellum</i> DPUA 1660	+	22,3±1,9	100	AT
<i>Penicillium miczynskii</i> DPUA 1674	+	21,2±0,7	100	AT
<i>Penicillium paxilli</i> DPUA 1574	-	NR	NR	NR
<i>Penicillium simplicissimum</i> DPUA 1671	+	26,2±0,2	100	AT

**Tabela 3:** Autenticação de cepas, potencial lipolítico e toxicidade de fungos reativados da Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas

Legenda: \*(+)positivo; (-)negativo; \*\*Média e desvio padrão; \*\*\*NR=não realizado; \*\*\*\*AT=Altamente Tóxico

A autenticação positiva não aconteceu em todos os exemplares de fungos filamentosos reativados. Os fungos que não obtiveram autenticação foram *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1623, *Penicillium paxilli* DPUA 1574 e *Aspergillus candidus* DPUA 1577, pois apresentaram pleomorfismo, onde apresentaram variados tamanhos e formas, diferentes dos que apresentam na

chave de identificação de cada espécie, ou seja, alteração morfológica, ao contrário dos demais.

Somente os fungos autenticados, foram submetidos a quantificação da atividade lipolítica, onde uma unidade de atividade lipásica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1mmol de ácido graxo por minuto (LEAL, 2000). Os fungos amazônicos utilizados nessa pesquisa apresentaram valores entre 20-26,2 U/mL, superiores ao detectado em *Penicillium verrucosum* (3,48 U/mL) por Pinheiro (2006). Ainda, apesar de uma necessária verificação, os fungos testados nesse trabalho mostram-se promissores quanto à manutenção dessa atividade em tempo superior ao verificado na pesquisa de Pinheiro (2006).

O bioensaio de toxicidade contra *Artemia salina* (figura 5) demonstrou que os extratos brutos obtidos foram altamente tóxicos, conseqüentemente, ocasionando a morte de todos os náuplios de *A. salina*, conforme mostra a tabela 3.

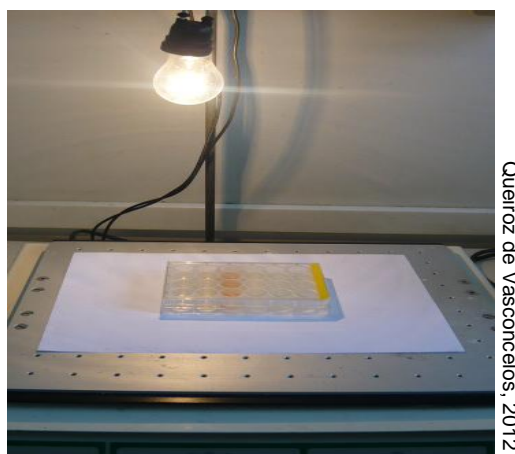


Figura 5 Bioensaio de toxicidade dos extratos brutos de fungos amazônicos contra *Artemia salina*

Os percentuais de extratos fúngicos considerados como tóxicos (100%) nessa pesquisa foi bastante superior ao de Gonzáles (2007), quando detectou

somente 10% das amostras de extrato dos fungos *Penicillium* e *Aspergillus* como tóxicas e altamente tóxicas.

Um elevado percentual de cepas tóxicas também foi verificado nos isolados de rações para peixes (ATAYDE et al.; 2010) e nas cepas testadas na etapa anterior dessa pesquisa (NASCIMENTO, 2011)

## 7 CONCLUSÃO

Os fungos isolados de substrato amazônico utilizados nessa pesquisa, armazenados na Coleção de Cultura DPUA-UFAM, da mesma forma que os resultados detectados na etapa anterior, apresentaram significativa atividade lipolítica.

Os fungos isolados não podem ser considerados como fonte segura para produção de enzimas destinadas ao melhoramento biotecnológico de óleo de pescado, devido a alta toxicidade verificado no bioensaio contra *A. salina*.

Há necessidade de verificação de outras cepas conservadas, para constatação de uma espécie com perfil GRAS e posterior utilização de seus metabólitos para pesquisa aplicada à indústria de alimentos.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, José Otávio de Souza. Caracterização físico-química de óleos de peixe produzidos em escala industrial e laboratorial. Manaus-Am. Universidade Federal do Amazonas, 2009. 65p.

ATAYDE, Hérlon Mota. Potencial de toxicidade de microfungos isolados de ração para peixes fabricadas no Estado do Amazonas. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.

BAROSA, J., FERREIRA, A., FONSECA, B. SOUSA, I. Teste de toxicidade do ião cobre para *Artemia salina*. Manual de Biologia Marinha e Pescas da Faculdade de Ciências do Mar e de Ambiente, nov.2003.

CARBALLO, José Luis, et al. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BioMed Central Biotechnology*, v. 2, p. 17-21, 2002.

CARVALHO, Patricia de Oliveira, et al. Aplicação de lípases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*, v. 26, p.75-80, 2003.

CORRÊA, Wollace Ribeiro. Isolamento e identificação de fungos filamentosos encontrados em peças anatômicas em solução de formol a 10%.2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos-SP.

CREXI, Valéria Terra. Refino de óleos de pescado provenientes dos processos de silagem ácida e termomecânico de farinha. 2005.107f. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos). Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul.

DIOGO, Hilda Conceição; SARPIERI, Aldo; PIRES, Mário Cezar. Fungi preservation in distilled water. Sao Paulo (SP): Brasil, 2005.p. 591-594.

ESPINOSA, S.; DIAZ, M.S.; BRIGNOLE, E.A. Food additives obtained by supercritical extraction from natural sources. *Journal of Supercritical Fluids*, v.45, p.213-219, 2008.

FAVILLA, M., et al. Toxicity assessment of metabolites of fungal biocontrol agents using two different (*Artemia salina* and *Daphnia magna*) invertebrate bioassays. *Food and Chemical Toxicology*, v. 44, p. 1922-31, 2006.

GONZÁLEZ, Ana María, et al. Detecção de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 24, p.59-61, 2007.

HABA, E, et al. Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, 2000.p.40-44.

INHAMUNS, Antonio José; FRANCO, Maria Regina Bueno. Composition of total, neutral and phospholipids in mapará (*Hypophthalmus* sp.) from the Brazilian Amazonian area. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 4859-4863, 2001.

INHAMUNS, Antonio José; FRANCO, Maria Regina Bueno. EPA and DHA quantification in two species of freshwater fish from Central Amazonia. *Food Chemistry*, v.107, p.587-591, 2008.

LAVES, P.; SORGELOOS, P. *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. Rome: FAO. 295p. FAO Fisheries Technical Paper, No 361; 1996.

LEAL, M.C.M.R.,FREIRE,D.M.G., CAMMAROTA, M.C.; SANT'ANNA Jr., G. L. Estudo das condições de produção de lípases pelo fungo *Penicillium restrictum* utilizando planejamento experimental. CD-Rom. Simpósio Internacional de Fermentações – SINAFERM, Florianópolis, SC, 2003

LEE, John H.; O'KEEFE, James H.; LAVIE, Carl J.; MARCHIOLI, Roberto; HARRIS, William S. Omega-3 fatty acids for cardioprotection, *Mayo Clinic Proceedings*, n.83, v.3, p.324-332, 2008.

LI, Ning; ZONG, Min-Hua. Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, China, 13 Maio, 2010. P.43-54.

NASCIMENTO, José Dácio; ATAYDE, Hérlon Mota; INHAMUNS, Antônio José; TEIXEIRA, Maria Francisca Simas. CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE FUNGOS AMAZÔNICOS PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS DESTINADAS AO MELHORAMENTO BIOTECNOLÓGICO DE ÓLEO DE PESCADO. Projeto de iniciação científica Anais-CONIC ( PIBIC) 2010/2011.

NUNES, Bruno S., et al. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. Porto, Portugal. 2005. 453p.

PARRA, A. Lagarto; YHEBRA, R. Silva; SARDIÑAS, I. Guerra; BUELA, L. Iglesias. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, v. 8, n. 5, p. 395–400, 2001.

PINHEIRO, Thaís da Luz Fontoura. Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada da Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim – Rio Grande do Sul, Erechim, 2006

RICE, Stanley A.; MANESS, Ian B. Brine Shrimp Bioassays: a useful technique in biological investigations. *The American Biology Teacher*, v. 66, n. 3, p. 208-14, 2004.

SIJTSMA, L.; SWAAF, M.E. de. Biotechnological production and applications of the n-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *Applied and Microbiological Biotechnology*, v. 64, p.146-153, 2004.

STAPPEN, V.G. *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. Rome: FAO. p.79-123. FAO Fisheries Technical.Paper. No. 361; 1996.

TREECE, G.D. *Artemia Production for Marine Larval Fish Culture*. SRAC: Southern Regional Aquaculture Center, Publication No 702; 2000;

TREICHEL, Helen, et al. A Review on Microbial Lipases Production. Rio Grande do Sul, Brasil. 2010.182p.

## 9 CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Nº	Descrição	Ago 2011	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2012	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
01	Revisão Bibliográfica	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
02	Coleta do material					R	R						
03	Análise do material						R	R	R				
04	Tabulação de dados						R	R	R	R	R	R	
05	Análise estatística							R	R	R	R	R	
06	Análise de dados						R	R	R				
08	Relatório parcial						R						
09	Preparação do relatório final									R	R	R	
10	Entrega do Relatório final												R

R = Realizado P = Previsto