

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

ENZIMAS PRODUZIDAS POR ENDÓFITOS ISOLADOS DE
HOSPEDEIROS TROPICAIS

Bolsista: Caroline de Souza Bezerra, CNPq.

MANAUS

2013

ENZIMAS PRODUZIDAS POR ENDÓFITOS ISOLADOS
DE HOSPEDEIROS TROPICAIS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-A/0127/2012

ENZIMAS PRODUZIDAS POR ENDÓFITOS ISOLADOS
DE HOSPEDEIROS TROPICAIS.

Bolsista: Caroline de Souza Bezerra, CNPq.

Orientadora: Prf^a Dr^a Rozana de Medeiros Souza Galvão.

Co-orientador: Prof^o Dr^o Pedro Queiroz da Costa Neto.

MANAUS

2013

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Instituto de Ciências Agrárias e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Instituto de Ciências Agrárias e se caracteriza como projeto de pesquisa “Enzimas produzidas por endófitos isolados de hospedeiros tropicais”.

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	15
2.0 MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1 Avaliação da Atividade de lacase	17
2.2 Avaliação da Atividade de amilase	18
2.3 Avaliação da Atividade de celulase	18
2.4 Avaliação da Atividade de proteinase	19
2.5 Avaliação da Atividade de pectinase.....	19
3.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	20
3.1 Avaliação da atividade enzimática em <i>Thielaviopsis</i>	23
3.2 Avaliação da atividade enzimática em <i>Colletotrichum</i>	25
3.3 Avaliação da Atividade enzimática em <i>Trichoderma</i>	28
4.0 CONCLUSÃO.....	30
5.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

1. INTRODUÇÃO

Os fungos endofíticos são assintomáticos e vêm despertando interesse biotecnológico pela produção de metabólitos secundários produzem enzimas que são excretadas e entre elas, destacam-se as lacases, amilases, celulasas, proteinases e pectinases.

Fungos que apresentam esse potencial podem ser futuramente utilizados na produção em larga escala. Pois os microrganismos apresentam-se como uma fonte natural produtora de moléculas bioativas. E ainda, estas enzimas que estão sendo estudadas apresentam diversas aplicações.

As lacases podem ser utilizadas como agente branqueador natural para a indústria têxtil e papelaria (JORDAAN et al., 2004), na produção de etanol, pelo emprego de microrganismos engenheirados (MAYER;STAPLES, 2002), na indústria alimentícia para a produção de bebidas como a gente estabilizador de vinhos, sucos de frutas e de cerveja (MINUSSI et al., 2002), além disso, biosensores vem sendo desenvolvidos por meio desta enzima para a determinação de compostos fenólicos, o que é interessante para o controle ambiental.

As amilases pertencem à classe das hidrolases, entre as quais tem a α -amilase, β -amilas e amiloglicosidase e catalisam a hidrólise do amido e seus derivados. As enzimas amiolíticas apresentam vantagens na capacidade de catalisar reações químicas sob condições moderadas, o que nem sempre ocorre com processos químicos, e estes apresentam hidrólises não específicas e formação de produtos não desejados. Elas são utilizadas na obtenção de amido modificado, na produção de xaropes com elevado teor de glicose, em produtos de panificação e indústria cervejeira;

As celulasas são enzimas vendidas em grande volume e apresentam importância econômica, tendo diferentes aplicações industriais, como por exemplo, no processamento do amido, produção de ração animal, fermentação de grãos para produção de álcool, extração de sucos de frutas e vegetais, polpa e indústria de papel e indústria têxtil (OGEL et al., 2001).

As proteases hidrolisam proteínas com consequente modificação das propriedades físicas, químicas e biológicas originais, sendo a proteólise essencial para todos os organismos e envolvida em diferentes processos fisiológicos(SABIOTIC et al., 2007). As proteases representam um dos três maiores

grupos de enzimas de interesse industrial com ampla aplicação biotecnológica, especialmente na indústria de alimentos, couro, detergentes e em processos de biorremediação (RAO et al., 1998).

As pectinases formam um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam as substâncias pécicas. Possuem uso nas indústrias de alimentos, no amadurecimento de frutas, clarificação e redução de viscosidade em sucos de frutas, tratamentos preliminares do suco de uva para indústrias vinícolas, extração de polpa de tomate, fermentação de chá e chocolate, tratamento de resíduos vegetais, degomagem de fibras, enriquecimento proteico de alimentos infantis e extração de óleos (UENOJO;PASTORE,2007)

A enzima lacase recebe destaque por ser uma enzima em ascensão, pois vem sendo amplamente utilizada como substituto de produtos químicos nos processos industriais das industriais têxteis e papelreira, como branqueador natural, como agente estabilizante conforme citado anteriormente e, na panificação, como melhorador do “flavor”. Por ser uma oxidase capaz de degradar a lignina, esta enzima possui ampla aplicação industrial e ambiental.

Este trabalho teve como pretensão avaliar o potencial produtivo de lacase, amilase, celulase, proteinase e pectinase em endófitos isolados de hospedeiros tropicais, quantificando a concentração das enzimas produzidas por *Colletotrichum* endófitos de guaranazeiro (*Paullinia cupana* Kunth var. *sorbilis* (Mart.) Ducke), a concentração das enzimas produzidas por *Thielaviopsis paradoxa* endófitos de pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) e também a concentração das enzimas produzidas por *Trichoderma* o qual é o fungo endófito de cumaru (*Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd);

A descoberta de um isolado com potencial produtivo a ser melhorado possibilitará outros trabalhos, além de vir a ser um recurso na solução de problemas ambientais.

Além de que os microrganismos se apresentam como uma fonte natural produtora de moléculas bioativas. E estes fungos utilizados já foram isolados anteriormente e podem vir a produzir enzimas de interesse biotecnológico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foi investigado o potencial produtivo, de cinco isolados de cada hospedeiro, para as enzimas pelos endófitos *Colletotrichum*, isolados de guaranazeiro; *Thielaviopsis paradoxa*, isolados de pupunheira e *Trichoderma*, isolados de cumaru. Os 15 isolados armazenados no Laboratório de Genética de Microrganismos – LAGEM do Instituto de Ciências Biológicas – ICB foram reativados em meio de cultura BDA (200 g de batata, 15 g de dextrose e 15 g de ágar diluídos em água destilada para 1 L – pH 6,8) acrescido do antibiótico cloranfenicol (50 µg/mL), para inibir o crescimento de bactérias. As placas de Petri foram incubadas a 25 °C por período necessário à esporulação. Quando necessário foi utilizado fotoperíodo de 12h.

Os isolados não precisaram passar pelo processo de diluição seriada, pois os mesmos já eram monospóricos. Após a esporulação das culturas monospóricas, elas foram armazenadas pelo Método de Castellani (CASTELLANI, 1939; ARAÚJO et al., 2002) e mantidas em temperatura ambiente.

2.1 Avaliação de atividade de Lacase.

Para avaliar a atividade de fenoloxidasas – Lacase, foi utilizado o protocolo descrito por Santos (2007). Foi adicionado 20 g de ágar acrescido de 0,5% (p/v) de ácido gálico, 15 g de extrato de malte e 1 g de peptona em 1 L de água destilada. O ácido gálico foi homogeneizado em 125 mL de água destilada e autoclavado a 120°C, 1 atm, 10 min. Os demais reagentes foram solubilizados a pH 7 e autoclavados (120 °C, 1 atm, 20 min). Após o resfriamento do meio (45-50 °C) foi vertido em placas de Petri e posteriormente inoculado com culturas jovens (24 h), incubados a 25 °C por cinco dias no escuro. A atividade da enzima lacase foi detectada pela formação de um halo marrom ao redor das colônias. A avaliação foi realizada por meio da mensuração dos diâmetros perpendiculares da colônia mais o halo decorrente da atividade enzimática, obtendo-se as respectivas áreas. Cada experimento foi realizado em triplicata, de onde se obtivemos uma média da área do halo de degradação oriundo da atividade da enzima (PEREIRA, 2009).

Para a avaliação do índice de atividade enzimática, utilizamos a fórmula a seguir:

$$\text{Atividade Enzimática (I)} = \frac{\text{Diâmetro do halo (mm)}}{\text{Diâmetro da colônia (mm)}}$$

Este método foi adotado para a mensuração do halo em todas as enzimas e com todos os isolados.

2.2 Avaliação da Atividade da Amilase.

A atividade da amilase foi observada a partir do cultivo em placas de Petri contendo meio mínimo, o qual teve a glicose substituída por amido (6 g de NaNO_3 , 1,5 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de KCl , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g de FeSO_4 , 0,01 g de ZnSO_4 , 10 g de amido, 15 g de ágar, 1 L de água destilada, pH 6,8). As colônias foram incubadas a 25 °C sob um foto período de 12 h. Após cinco dias de cultivo foi então aplicado em cada placa 2 mL de solução lugol (5 g de KI , 1 g de iodo, 100 mL de água destilada), sobre a superfície do meio de cultura. Após 10 minutos, a solução lugol foi descartada e foi avaliado o halo de degradação oriundo da atividade amilolítica, caracterizado pela formação de um halo claro circundado por uma zona azulada ao redor da colônia (PEREIRA, 2009). A avaliação da produção do halo seguiu o mesmo procedimento para lacase.

2.3 Avaliação da Atividade de Celulase.

A atividade da celulase foi observada a partir do cultivo em placas de Petri contendo ágar carboximetilcelulose (1 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g de asparagina, 0,5 g de KCl , 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g de CaCl_2 , 0,5 g de extrato de levedura, 10 g de carboximetilcelulose, 20 g de ágar, 1 L de água destilada). As colônias foram incubadas por cinco dias a 25 °C no escuro e em seguida submetidas a choque térmico por 16 horas a 50 °C. Após esse período, foi adicionado 10 mL de solução corante de vermelho congo (2,5 g/L) em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8. Após 30 minutos a solução foi descartada e as culturas foram lavadas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M neste mesmo tampão, visando revelar o halo claro e estreito de degradação da celulose ao redor da colônia (PEREIRA, 2009). A avaliação da produção do halo seguiu o mesmo procedimento para lacase.

2.4 Avaliação da Atividade da Proteinase.

A atividade da proteinase foi avaliada conforme a metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis (1975), modificado. Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio solidificado composto por 5 g de peptona, 3 g de extrato de levedura, 1 g NaCl, 15 g de ágar, 0,4 g gelatina e 1 L de água, em pH 6. A gelatina foi autoclavada separadamente e misturada ao meio antes de vertê-lo para as placas. As colônias foram incubadas por 48 horas a 25 °C no escuro. Após este período o halo, caracterizado por uma região amarelada ao redor da colônia contrastante com o vermelho presente na região em que não houve atividade proteolítica, será revelado por meio da aplicação de 10 mL de vermelho de metila (2%) em cada placa. A avaliação da produção do halo seguiu o mesmo procedimento para lacase.

2.5 Avaliação da Atividade de Pectinase.

A atividade de pectinase foi avaliada conforme a metodologia descrita por Czapek, modificado. Os isolados foram cultivados em meio de cultura contendo (2 g de NaNO₃, 0,5g de KH₂PO₄, 0,5 g de KCl, 0,01 g de MgSO₄ 7H₂O, 0,01 g de FeSO₄.7H₂O, 3 g de pectina cítrica, 0,1 g de extrato de levedura, 15 g de Ágar e 900mL de água destilada). O meio foi ajustado para pH 6,8 com NaOH 10% antes de adicionarmos o ágar, em seguida, foi autoclavado por 20 minutos a 1 atm. A pectina cítrica foi dissolvida em 100 mL de água destilada separadamente do meio de cultura e foi acrescentada após autoclavagem do meio, com o mesmo ainda quente.

As colônias foram incubadas por cinco dias a 25 °C no escuro. Após esse período, o halo de degradação formado por uma região translúcida ao redor da colônia, foi revelado com aplicação de vermelho de metila (2%). A avaliação da produção do halo seguiu o mesmo procedimento para lacase.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os fungos das espécies de *Trichoderma sp.*, *Thielaviopsis paradoxa* e *Colletotrichum sp.*, foram reativados conforme o proposto pela metodologia do trabalho. Inicialmente foram reativados 10 fungos de cada endófito, entretanto, alguns isolados apresentavam contaminação por bactérias, ácaros, crescimento lento ou crescimento zero dos fungos, dentre outros fatores, mesmo realizando o repique não foi possível recuperar todos os 10, de modo que optamos por selecionar apenas os 5 isolados mais vigorosos(fig.1).

Acredita-se que essas divergências ambientais ocorreram devido ao fato de serem fungos que já estavam isolados e armazenados a um considerável tempo no laboratório de microrganismos.

Devido a esses acontecimentos em relação ao crescimento e adaptação dos fungos em estudo, houve um atraso no desenvolvimento do projeto, já que foi necessário então, que se encontrasse um meio de cultura adequado, condições de luz e temperatura também adequadas para que todos os fungos se desenvolvessem com excelência, para que a partir deles fossem retirados os isolados para montagem dos experimentos onde avaliamos a atividade de produção de enzimas.

A partir do momento em que obtivemos esses cinco isolados com uma colônia bem estabelecida, realizamos a triplicata de cada um, para que ao montarmos o experimento tivéssemos a quantidade necessária de fungos para a retirada de blocos de gelose já que utilizamos cinco isolados, 3 placas de cada isolado para uma enzima, resultando em 45 placas para cada enzima dos 5 isolados, como avaliamos cinco enzimas, com um total de 225 placas para o experimento.

Ao montarmos o experimento, os fungos foram inoculados nas placas, cada qual com o seu meio específico para cada enzima (fig. 2 a fig. 5), foram então postos em incubadora (b.o.d) de cabeça para baixo para evitar o acúmulo de água (fig.6), a uma temperatura de 25°C durante cinco dias no escuro (fig.7) e a amilase foi posta em uma b.o.d diferente devido ao seu requerimento de 12h de foto período.

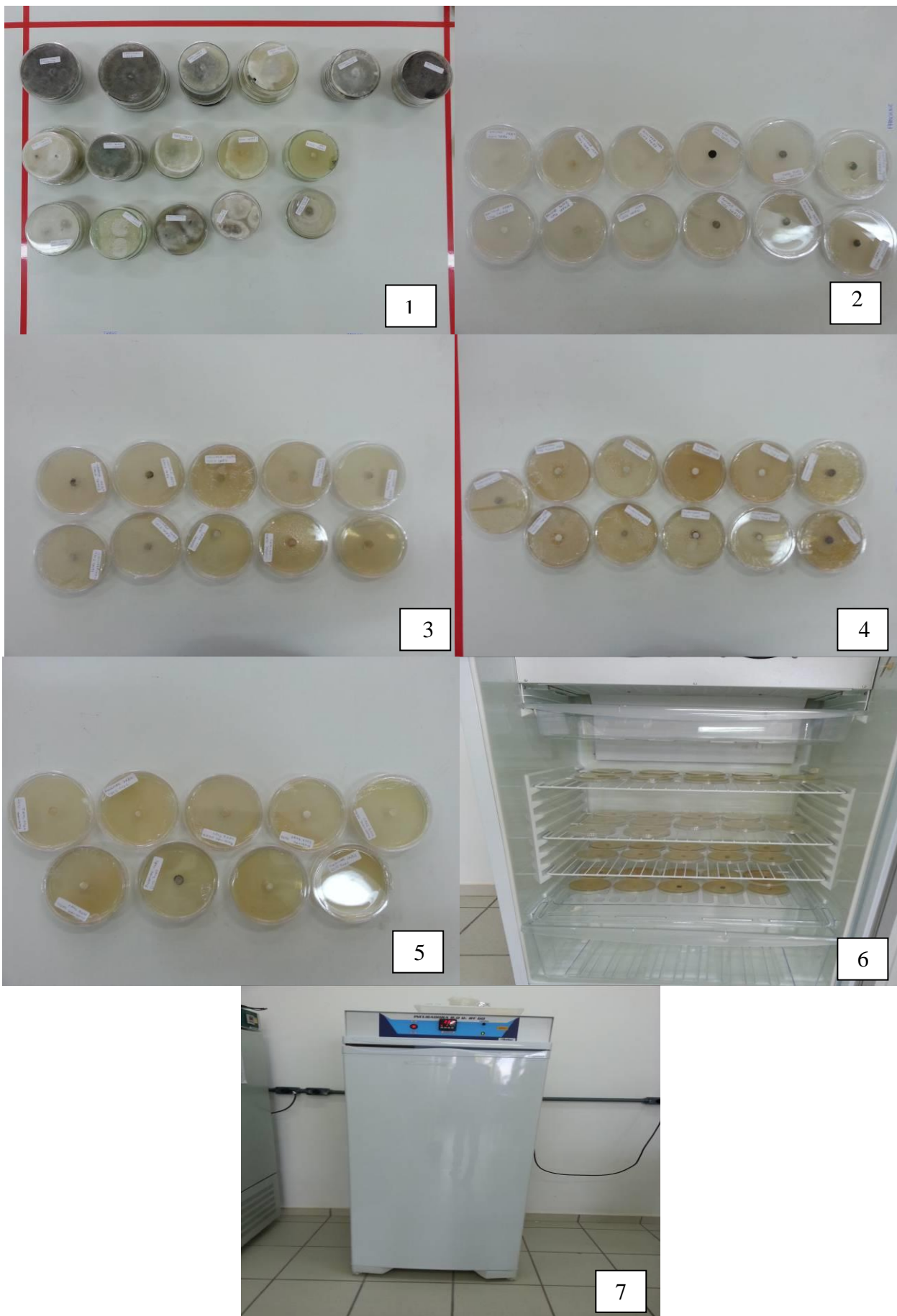


Figura 1-10 – Montagem do experimento.1.Os cinco isolados de cada fungo em triplicata.2.Amilase.3.Celulase.4.Fenoloxidase.5.Proteinase.6.Coloção das placas na b.o.d.7. Incubadora utilizada no experimento a 25°C.

O diâmetro do halo que se origina a partir da ação enzimática foi calculado pela fórmula já citada nos materiais e métodos, em que obtivemos uma média dos diâmetros dos halos formados nas triplicatas de cada isolado e dividimos pela média dos diâmetros perpendiculares da colônia, trabalhamos com valores em mm, na tabela 1 abaixo é possível avaliarmos a mensuração de cada halo e o comportamento de cada fungo para com cada enzima específica.

ISOLADOS ENZIMAS (Diâmetro do halo de degradação oriundo da atividade enzimática em mm)

	Fenoloxidase	Amilase	Celulase	Proteinase	Pectinase
TP01	-	-	1,8 mm	-	1,1 mm
TP02	-	-	-	1,7	1,1 mm
TP03	-	-	1,4 mm	1,6	1,0 mm
TP06	-	-	-	1,0	1,1 mm
TP08	-	-	1,4 mm	1,1	1,4 mm
CL01	1,5 mm	1,9 mm	1,3 mm	4 mm	1,3 mm
CL03	1,72 mm	2,11 mm	1,1 mm	4 mm	1,3 mm
CL04	2,24 mm	1,97 mm	1,1 mm	3 mm	1,3 mm
CL10	1,66 mm	2,7 mm	1,1 mm	3,79 mm	1,5 mm
2GM2-2/1.2M2	1,76 mm	3 mm	1,1 mm	2 mm	1,5 mm
TC01	-	3,9 mm	1,1 mm	-	1,3 mm
TC02	-	-	-	-	1,3 mm
TC03	-	2 mm	1 mm	-	1,1 mm
TC07	-	3 mm	-	-	1,2 mm
D501	-	3,9 mm	-	-	1,39 mm

Tabela 1: Demonstração do halo de atividade enzimática para todos os isolados dos três fungos estudados. **TP:** *Thielaviopsis paradoxa*; **CL:** *Colletotrichum*; **TC:** *Trichoderma*; - : indica que não houve atividade enzimática **2GM2-2/1.2M2:** *Colletotrichum*; **D501:** *Trichoderma*.

Vale ressaltar que os fungos isolados do *Trichoderma* que não apresentaram produção da enzima fenoloxidase (lacase) e proteinase assim como o *Thielaviopsis paradoxa* que não revelou halo de degradação para a amilase e em alguns casos não produziu celulase ou proteinase, os mesmos tiveram um bom desenvolvimento da colônia neste meio específico, esporularam por toda a placa e ainda apresentaram suas características específicas, como por exemplo, a cor marcante do *Trichoderma*.

3.1 Avaliação da atividade Enzimática em *Thielaviopsis paradoxa*

O *Thielaviopsis paradoxa* não apresentou halo de degradação para fenoloxidase e amilase, na verdade, ele chegou a produzir a enzima, mas não foi da forma esperada que seria com a formação do halo, em alguns casos ele produziu por sobre a área da colônia(fig.8; fig.9 e fig.10)

Quanto a celulase, apenas três isolados tiveram resultado positivo(fig.11), já em proteinase, foram quatro(fig.12) e em pectinase, todos responderam com um resultado bom, mesmo que com um diâmetro de halo recorrente da degradação enzimática relativamente pequeno(fig.13).

O que aconteceu com o *Thielaviopsis paradoxa*, no caso de ele não produzir adequadamente e em grande quantidade as enzimas pode ser considerado até normal, e com estudos mais aprofundados pode-se justificar o porquê disso.

Podemos ter como exemplo o trabalho de SILVA,R.L; 2006, em que 110 isolados de vários fungos endofíticos foram avaliados e na caracterização enzimática, pouquíssimos tiveram ação enzimática, e a maioria foi com lípases.

Isso pode ser uma característica do fungo ou apenas não lhe foi fornecida a condição ideal para que ocorresse a degradação.

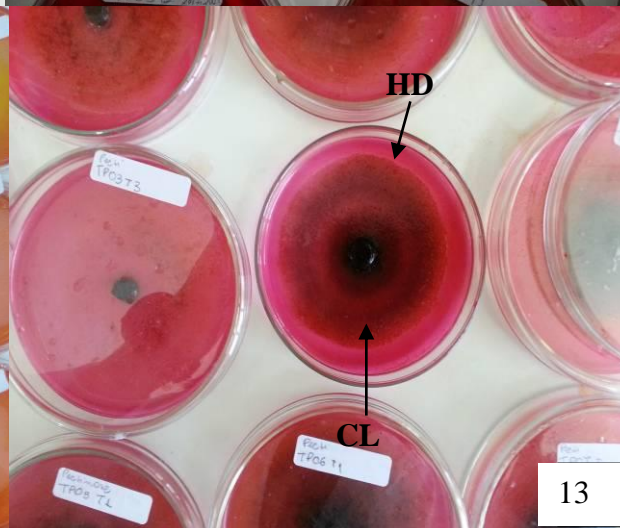
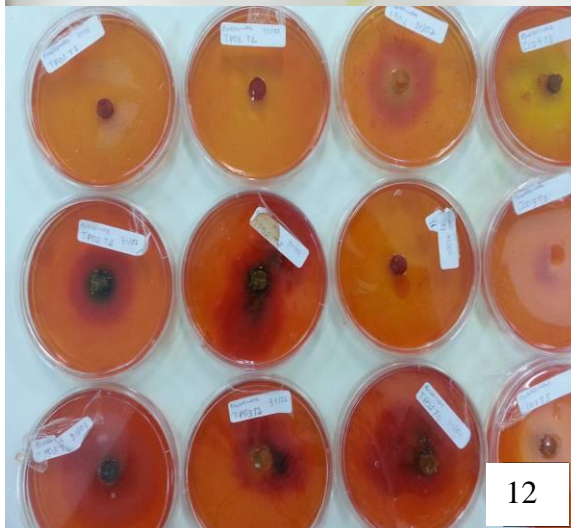
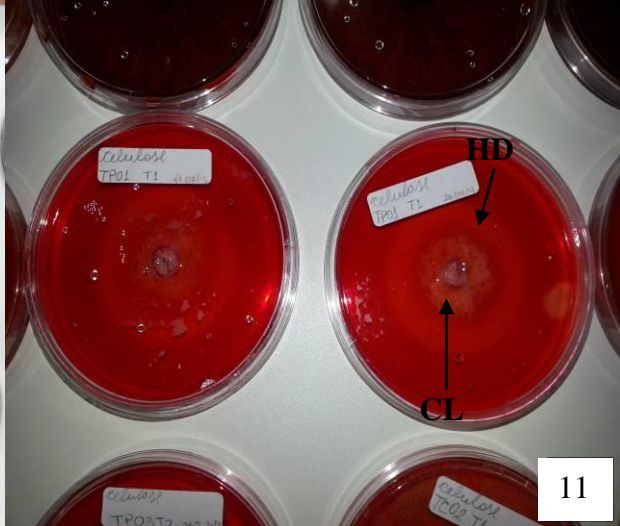
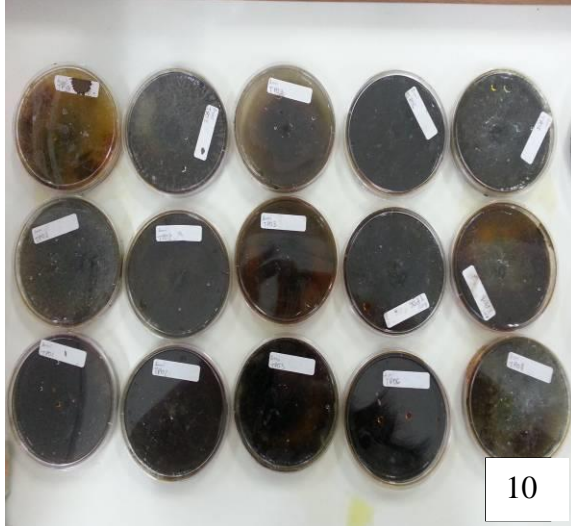
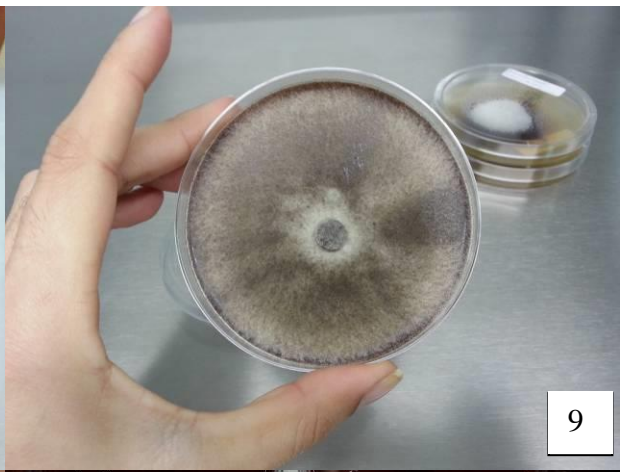
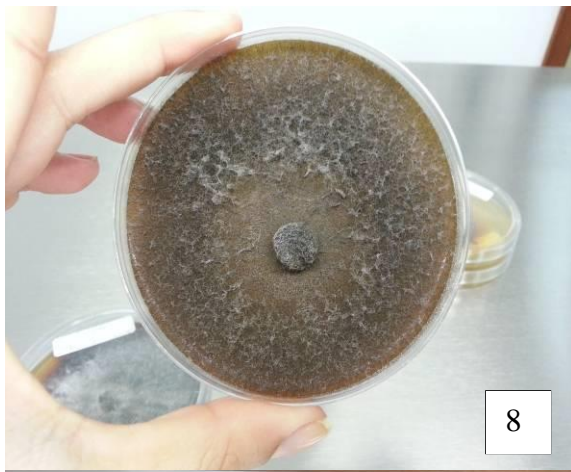


Figura 8-13 – 8.Fenoloxidase.9.Fungo esporulado em toda placa de fenoloxidase.10.Amilase.11.Celulase.12.Proteinase.13.Pectinase. Onde as setas destacam o halo de degradação (HD) e a Colônia (CL).

3.2 Avaliação da Atividade Enzimática em *Colletotrichum*

Segundo LIMA FILHO et al., (2003), os seus isolados de *Colletotrichum* utilizados apresentaram capacidade de produzir amilase, celulase, lipase e proteinase. E avaliando um isolado específico na produção de amilase, que possui código de MM, apresentou diâmetro do halo de degradação de 22,5 mm, enquanto que no desenvolvimento do meu projeto, o isolado que apresentou maior halo de degradação para esta enzima, foi 2Gm2-2/1-2M2 com 3 mm(fig.16 e fig.17).

Quanto a essa diferença de diâmetro do halo, de certa forma até discrepante, deve-se levar em consideração que não sabe o tamanho das placas utilizadas pelo autor, assim como o tamanho do inóculo utilizado.

Sabe-se que as amilases são comuns em fungo, e eles ainda podem fazer uso do amido presente no meio de cultura, como fonte de alimento para favorecer o seu crescimento, e isso foi possível de se observar durante o desenvolvimento do trabalho, não apenas com *Colletotrichum*, mas com os demais endofíticos que mesmo não produzindo a enzima em algumas ocasiões tiveram uma esporulação excelente.

Quanto à enzima proteinase, este mesmo autor deu destaque para o seu isolado BAN com diâmetro do halo de degradação de 10,24 mm, enquanto que nos meus estudos, o isolado de *Colletotrichum* que mais possuiu atividade desta enzima foi o CL01 e CL03, ambos com 4 mm.

De acordo com MARTINEZ et al.,2009, todos os seus isolados de *Colletotrichum* obtidos de uma série de plantas hospedeiras produziram a enzima fenoloxidase (lacase), assim como nos resultados que obtive, em que todos os meus cinco isolados apresentaram uma produção dessa enzima, destacando-se o CL04 com 2,24 mm de halo formado da atividade enzimática(fig.14 e fig.15).

DEKKER et al., 2007 afirma que a produção de lacase pode ser aumentada significativamente, dependendo dos nutrientes que estejam presentes no meio.

No trabalho de SILVA et al., 2006, o *Colletotrichum* isolado de pinha, apresentou atividade enzimática apenas para lipase, enquanto que neste projeto foi possível comprovar que o mesmo é capaz de produzir celulase, amilase e proteinase.

A capacidade deste fungo em sintetizar pectinase é confirmada no trabalho de MARCHI et al., 2009, em que halos de degradação de pectina foram observados em todas as placas de cultivo dos isolados. Esta alta frequência de isolados com atividade enzimática sugere de certa forma que possa existir uma importância por parte da pectinase no desenvolvimento do *Colletotrichum*. Alguns testes foram desenvolvidos por uma série de autores, mas pela metodologia escolhida eles não chegaram a um resultado, entretanto, alguns outros obtiveram este resultado, mas tratando-o como fungo patogênico, nos meus estudos ele é tido como endofítico e de uma planta específica. Os isolados que se destacaram quanto a esta atividade foram os isolados 2GM2-2/1.2M2 e CL10, com halo de degradação de 1,5 mm(fig.20 e fig.21).

Finalmente ao compararmos a produção de celulase neste fungo, pode-se perceber que nas condições deste trabalho os isolados apresentaram diâmetros do halo de degradação muito semelhantes, o que se pode confirmar com o trabalho de TAKASHI L.M et al., 2009, onde foi verificado que todos os isolados produziram celulase entretanto sua média também foi bastante semelhante enquanto que o mesmo teve maior índice de atividade enzimática para amilase, o que também podemos confirmar com nossos resultados, os quais chegaram a aproximadamente 3 mm de halo(fig.18 e fig.19).

Avaliando os resultados que obtivemos com este fungo, pode-se dizer que a metodologia adotada, após alguns ajustes necessários, se mostrou extremamente eficaz, já que o mesmo apresentou resultados positivos para todas as cinco enzimas em questão.

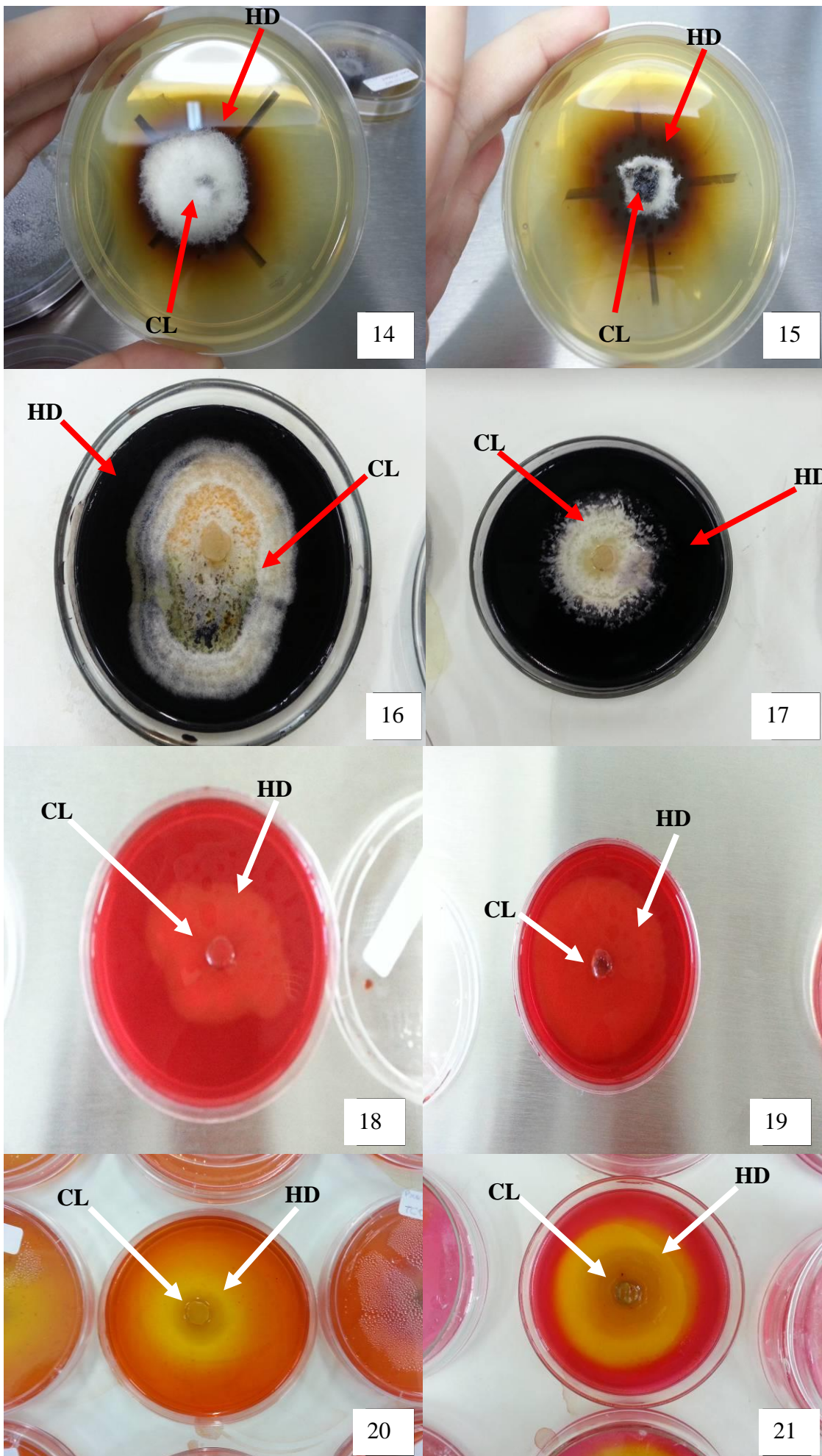


Figura 14-21 –14-15.Fenoloxidase, o halo é caracterizado pela cor marrm.16-17.Amilase.18-19.Celulase.20.Proteinase.21.Pectinase. Onde as setas destacam o halo de degradação (HD) e a Colônia (CL).

3.3 Avaliação da atividade Enzimática em *Trichoderma*

De acordo com os resultados obtidos nesse experimento, o *Trichoderma* não apresentou halo de degradação de atividade de fenoloxidase mesmo que tenha se desenvolvido bem, mas um trabalho desenvolvido por GOACHEV, V.K., 2007, afirma que a partir dos seus isolados obtidos da floresta ou do solo, utilizando meio de cultura específico juntamente com uma solução de cristais violeta, ele conseguiu providenciar uma rápida manifestação positiva da atividade de fenoloxidase (lacase) e celulase, com a formação de um halo claro ao redor da colônia(fig.22).

Nas condições deste nosso trabalho, quanto à celulase, apenas dois isolados apresentaram uma pequena produção de celulase, com cerca de 1 mm de halo de degradação(fig.24).

Com relação à produção de celulase, a mesma é confirmada pelo trabalho de BANDEIRA et al.,2011, em que todos os seus 125 isolados utilizados apresentaram o halo característico ao redor da colônia, havendo uma diferença de produção do período chuvoso para o seco.

Avaliando a atividade de amilase, o *Trichoderma* se destacou, apresentando halos de degradação com até 3,9 mm e com apenas um isolado com o resultado não esperado(fig.23). De acordo com CHÁVEZ et al., 2004, foi confirmada a produção de α amilase sob condições de fonte de carbono, a 28°C dentre outros fatores específicos que favoreceram o aparecimento do halo indicando a ação enzimática.

Eles não apresentaram atividade de proteinase, mas esporularam bem, por toda a placa, sem infectantes. Entretanto, um trabalho desenvolvido por MELO, D.R.; 2012 afirma que as enzimas proteolíticas produzidas e secretadas por espécies de *Trichoderma* vêm recebendo muita atenção por sua habilidade potencial no biocontrole.Porém ainda assim são pouco estudadas e várias das análises executadas no seu trabalho revelaram que as proteases ácidas são reguladas por pH, havendo então, produção dessa enzima por parte deste fungo(fig.25)

Ao avaliarmos a ação de pectinase todos os isolados apresentaram um halo de degradação. Muitos fungos endófitos assim com o que está sendo tratado aqui, possuem essa capacidade para produção de enzimas, e em especial ele se destaca para pectinase em que todos os seus 5 isolados e triplicatas mostraram um resultado positivo(fig.26).

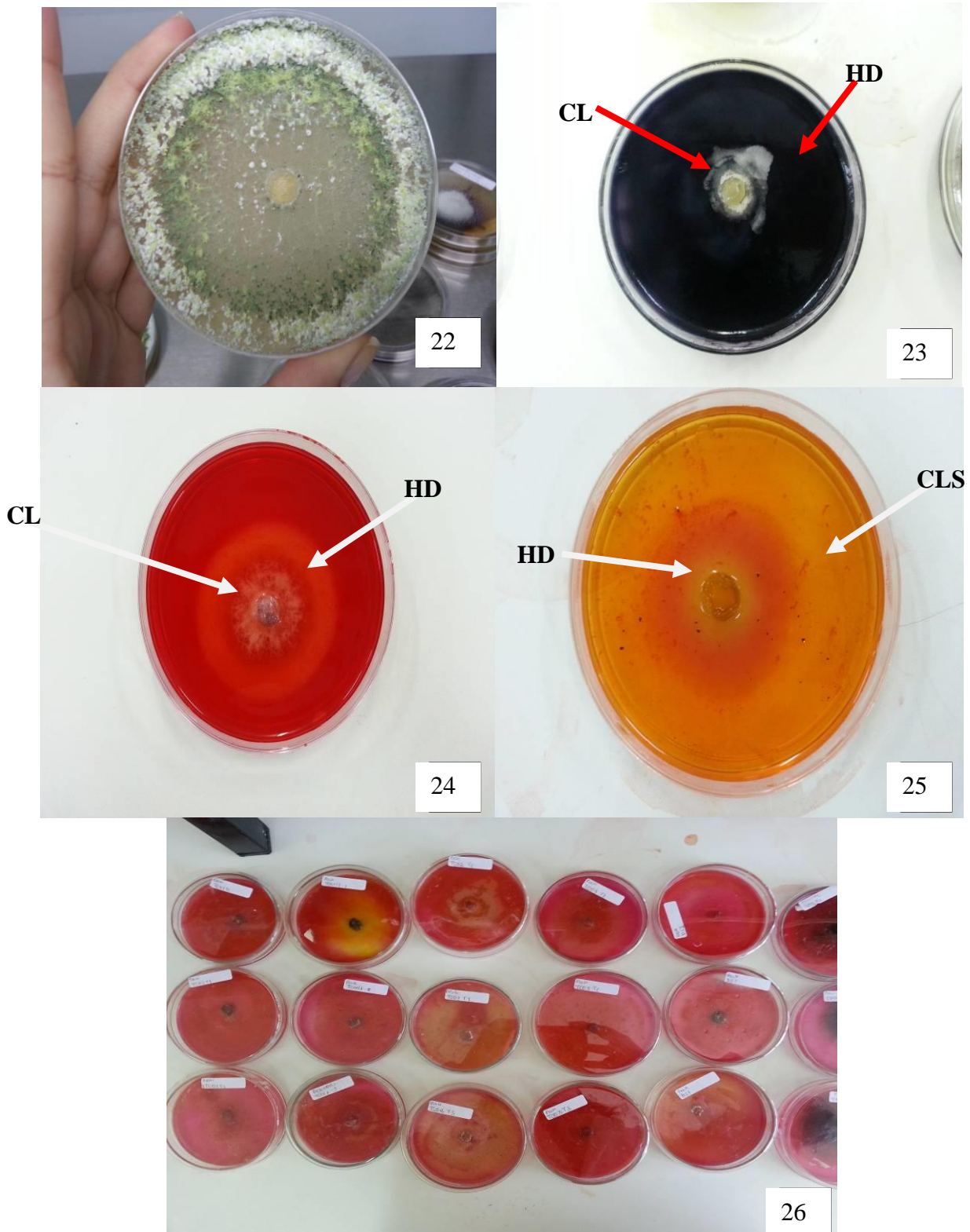


Figura 22-26– 22. Fungo bastante esporulado em meio de fenoloxidase.23.Amilase.24.Celulase.25.Proteinase.26.Pectinase. Onde 27 as setas destacam o halo de degradação (HD) e a Colônia (CL) e Colônia dissolvida (CLS).

4.0 CONCLUSÃO

Os caracteres avaliados para os três fungos e as cinco enzimas em questão, fornecem dados que são de suma importância para o mercado industrial, para a biotecnologia, dentre outros.

Mesmo *Colletotrichum*, *Trichoderma* e *Thielaviopsis*, sendo obtidos da mesma região e postos nas mesmas condições de meio e ambiente, percebe-se uma grande variedade quanto à atividade de cada um, enquanto alguns tiveram uma ótima ação de degradação enzimática, outros não apresentaram atividade alguma. É importante saber que pode-se avaliar muitos outros tipos de enzimas assim como muitos outros endófitos de hospedeiros tropicais.

Tal trabalho possibilita fornecer dados que irão contribuir com trabalhos antigos, enriquecendo de certa forma informações sobre esses grupos de fungos, contribuindo diretamente ainda para os estudos de alterações genéticas, anatômicas, devido à variações ambientais e de nutrientes no meio de cultura

Reconhece-se então a importância do desenvolvimento deste trabalho que pode servir até mesmo como uma ferramenta para identificação futura desses gêneros então avaliados.

5.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, W.L. et al. Manual: Isolamento de Microrganismos Endofíticos. Departamento de Genética. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo. Piracicaba, São Paulo, 2002. 86p.

BANDEIRA, Alexandrino M.; SILVA, Gisele B.; LUSTOSA, Denise C. Caracterização bioquímica dos isolados de *Trichoderma* associadas a espécies florestais da base de Urucu-AM. Anais do 9º Seminário Anual de Iniciação Científica, 19 a 21 de outubro de 2011. Disponível em <http://www.proped.ufra.edu.br/attachments/072_CHARACTERIZA%C3%87%C3%83O%20BIOQU%C3%8DMICA%20DOS%20ISOLADOS%20DE%20Trichoderma%20ASOCIADAS%20A%20ESP%C3%89CIAS%20FLORESTAIS%20DA%20BASE%20D E%20URUCU-AM.pdf>. Acesso em 10 de Julho de 2013.

CHÁVEZ, Pacheco R.A; CARVALHO, JMC.; CONVE, A. Production of α -amylase and glucoamylase from different starches by a new *Trichoderma* sp. Isolate. *Annals of Microbiology*, 54 (2), 169-180 (2004). Disponível em <http://www.anmicro.unimi.it/full/54/pacheco_54_169.pdf>. Acesso em 12 de Julho de 2013.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 24, p. 270-276, 1939.

GOCHEV, V. K. and A. I. KRASTANOV, 2007. Isolation of laccase producing *Trichoderma* spp. *Bulg. J. Agric. Sci.*, 13: 171-176. Disponível em <<http://www.agrojournal.org/13/02-03-07.pdf>>. Acesso em 10 de Julho de 2013.

JORDAAN, J. et al. Purification and parcial characterization of a thermostable laccase from an unidentified basidiomycete. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 34, p. 635-641, 2004.

LIMA FILHO, Rinaldo M.; OLIVEIRA, Sônia M. A.; MENEZES, Maria. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. associados a doenças de pós-colheita. **Fitopatol. bras.**, Brasília, v. 28, n. 6, Dec. 2003 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582003000600007&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 08 de Julho de 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582003000600007>.

MARTINEZ, Gilmara C.; GIESE, Ellen C.; PEREIRA, José O.; DEKKER, Robert F.H.; BARBOSA, Aneli M. Seleção de isolados de *Colletotrichum* da biodiversidade da Amazônia como produtores de lacase utilizando metodologia simplificada. **Semina. Ciências agrárias**, Londrina, v.30, n.2, p.397-406, Abr/Jun 2009. Disponível em <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/2595/2252>>. Acesso em 8 de Julho de 2013.

MARCHI, Eduardo C.; FERNANDES, Celso D.; GUIMARÃES, Luciana R.; FABRIS, Larissa R.; BORGES, Mirian F.; TRENTIN, Aline R.; JERBA, Vanessa F. Atividade pectinolítica de *Colletotrichum gloeosporioides* e a relação com a agressividade de *Stylosanthes* spp. *Bragantia*, Campinas, v.68, n.2, p.423-433, 2009. Disponível em < <http://www.academicoo.com/texto-completo/atividade-pectinolitica-de-colletotrichum-gloeosporioides-e-a-relacao-com-a-agressividade-ao-stylosanthes-spp>>. Acesso em 8 de Julho de 2013.

MAYER, A.M.; STAPLES, R.C. Laccase: new functions for an enzyme. *Phytochemistry*, v. 60, p. 551-565, 2002.

MELO, D. R. Estudos Bioquímicos de proteases extracelulares e expressão de seus genes de isolados de *Trichoderma* spp. após crescimento em parede celular de *Rhizoctonia solani*. – 2012. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Goiás, 2012. Disponível em <http://www.unucet.ueg.br/biblioteca/arquivos/Dayana_Rosa_de_Melo.pdf>. Acesso em 15 de Julho de 2013.

MINUSSI, R.C. et al. Potential applications of laccase in the food industry. Trends in Food Science & Technology, v. 13, nºs 6-7, p. 205-216, 2002.

OGEL, J.M. et al. Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. Science, Champaign, v. 4, p. 897-902, 2001.

PEREIRA, W.V. Caracterização e identificação molecular de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da goiaba no Estado de São Paulo. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009, 79p.

RAO, M.B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Washington, v. 62, p. 597-635, 1998.

SABOTIC, J. et al. Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity. Journal of Biotechnology, Amsterdam, v. 128, p. 297-307, 2007.

SANTOS, E.S. Microrganismos promissores para degradação de compostos fenólicos presentes em bagaço de cana de açúcar, lodo e águas residuais de agroindústrias sulcro-alcooeiras. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Macéio, 2007, 112p.

SILVA, Lane R.; LUZ,Jaqueline S.;SILVEIRA, Elineide B.; CAVALCANTE, Uided M.T.; Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha(*Annona squamosa* L.) Acta bot. bras. 20(3): 649-655. 2006. Disponível em<<http://www.scielo.br/pdf/abb/v20n3/15.pdf>>. Acesso em 20 de Julho de 2013.

TAKASHI, L.M.; ROSA, D.D; BASSETO, M.A.;FURTADO, E.L. Caracterizaçã fisiológica, morfológica, cultural e patogênica de isolados de Colletotrichum spp. Causadores da antracnose da Ateemoia (Annona cherimola x Annona squamosa)_Bol, San.Veg.Plagas,35,2009.Disponível em <http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_Plagas%2FBSVP_35_01_115_130.pdf>. Acesso em 8 de Julho de 2013.

UENOJO, M.; PASTORE, G.M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. Química Nova, v. 30, nº2, p. 388-394, 2007.