

## Análise do Potencial Enzimático de Fungos Filamentosos Isolados da Bacaba (*Oenocarpus Bacaba*)

### *Analysis of the Enzymatic Potential of Filamentous Fungi Isolated from Bacaba (Oenocarpus bacaba)*

Ana Clara Miranda Batista<sup>1</sup>, Lucely Nogueira dos Santos<sup>2</sup>, Kalebe Ferreira Furtado<sup>3</sup>, Gilson Celso Albuquerque Chagas Junior<sup>4</sup>, Nelson Rosa Ferreira<sup>5</sup>.

#### RESUMO

Enzimas têm funções cruciais em diversos campos, sendo os fungos filamentosos notáveis por secretar enzimas extracelulares. Espécies como a bacaba (*Oenocarpus bacaba*) servem de substratos para microrganismos com atividades hidrolíticas. Investigar o potencial biotecnológico desses microrganismos em frutos amazônicos é essencial para melhor conhecimento de nossa flora e possíveis aplicações na indústria de alimentos. Este estudo avaliou fungos filamentosos em bacabas para produzir hidrolases extracelulares. Uma abordagem semiquantitativa foi usada para avaliar a capacidade enzimática, considerando a formação de halos de degradação em placas com meios específicos para amilase, pectinase, celulase e lipases. Isso amplia nosso entendimento sobre a capacidade enzimática de microrganismos em frutos amazônicos.

**Palavras-chave:** Atividade enzimática. *Oenocarpus bacaba*. Fungos filamentosos. Índice de velocidade de crescimento.

#### ABSTRACT

Enzymes have crucial functions in various fields, with filamentous fungi notably secreting extracellular enzymes. Species such as bacabas (*Oenocarpus bacaba*) harbor microorganisms with hydrolytic activities. Investigating the biotechnological potential of these microorganisms in Amazonian fruits is essential. This study evaluated filamentous fungi in bacabas to produce extracellular hydrolases. A semi-quantitative approach was used to assess enzymatic capacity, considering the formation of degradation halos on plates with specific media for amylase, pectinase, cellulase, and lipases. This expands our understanding of the enzymatic capability of microorganisms in Amazonian fruits.

**Keywords:** Enzymatic activity. *Oenocarpus bacaba*. Filamentous fungi. Growth rate index.

<sup>1</sup> Graduada em Engenharia de alimentos. Universidade Federal do Pará (UFPA). Orcid: <https://orcid.org/0009-0003-1206-0166>.

<sup>2</sup> Doutoranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Pará (UFPA). Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-0945-4995>.

<sup>3</sup> Graduado em Biotecnologia. Universidade Federal do Pará (UFPA). Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-2245-3807>.

<sup>4</sup> Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Pará (UFPA). Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-0241-6662>.

<sup>5</sup> Doutor em Química Orgânica (UFPA). Faculdade de Eng. de Alimentos. Universidade Federal do Pará. <https://orcid.org/0000-0001-6821-6199>.

E-mail: [nelson.ufpa@gmail.com](mailto:nelson.ufpa@gmail.com)

## 1. INTRODUÇÃO

Os microorganismos fúngicos em forma de filamentos são seres minúsculos que se encontram amplamente disseminados na natureza e desempenham funções cruciais na decomposição da matéria orgânica, na reciclagem de nutrientes e nas interações simbióticas com outras plantas e animais nos ambientes terrestres e aquáticos<sup>1</sup>.

A região amazônica do Brasil é abundantemente habitada por uma variedade de espécies desses fungos, no entanto, poucas investigações têm sido realizadas sobre sua relação com os fungos filamentosos. Entre as plantas da região, destaca-se a bacaba (*Oenocarpus bacaba*), uma palmeira nativa que ocorre tanto na Amazônia quanto no Cerrado. Essa planta produz frutos comestíveis que amadurecem entre os meses de dezembro e abril<sup>2</sup>. Pertencente à família botânica Arecaceae, que possui relevância econômica como a terceira família mais significativa após as famílias Poaceae e Fabaceae, ela engloba mais de 2.500 espécies distribuídas em cerca de 200 gêneros, sendo mais predominante nos trópicos<sup>3</sup>.

Embora haja poucas pesquisas publicadas sobre a comunidade filamentosa associada a essa palmeira, particularmente em relação à produção de enzimas, estas últimas têm um papel crucial. As enzimas, moléculas de natureza proteica, possuem um papel central ao catalisar reações químicas específicas no âmbito bioquímico. Por meio de suas atividades enzimáticas, os fungos filamentosos presentes na bacaba conseguem decompor diversos compostos orgânicos complexos. Conseqüentemente, a produção de enzimas por esses fungos oferece perspectivas para o desenvolvimento de novas abordagens visando a otimização da produção de biocombustíveis, contribuições para a indústria de panificação e a geração de alimentos de caráter funcional<sup>4</sup>.

Além disso, as enzimas também desempenham um papel crucial na Biomedicina e na Biologia Molecular, sendo empregadas no desenvolvimento de metodologias analíticas, na produção de medicamentos e no tratamento de resíduos. Demonstram notável atividade e versatilidade, operando eficientemente em condições amenas de temperatura e pH, executando transformações seletivas e rápidas. Essa característica as torna altamente desejáveis como catalisadores. De maneira geral, os processos industriais que utilizam enzimas são relativamente simples, de fácil controle, energeticamente eficientes e demandam investimentos de baixo custo<sup>5</sup>.

Pesquisas têm sido direcionadas aos fungos filamentosos encontrados na bacaba, pois há comprovações científicas de que esses microrganismos apresentam uma grande diversidade de atividades enzimáticas. Um estudo recente, por exemplo, demonstrou que fungos filamentosos isolados de amostras de folhas e caules da bacaba produziram enzimas com capacidades amiloíticas, proteolíticas e lipolíticas. Tais enzimas são capazes de degradar variados tipos de biomoléculas, incluindo açúcares, proteínas e lipídios complexos, podendo futuramente serem utilizadas pela indústria farmacêutica e medicinal<sup>6</sup>.

Nesse contexto, a exploração do potencial enzimático de frutos amazônicos, como a bacaba, assume importância para a identificação de novas enzimas com aplicações biotecnológicas promissoras. Adicionalmente, essas investigações fornecem percepções relevantes sobre a diversidade microbiana associada a esse ecossistema. E, de maneira adicional, abrem novas perspectivas para a utilização de recursos renováveis na elaboração de diferentes produtos<sup>7</sup>.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial dos fungos filamentosos provenientes da bacaba quanto à produção de enzimas extracelulares.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os frutos da bacaba foram colhidos em março de 2021, na Comunidade Bosque Menino Jesus, no município de Cametá, Pará, Brasil (SisGen-Cadastro nº AAC153B), e posteriormente, acondicionados em caixas térmicas e transportados para o Laboratório de Biotecnologia de Alimentos (LABIOTEC), na Universidade Federal do Pará.

### **Isolamento e Seleção de Fungos Filamentosos**

Os frutos da bacaba foram lavados com água estéril na proporção 1:1 (p/v), passaram por uma etapa de amolecimento utilizando água estéril a  $\pm 39$  °C na proporção 300 g de fruto para 700 ml de água por 15 minutos, para facilitar a separação da polpa do caroço. Após a etapa de amolecimento, em ambiente estéril, a polpa foi separada do caroço manualmente. Em seguida, a polpa separada foi mantida em câmara úmida a  $\pm 25$ °C, por 20 dias para estimular crescimento de micélios fúngicos por meio de fermentação natural.

Para obtenção das colônias fúngicas foi realizado a inoculação dos micélios fúngicos que se desenvolverem no período de fermentação. Foi utilizado o Sabouraud Dextrose Agar, com pH ajustado para  $\sim 5,6$  com HCl, acrescido de cloranfenicol (100 mg/ L) para prevenir crescimento de bactérias. As placas foram incubadas a  $28 \pm 1$  °C, durante cinco

dias, as colônias morfológicamente semelhantes foram isoladas por repicagens sucessivas para posterior teste de atividade enzimática.

Foi identificada uma soma total de 12 variedades de fungos filamentosos com diversas morfologias macroscópicas. Cada amostra foi designada como FFB (Fungo Filamentoso da bacaba) seguido da letra A e um número.

### **Avaliação do Potencial Enzimático dos Fungos Filamentosos Isolados**

Posteriormente, para avaliar o potencial enzimático dos fungos de filamentos encontrados na bacaba, empregou-se o método semiquantitativo. Nesse procedimento, foi examinada a formação de zonas de degradação circulares, também conhecidas como halos, resultantes da atividade de enzimas como amilase, celulase, pectinase e lipases. Para essa finalidade, porções do meio de cultura Potato Dextrose Agar (KASVI, São José de Pirabas, Brasil) contendo o crescimento de cada fungo individualmente foram transferidas para o centro de placas de Petri contendo um meio sólido especialmente formulado para estimular a produção das enzimas mencionadas anteriormente. Cada experimento foi repetido duas vezes.

#### **a) Potencial amilolítico**

Foi conduzida uma análise do potencial de produção de amilase por meio da aplicação da metodologia proposta por Khokhar, Mukhtar e Mushtaq<sup>8</sup>, com certas modificações. O substrato utilizado consistiu em um gel mineral contendo os seguintes componentes: 0,5 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), 1,0 g/L de nitrato de sódio ( $NaNO_3$ ), 1,0 g/L de fosfato de potássio dibásico ( $KH_2PO_4$ ), 0,01 g/L de sulfato de ferro ( $Fe_2SO_4$ ), 20 g/L de ágar. A fonte de carbono empregada foi o amido solúvel, na concentração de 20,0 g/L. O pH inicial do meio foi ajustado com ácido clorídrico 1N, para 6.0 e subsequentemente, o meio passou por um processo de esterilização em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Placas estéreis foram então preenchidas com aproximadamente 20 mL desse meio preparado. Cada amostra de fungo filamentoso, previamente isolado, foi submetido a um processo de recultivo em uma placa contendo o gel mineral solidificado. Essas placas foram então incubadas em uma estufa bacteriológica a 30 °C por 72 h.

Ao término desse intervalo, realizou-se a observação do halo de degradação do amido, utilizando uma solução de lugol. Para essa finalidade, uma quantidade de 15 mL da solução foi delicadamente vertida sobre a superfície das placas, sendo removida imediatamente em seguida. Em uma etapa subsequente, as placas foram submetidas a uma incubação de 10 minutos, a uma temperatura de 30 °C, também em uma estufa. A detecção da atividade amilolítica foi confirmada mediante a formação de uma região clara em formato de halo, circundada por uma coloração azulada, conforme relatado por 9 DEB et al.<sup>9</sup>.

### **b) Potencial pectinolítico**

A capacidade pectinolítica dos fungos filamentosos foi examinada através do seu crescimento em um meio de ágar sal mineral modificado. Este meio consistiu em 2,0 g/L de nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>), g/L de fosfato de potássio dibásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 0,5 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), 0,5 g/L de cloreto de potássio (KCl), 0,01 g/L de sulfato de ferro (Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), e 20,0 g/L de ágar suplementado com 10,0 g/L de pectina cítrica. Essa abordagem metodológica foi adaptada do trabalho de Reddy e Sreeramulu<sup>10</sup>. O pH inicial do meio foi ajustado para 7,0 com hidróxido de sódio a 1N e, em seguida, o meio foi esterilizado usando uma autoclave a 121°C por um período de 15 minutos.

Posteriormente, foram distribuídos aproximadamente 20 mL desse meio em placas de Petri estéreis. As placas contendo fragmentos de cada fungo isolado foram incubadas em uma estufa bacteriológica a 30 °C por 72 h. A degradação da pectina foi avaliada por meio da observação do halo de decomposição após a adição de 15 mL de uma solução de lugol, seguida de descarte. A formação de zonas claras ou amareladas ao redor das colônias pôde ser identificada, indicando a atividade pectinolítica desses fungos.

### **c) Potencial celulolítico**

A capacidade de decomposição de celulose dos fungos isolados foi avaliada utilizando o método proposto por Teather e Wood<sup>11</sup> com algumas adaptações. O meio de cultura em ágar mineral foi preparado com as seguintes concentrações: 2,0 g/L de nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>); 1,0 g/L de fosfato de potássio dibásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>); 0,5 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O); 0,5 g/L de cloreto de potássio (KCl); 0,01 g/L de sulfato de ferro (Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); 15,0 g/L de ágar. Como única fonte de carbono, foi empregada

carboximetilcelulose a uma concentração de 10,0 g/L. O pH inicial do meio foi ajustado para 5,0 e, posteriormente, o meio foi esterilizado através de autoclavagem a 121 °C por um período de 15 minutos. Aproximadamente 20 mL do meio de cultura foram distribuídos em placas estéreis. Cada fungo filamentoso previamente isolado foi submetido a um novo cultivo em placas contendo o meio de ágar mineral. As placas foram então incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C por 72 h.

Após a incubação, uma solução de vermelho Congo a 0,1% (15 mL) foi adicionada à superfície das placas e mantida por um intervalo de 30 minutos. Em seguida, a solução de vermelho Congo foi removida e substituída por 15 mL de uma solução de NaOH 1 N por um período de 10 minutos. Após esse procedimento, a solução de NaOH 1 N foi descartada e as placas foram examinadas para identificar a presença de zonas claras ou áreas amareladas/avermelhadas ao redor das áreas onde os fungos foram inoculados.

#### d) Potencial lipolítico

O potencial de lipólise foi estabelecido conforme o estudo de Diniz e colaboradores<sup>6</sup>, uma cultura foi introduzida em um meio contendo 0,19 g/L de nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>), 0,59 g/L de fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 0,25 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO<sub>4</sub> .7H<sub>2</sub>O), g/L de cloreto de potássio (KCl), 0,005 g/L de sulfato de ferro (II) heptahidratado (FeSO<sub>4</sub> .7H<sub>2</sub>O), juntamente com 5 g de glicose e 15 g de ágar bacteriológico para cada litro de meio. Além disso, o meio foi enriquecido com 2% de Tween 80 e o pH foi ajustado com uso de hidróxido de sódio a 1N para 6,5. Vale ressaltar que não foi necessário adicionar uma solução reveladora. A confirmação da atividade da enzima lipase ocorreu através da formação de regiões transparentes ao redor das colônias, indicando a degradação completa dos ácidos graxos.

Para calcular o índice enzimático (IE), procedeu-se pela correlação entre o diâmetro médio da zona de degradação e o diâmetro médio do crescimento do fungo filamentoso, de acordo com a Equação (1). Os isolados que exibiram um IE de 2 ou mais foram categorizados como eficientes fabricantes de enzimas extracelulares<sup>12</sup>.

$$IE = \frac{\text{Diâmetro do halo}}{\text{Diâmetro da colônia}} \quad (1)$$

Simultaneamente à avaliação do potencial enzimático, a taxa de desenvolvimento de cada micélio nos substratos sólidos com diferentes fontes de carbono foi examinada. A magnitude do crescimento micelial foi quantificada após um período de 72 horas de incubação do fungo filamentosos, e a taxa de expansão foi determinada ao relacionar o tamanho do micélio com o tempo de incubação, de acordo com a Equação (2). Os resultados adquiridos foram representados como o Índice de Taxa de Crescimento (ITC), medido em milímetros por hora (mm/h)<sup>13</sup>.

$$IVC = \sum \frac{DFC}{TI} \quad (2)$$

Onde:

IVC= Índice de velocidade de crescimento.

DFC = Diâmetro Final da Colônia;

TI = Tempo de Incubação.

Por último, efetuou-se a execução das análises estatísticas utilizando o programa Statistica versão 10.0. Foi empregado um plano experimental completamente aleatório para examinar os resultados adquiridos. As discrepâncias entre as médias foram avaliadas por meio do teste de comparação múltipla de Tukey ( $p < 0,05$ ). No entanto, previamente à aplicação do teste de Tukey, conduziu-se o teste de normalidade utilizando a abordagem de Shapiro-Wilk, o qual resultou em uma distribuição normal ao considerar as linhagens das cepas que demonstraram crescimento.

### 3. RESULTADOS

Os resultados referentes à capacidade enzimática dos fungos filamentosos na produção extracelular da enzima amilase são apresentados na Tabela 1. Os achados indicam que os fungos filamentosos isolados exibiram uma gama diversificada de Índices de Eficiência (IE) no teste de amilase.

**Tabela 1.** Potencial amilolítico dos fungos filamentosos da bacaba \*.

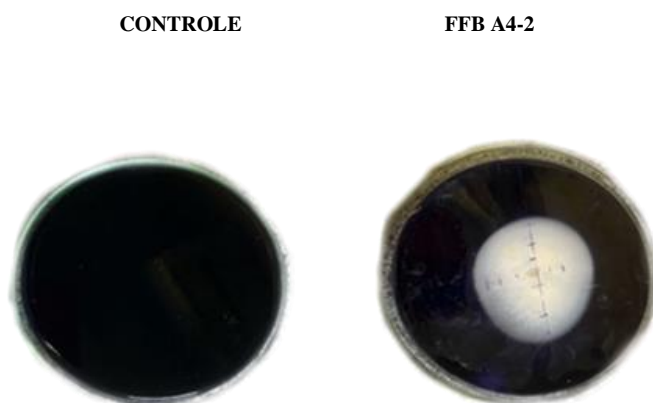
FUNGO FILAMENTOSO	DIÂMETRO MÉDIO DO MICÉLIO (mm)	DIÂMETRO MÉDIO DO HALO (mm)	IE**
FFB A1-1	0,00	0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
FFB A1-3	0,00	0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
FFB A1-4	0,00	0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
FFB A1-6	0,00	0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00

FFB A2-2	33,00	22,00	0,67 <sup>b</sup> ± 0,02
FFB A2-4	53,00	56,50	1,07 <sup>d</sup> ± 0,05
FFB A2-5	0,00	0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
FFB A3-5	0,00	0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
FFB A4-1	45,50	35,00	0,77 <sup>bc</sup> ± 0,03
FFB A4-2	30,50	33,50	1,10 <sup>d</sup> ± 0,05
FFB A4-3	38,50	22,00	0,58 <sup>b</sup> ± 0,02
FFB A4-5	27,00	21,00	0,78 <sup>bc</sup> ± 0,03

\*Médias ± desvio-padrão com letras diferentes em mesma coluna se diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\*\*Índice de Eficiência

Conforme afirmado por Khokhar, Mukhtar e Mushtaq<sup>8</sup> a fim de determinar um resultado positivo no teste de amilase, é necessário que o halo de sacarificação exiba uma coloração clara ou de tonalidade azulada. Isso pode ser claramente visualizado na Figura 1, onde os halos produzidos pelos organismos isolados demonstraram as características antecipadas.



**Figura 1.** Halo de hidrólise do amido formado pelos fungos filamentosos da bacaba.

A atividade enzimática das pectinases foi identificada pela formação de uma região clara em volta do cultivo, visível quando o lugol 0,5% foram adicionados, como ilustrado na Figura 2.



**Figura 2.** Halo de hidrólise da pectina formado pelos fungos filamentosos da bacaba.



Entre os 12 fungos examinados em duplicata, somente o isolado FFB A4-1 se destacou ao revelar um potencial mais acentuado com atividade pectinolítica igual ou superior a 2, conforme demonstrado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Potencial pectinolítico dos fungos filamentosos da bacaba\*.

FUNGO FILAMENTOSO	DIÂMETRO MÉDIO DO MICÉLIO (mm)	DIÂMETRO MÉDIO DO HALO (mm)	IE**
FFB A1-1	0,00	0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
FFB A1-3	0,00	0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
FFB A1-4	0,00	0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
FFB A1-6	0,00	0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
FFB A2-2	24,00	32,50	1,35 <sup>c</sup> ± 0,08
FFB A2-4	87,50	91,00	1,04 <sup>b</sup> ± 0,05
FFB A2-5	0,00	0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
FFB A3-5	0,00	0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
FFB A4-1	23,00	46,70	2,03 <sup>f</sup> ± 0,18
FFB A4-2	25,00	38,50	1,54 <sup>de</sup> ± 0,10
FFB A4-3	34,50	51,50	1,50 <sup>cd</sup> ± 0,10
FFB A4-5	25,00	42,00	1,68 <sup>e</sup> ± 0,12

\*Médias ± desvio-padrão com letras diferentes em mesma coluna se diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (p<0,05).

\*\*Índice de Eficiência

A presença de atividade enzimática foi evidenciada pela manifestação de uma região clara em torno do cultivo observado após a introdução de 15 mL de uma solução de vermelho congo a 0,1%, durante um período de 30 minutos, seguido por 15 mL de solução de NaOH 1 N por um intervalo de 10 minutos. Ao considerar as linhagens examinadas, destaca-se que o FFB A45 demonstra o mais elevado índice enzimático (conforme ilustrado na Figura 3).



**Figura 3.** Halo de hidrólise da celulose formado pelos fungos filamentosos da bacaba.

Os resultados referentes ao potencial enzimático dos fungos de estrutura filamentosa são apresentados na Tabela 3. No que se refere à atividade extracelular da enzima celulase, os testes revelaram que as cepas analisadas não exibiram qualquer forma de atividade celulolítica. Como consequência, esses fungos não podem ser considerados eficazes na produção de celulase. Isso se alinha com a proposição de Stamford<sup>12</sup>, que estabelece o critério de um índice de eficiência igual ou superior a 2.0 para classificar um fungo de estrutura filamentosa como um produtor promissor de uma enzima específica no meio extracelular.

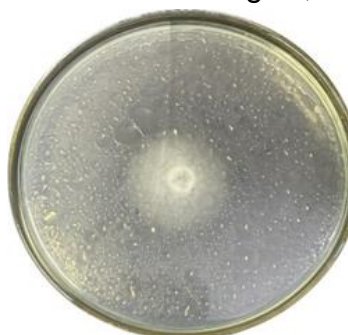
**Tabela 3.** Potencial celulolítico dos fungos filamentosos da bacaba\*.

FUNGO FILAMENTOSO	DIÂMETRO MÉDIO DO MICÉLIO (mm)	DIÂMETRO MÉDIO DO HALO (mm)	IE**
FFB A1-1	0,00	0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
FFB A1-3	0,00	0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
FFB A1-4	0,00	0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
FFB A1-6	0,00	0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
FFB A2-2	18,00	26,50	1,47 <sup>b</sup> ± 0,09
FFB A2-4	34,50	51,50	1,49 <sup>b</sup> ± 0,10
FFB A2-5	0,00	0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
FFB A3-5	0,00	0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
FFB A4-1	27,50	37,00	1,34 <sup>b</sup> ± 0,08
FFB A4-2	26,00	38,50	1,48 <sup>b</sup> ± 0,10
FFB A4-3	26,00	35,60	1,36 <sup>b</sup> ± 0,08
FFB A4-5	22,50	34,00	1,51 <sup>b</sup> ± 0,10

\*Médias ± desvio-padrão com letras diferentes em mesma coluna se diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (p<0,05).

\*\*Índice de Eficiência.

Neste contexto, não se faz necessária a adição de um agente revelador. A manifestação positiva da atividade enzimática da lipase foi evidenciada pela formação de áreas translúcidas ao redor do crescimento fúngico, indicando a completa quebra de ácidos graxos (Figura 4).



**Figura 4.** Halo de hidrólise do lipídio formado pelos fungos filamentosos da bacaba.

Os elementos determinantes que permitem a ocorrência da atividade enzimática estão intimamente ligados ao tamanho da região de influência<sup>14,15,16</sup>. Os resultados referentes ao potencial enzimático dos fungos de estrutura filamentosa na manifestação extracelular da enzima lipase estão consignados na Tabela 4. Os dados demonstram que nas estirpes dos fungos FFB A2-2, FFB A2-4, FFB A4-2, FFB A4-3, FFB A4-5, os índices de eficácia foram iguais ou superiores a 2,0. Tais cepas são consideradas detentoras de grande potencial para a produção enzimática.

**Tabela 4.** Potencial lipolítico dos fungos filamentosos da bacaba\*.

FUNGO FILAMENTOSO	DIÂMETRO MÉDIO DO MICÉLIO (mm)	DIÂMETRO MÉDIO DO HALO (mm)	IE**
FFB A1-1	0,00	0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
FFB A1-3	0,00	0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
FFB A1-4	0,00	0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
FFB A1-6	0,00	0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
FFB A2-2	18,00	26,50	2,10 <sup>c</sup> ± 0.19
FFB A2-4	34,50	51,50	2,10 <sup>c</sup> ± 0.19
FFB A2-5	0,00	0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
FFB A3-5	0,00	0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
FFB A4-1	27,50	37,00	1,40 <sup>b</sup> ± 0.08
FFB A4-2	26,00	38,50	2,60 <sup>c</sup> ± 0,29
FFB A4-3	26,00	35,60	2,70 <sup>c</sup> ± 0,31
FFB A4-5	22,50	34,00	2,40 <sup>c</sup> ± 0.24

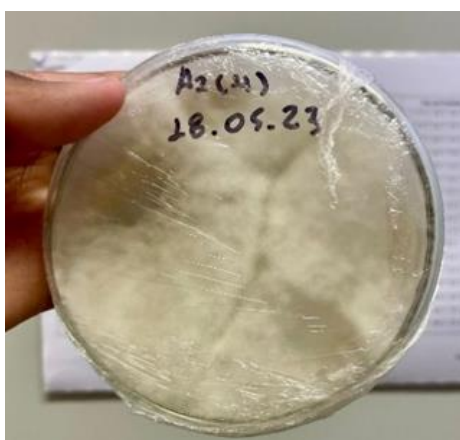
\*Médias ± desvio-padrão com letras diferentes em mesma coluna se diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (p<0,05).

\*\*Índice de Eficiência.

A partir desta avaliação, constatou-se que o substrato de cultivo examinado

desempenha um papel crucial no padrão de desenvolvimento dos fungos, uma vez que modificações nesses ambientes causam mudanças consideráveis no tamanho da colônia.

Dentre as 12 variedades de fungos filamentosos observadas, não houve desenvolvimento nas amostras FFB A1-1, FFB A1-3, FFB A1-4, FFB A2-5, FFB A3-5 e FFB A1-6. Em relação às linhagens de fungos filamentosos que demonstraram crescimento, constatou-se que a FFB A2-4 (Figura 5) exibe uma adaptação superior em todos os potenciais enzimáticos investigados neste estudo, destacando-se entre os outros fungos isolados, com valores elevados.

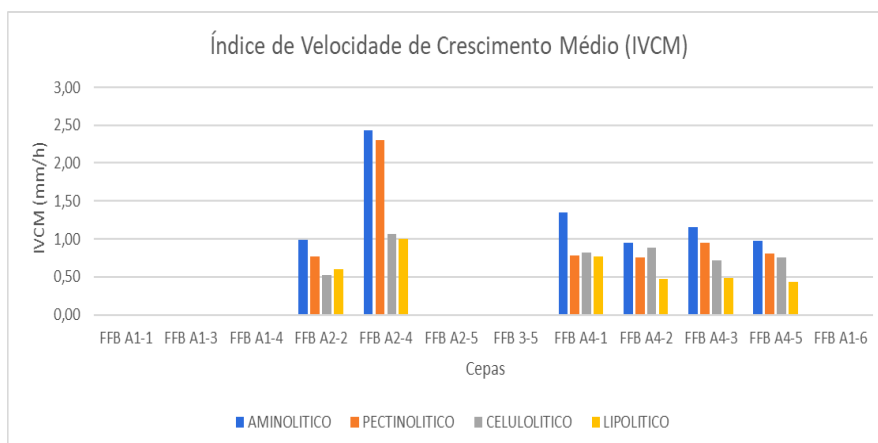


**Figura 5.** Cepa FFB A2-4 crescimento em 72 horas.

Adicionalmente, as variedades FFB A2-2, FFB A4-2 e FFB A4-5 manifestaram um comportamento similar em termos da média global. Já as cepas FFB A4-1 e FFB A4-3 apresentaram um crescimento geral satisfatório, pois ao longo de 72 horas, mesmo não ocupando completamente a superfície das placas de Petri, exibiram um crescimento regular conforme as avaliações conduzidas.

Percebe-se que apesar de apresentar um ótimo potencial enzimático, as variedades examinadas revelaram uma taxa reduzida de aumento de velocidade no exame do potencial lipolítico. Essa circunstância pode derivar das condições de cultivo, uma vez que o substrato empregado continha 2% de Tween 80, utilizado como fonte de carbono, que, de acordo com Al-Naseri et al.<sup>17</sup>, nem sempre é requerido para o desenvolvimento dos microrganismos (Gráfico 1).

**Gráfico 1.** Índice de velocidade de crescimento das cepas em 72 horas.



#### 4. DISCUSSÃO

Considerando a prática em questão, diversas abordagens são propostas para avaliar a atividade enzimática através da difusão radial em meio sólido. Os fatores fundamentais que contribuem para essa seleção estão associados à relação direta entre o diâmetro do halo formado e a eficiência de hidrólise dos microorganismos<sup>14,15,16</sup>.

De acordo com Stamford, Arquio e Stamford<sup>12</sup>, um microorganismo precisa possuir um índice enzimático igual ou superior a 2,0 para ser considerado um produtor eficiente de enzimas extracelulares em meio sólido. Os dados revelados nesta análise apontam que as linhagens avaliadas apresentaram valores de IE inferiores a 2,0 (conforme a Tabela 1). Esse cenário poderia sugerir um potencial enzimático limitado. Destaca-se que o isolado FFB A4-2 se destacou ao exibir o maior valor de IE, conforme observado no teste de Tukey.

As pectinases são geradas principalmente por plantas superiores, fungos de filamentos finos, leveduras e bactérias<sup>4,18</sup>. Características fundamentais para a utilização em processos biológicos estão presentes nas pectinases provenientes de fungos, como resistência a variações de pH e temperatura. Por esse motivo, as enzimas de origem fúngica são as preferidas em cenários industriais<sup>19</sup>. As enzimas pectinolíticas têm a responsabilidade de decompor a pectina, uma molécula complexa.

O parâmetro semiquantitativo mais frequentemente empregado na avaliação da síntese enzimática por microorganismos em substrato sólido é o índice de atividade enzimática. Microorganismos reconhecidos como produtores de enzimas demonstram uma conexão direta entre o tamanho da área de degradação e a capacidade degradativa dos mesmos<sup>15</sup>. Dessa forma, para que um microorganismo seja classificado como um produtor enzimático em meio sólido, é imperativo que a atividade enzimática seja igual ou superior a 2,0<sup>12</sup>.

A enzima lipase desempenha um papel degradativo na estrutura da parede celular, o que favorece o crescimento do fungo no tecido vegetal<sup>20</sup>. Portanto, essa enzima pode desempenhar um papel auxiliar no manejo de pragas na agricultura e na biorremediação através da decomposição de compostos estranhos ao ambiente<sup>21</sup>. Adicionalmente, a lipase pode encontrar aplicações diversas na indústria. Como exemplo, ela pode ser empregada na fabricação de produtos lácteos e seus derivados, conferindo características sensoriais distintas aos produtos resultantes<sup>22</sup>.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos fungos filamentosos isolados da bacaba, levando em consideração o seu potencial de enzimas, aproximadamente 41,67% das variantes mostraram capacidade extracelular relevante na síntese de lipases, enquanto 8,33% demonstraram essa capacidade para pectinases. No entanto, embora não tenha sido identificado potencial enzimático para atividades como amilase e celulase, foi notada, durante a monitorização da taxa de crescimento, que as estirpes cultivadas em meios amilolíticos exibiram um crescimento ótimo. Nesse sentido, considera-se a possibilidade de ajustar o meio de cultura para promover atividade enzimática nestas estirpes.

Dessa forma, a atividade enzimática dos fungos filamentosos assume relevância, visto que desempenham funções essenciais na nutrição, formação de compostos bioativos e interações com outros seres vivos. Compreender e explorar a atividade enzimática nesses organismos pode resultar em progressos substanciais em diversos campos, desde a biotecnologia até a ecologia, contribuindo para o desenvolvimento de soluções inovadoras e sustentáveis.

Essa pesquisa foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen, em associação à lei nº 13. 123/2015 e sua regulamentação, sob registro AAC153B.

## REFERÊNCIAS

1. Abreu JASD, Rovida AFDS, Pamphile JA. FUNGOS DE INTERESSE: APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS. Uningá Review [Internet]. 2015 Jan 12;21(1):55–59. Available from: <https://revista.uninga.br/uningareviews/article/view/1613/1224>.

2. Cláudia Puerari, Karina Teixeira Magalhães-Guedes, Rosane Freitas Schwan. Bacaba beverage produced by Umutina Brazilian Amerindians: Microbiological and chemical characterization. 2015 Oct 1;46(4):1207–1216.
3. Cleiton José A, Lemus E, Coutinho A. Germinação e tolerância à dessecação de sementes de bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.) 1. Revista Brasileira de Sementes [Internet]. 2012;34:651–657. Available from: <https://www.scielo.br/j/rbs/a/FQhBpYJf88cfpnSgxZvkfz/?format=pdf>.
4. Bravo CEC, Carvalho EP, Schwan RF, Gómez RJHC, Pilon L. Determinação de condições ideais para a produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. Ciência Agrotecnológica. 2000; 24:137-152.
5. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações [Internet]. 2012;7(3): 97–109. Available from: <https://typeset.io/papers/enzimas-de-interesse-industrial-producao-por-fungos-e-2jws9ry4ug>.
6. Diniz F, et al. Atividade enzimática de fungos endofíticos de bacaba (*Oenocarpus bacaba* MART.). Biota Amazônia. 2020 dez;10(3):7–11.
7. Fernandes AP. Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes. 2009. (Tese) Doutorado em Ciência dos Alimentos - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.
8. Khokhar I, Mukhtar I, Mushtaq S. Isolation and Screening of Amylolytic Filamentous Fungi. Journal of Applied Sciences and Environmental Management. 2011 Apr 20;15(1): 203-206.
9. Deb P, Talukdar SA, Mohsina K, Sarker PK, Sayem SA. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. SpringerPlus [Internet]. 2013;2(1):154-166. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3631119/>
10. Reddy PL, Sreeramulu A. Isolation, identification and screening of pectinolytic fungi from different soil samples of Chittoor district. Int J Life Sci Biotechnol Pharma Res. 2012;1(3):186-193.
11. Teather RM, Wood PJ. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Applied and Environmental Microbiology. 1982 Apr;43(4):777–780
12. Stamford TLM, Araújo JM, Stamford NP. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). Ciência e Tecnologia de Alimentos. 1998 Oct;18(4):382-385.

13. de Araújo JA, Ferreira NR, da Silva SHM, Oliveira G, Monteiro RC, Alves YFM, et al. Filamentous fungi diversity in the natural fermentation of Amazonian cocoa beans and the microbial enzyme activities. *Annals of Microbiology*. 2019 Jun 20;69(9):975–987.
14. Miroslav Ceska. Enzymatic Catalysis in Solidified Media. *European journal of biochemistry*. 1971 Sep 1;22(2):186–192.
15. Lin JE, Chang DCN, Shen GJ, Wang HY. Correlations among several screening methods used for identifying wood-decay fungi that can degrade toxic chemicals. *Biotechnology Techniques*. 1991 Jul;5(4):275–280.
16. Neto JA, Cunha BCA. Método rápido para a triagem de fungos amilolíticos e seus mutantes. *Rev Microbiol*. 1987;18:264-268.
17. Al-Naseri A, Bowman JP, Wilson R, Nilsson RE, Britz ML. Impact of lactose starvation on the physiology of *Lactobacillus casei* GCRL163 in the presence or absence of tween 80. 2013 Nov 1;12(11):5313–22.
18. Bom EPS, Ferrara MA, Corvo ML. *Enzimas em biotecnologia*. Rio de Janeiro RJ: Editora Interciência; 2008. p. 506.
19. Martin N, Souza SR de, Silva R da, Gomes E. Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2004 Sep;47(5):813–819.
20. 1. Atalay MA, Koc AN, Demir G, Sav H. Investigation of possible virulence factors in *Candida* strains isolated from blood cultures. *Nigerian Journal of Clinical Practice* [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2024 Apr 25];18(1):52–55. Available from: [https://journals.lww.com/njcp/fulltext/2015/18010/investigation\\_of\\_possible\\_virulence\\_factors\\_in.10.aspx](https://journals.lww.com/njcp/fulltext/2015/18010/investigation_of_possible_virulence_factors_in.10.aspx).
21. Stępniewska Z, Kuźniar A. Endophytic microorganisms—promising applications in bioremediation of greenhouse gases. *Applied Microbiology and Biotechnology* [Internet]. 2013 Sep 19;97(22):9589–9596. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3825493/>.
22. Javed S, Azeem F, Hussain S, Rasul I, Siddique MH, Riaz M, et al. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* [Internet]. 2018 Jan 1;132:23–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28774751/>.