

PROSPECÇÃO DE ATIVIDADE ANTI-MICROBIANA E BIOCATALÍTICA EM FUNGOS ENDOFÍTICOS. Paulo R. B. Toledo, Ângela R. Araujo, Henrique C. Trevisan - Química - Departamento de Química Orgânica – Instituto de Química - Campus Araraquara

Ao longo do tempo os fungos têm sido importantes fontes naturais de compostos com atividade biológica. Dentre eles os fungos endofíticos, microrganismos que vivem nos espaços intercelulares dos tecidos de plantas, vêm sendo reconhecidos como potenciais produtores de metabólitos secundários bioativos e de enzimas. Por esta razão, a prospecção para se encontrar novas fontes de enzimas é requerida, juntamente com a escolha e implantação de métodos adequados de prospecção de atividades biocatalíticas.

Várias metodologias para a prospecção biocatalítica têm sido avaliadas incluindo o uso de adrenalina, indicadores de pH, acetato de 2-naftila, acetato de 4-nitrofenila e a rodamina B, cada uma para atividades enzimáticas específicas. A adrenalina reage em segundos com o periodato de sódio para formar o adrenocrômio avermelhado. Neste ensaio lipase ou esterase hidrolisam o substrato, gerando glicerol, que é oxidado pelo periodato de sódio. As leituras espectrofotométricas de absorção da amostra após a adição da adrenalina são realizadas em $\lambda = 490$ nm. A reação enzimática neste ensaio é quantificada de forma indireta, pois analisamos a quantidade de periodato que não reagiu com o glicerol, liberado pela reação.

No método utilizando adrenalina os substratos (triacetina, acetatos de glicose e galactose) foram diluídos a partir de uma solução estoque de 10 mM em acetonitrila para a concentração de 1 mM; as enzimas foram diluídas a partir de uma solução estoque de 1 mg/mL em tampão fosfato pH (7,2 – 8,0). O NaIO_4 foi adicionado ao meio com concentração final de 1mM, a adrenalina foi dissolvida em água acidificada com HCl. Variou-se a concentração dos substratos, com tempos de incubação de 30 minutos a 2 horas, mantendo a temperatura de 40°C, através de banho termostatzado. A enzima lipase AY30 foi utilizada como padrão positivo de atividade.

O uso do indicador de pH baseia-se na liberação de ácido pela ação de esterases, com conseqüente decréscimo de pH do meio, que é monitorado através da coloração. O indicador utilizado foi o azul de bromotimol, em tampão fosfato pH 8,0. Neste ensaio utilizou-se como substrato o butirato de etila e como controle positivo a esterase de fígado suíno (PLE), que hidrolisa o butirato de etila, liberando ácido butírico, com redução do pH do meio e mudança de cor do indicador azul de bromotimol de azul para verde e depois amarelo. As medidas espectrofotométricas neste ensaio foram realizadas na faixa da luz azul em 616 nm. O método mostrou-se sensível para até 5,0 $\mu\text{g/mL}$ de PLE. Os produtos da hidrólise enzimática dos acetatos de 2-naftila e de 4-nitrofenila são amarelos em pH levemente básico, mudando a coloração do meio e podendo monitorar a atividade de esterases. A incubação teve duração de 30 minutos e foi mantida à temperatura ambiente. Quando se utilizou o acetato de 2-naftila observou-se que mesmo após um período de incubação de 30 minutos com enzima não ocorreu hidrólise do substrato por ação enzimática, ao contrário do esperado, segundo a literatura (GILHAM e LEHNER, 2005). Os valores de absorbância final e inicial, através da ação enzimática para lipase e esterase são muito próximos e baixos. Conclui-se que a velocidade da reação é muito lenta (método pouco sensível) ou que a reação não ocorre. Este ensaio não se mostrou adequado para a prospecção de atividades para lipases ou esterases. No caso do substrato 4-nitrofenila notou-se aumento significativo da absorbância em 410 nm quando se adicionou as enzimas esterase PLE-Sigma e PLE-dialisada em diferentes concentrações, cujo meio passa de incolor para coloração amarela. Neste método os valores experimentais das leituras da variação de absorbância com o tempo devem ser analisados descontando-se a taxa de auto-hidrólise do acetato 4-nitrofenila.

No ensaio fluorimétrico foi utilizada uma solução de agar com rodamina B e um substrato específico para lipases (óleo de oliva), sendo a fluorescência monitorada em comprimento de onda 485 nm (excitação) e 590 nm (emissão). As leituras foram realizadas no leitor de microplaca (SynergyTM HT –Multi-Detection Microplate Reader). Observou-se um pequeno aumento da fluorescência emitida até 10 a 15 minutos de inoculação. Após este período a fluorescência sofre um decréscimo não muito significativo. Utilizou-se como controle positivo a lipase de *Candida rugosa*. Notou-se também em ensaio paralelo que não ocorreu atividade enzimática para esterases (PLE dialisada e PLE sigma), sendo este ensaio específico para lipases (JETTE e ZIOMEK, 1994).

Conclui-se das metodologias para prospecção biocatalítica que o uso agentes colorimétricos como a adrenalina mostrou-se mais sensível para lipases do que para atividade de enzimas esterase. Contudo, o método usando acetato de 4-nitrofenila mostrou-se mais sensível e específico para esterases. Nos ensaios com indicadores de pH pôde-se notar maior sensibilidade, porém deve-se tomar cuidado com possíveis falso positivos, seja por amostras ácidas ou possíveis reações de hidrólise paralelas.

Os métodos apresentados, discutidos e avaliados, com ênfase aos aspectos positivos e negativos de cada um deles, apontando os mais adequados para ensaios de atividade biocatalítica para a prospecção de atividade biocatalítica em fungos endofíticos.

Referências Bibliográficas

JETTE, J.F ; ZIOMEK, E. . Determination of Lipase Activity by a Rhodamine - Triglyceride - Agarose Assay .ANALYTICAL BIOCHEMISTRY .v. 29 p. 256-260, 1994.

GILHAM,DEAN ; LEHNER,RICHARD. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. **Science direct**, 2005

Bolsa: CNPq/ PIBIC