***Screening* de fungos endofíticos das folhas de** *Ricinus Communis L.* ***(Mamona)* para produção de enzimas hidrolíticas**

Bruna Thais Stuani (PIBIC/Unioeste/PRPPG), Maria Luiza Fernandes Rodrigues (Orientadora), Cíntia Kruger, Aline Awadallak, e-mail: brunatstuani@gmail.com

Universidade Estadual do Oeste do Paraná/Centro de Engenharias e Ciências Exatas/Toledo, PR.

Ciências Exatas e da Terra - Química

**Palavras-chave:** Lipases, fungos, mamona.

**Resumo**

O objetivo do presente trabalho é utilizar fungos endofíticos isolados das folhas de *Ricinus communis L.* (mamona) para realizar o “*Screening*” de produção de enzimas hidrolíticas. A mamona (*Ricinus communis L*., *Euphorbiaceae*) é um membro da família *Euphorbiaceae* (eufórbio) e é nativa principalmente das regiões tropicais e subtropicais. A busca por microrganismos capazes de secretar enzimas para o aperfeiçoamento de técnica de hidrólise tem sido cada vez maior. No presente trabalho foram analisados fungos endofiticos filamentosos, selecionando os potenciais produtores de enzimas. Para verificar se a linhagem fúngica produzem enzimas hidrolíticas como lipases foram realizados testes em placas de Petri com meio ágar bacteriológico contendo fonte de carbono, sais minerais, extrato de levedura 2,0 g/L e Tween 80 0,01%. A produção das enzimas hidrolíticas em placas de Petri foi confirmada pela formação de diferentes halos após a revelação com solução reveladora.

**Introdução**

O Brasil é um dos países com uma grande diversidade mundial, representando 20% da flora mundial. Contudo, a riqueza da vegetação brasileira não é otimamente utilizada (Oliveira *et al*., 2012). Microrganismos endofíticos são definidos como organismos que habitam pelo menos um período de seu ciclo vital, o interior de um vegetal, sem causar aparentemente nenhum dano a este (Sordi, 2007).

A mamona (*Ricinus communis L., Euphorbiaceae*) é um membro da família *Euphorbiaceae* (eufórbio), é nativo principalmente das regiões tropicais e subtropicais. O Brasil é o terceiro maior produtor de mamona do mundo, ficando atrás somente da Índia e da China (Tan *et al*.,2013). A mamona (*Ricinus communis L., Euphorbiaceae*) possui uma grande variação no seu habitat o de crescimento, cor da folhagem, tamanho das sementes, conteúdo do óleo, altura das plantas e sofrem com as condições ambientais, como temperatura e umidade. Seu potencial econômico e medicinal é amplo, possuindo diversas aplicações industriais. O principal produto econômico é o óleo de rícino, o qual é extraído de seu fruto, tendo como destaque o biocombustível (Moreira, 2009).

Fungos endofíticos podem ser encontrados colonizando tecidos de todas as plantas, independentemente de sua filiação taxonômica ou preferencias ambientais. A maioria dos fungos endofíticos e sua significância ecológica ainda devem ser devidamente caracterizadas, mas presume-se que variam de acordo com o hospedeiro e o ambiente (Huang *et al*., 2015). Entre um grande número de microrganismos não patogênicos capazes de produzir enzimas úteis, os fungos filamentosos são particularmente interessantes devido ao seu fácil cultivo, e elevada produção de enzimas extracelulares de grande potencial industrial (Bennett, 1998).

Enzimas são catalisadores biológicos, oferecendo processos muito mais competitivos comparado com catálises químicas (Souza *et al.,* 2004). Podemos citar a lipase como uma das enzimas com maior aplicação industrial. As lipases são utilizadas na indústria para hidrólise de óleos e gorduras e processamento do leite; na indústria de detergentes; na produção de kits de diagnósticos para determinação de lipídeos no sangue; na síntese de ésteres de aroma e síntese do biodiesel (Fernandes, 2007).

O Brasil tem um grande potencial para aumentar este comércio devido à geração de resíduos agroindustriais propícios para a produção enzimática. Nesta perspectiva, a busca por microrganismos capazes de secretar enzimas para o aperfeiçoamento da técnica de hidrólise enzimática viabilizará a ampliação do mercado brasileiro na produção mundial de enzimas. O objetivo do presente trabalho é utilizar fungos endofíticos isolados das folhas de *Ricinus communis L.* (mamona) para realizar o “*Screening*” de produção de enzimas hidrolíticas.

**Material e Métodos**

As amostras foram coletas de folhas da mamona (*Ricinus communis L)* encontradas nas proximidades do Campus da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, no município de Toledo, PR entre os meses de agosto de 2015 e março de 2016. Para a coleta, foram selecionadas aleatoriamente plantas adultas e jovens apresentando folhas com aspecto sadio e juvenil. As plantas utilizadas foram devidamente marcadas. Os isolamentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. O material botânico coletado foi processado no prazo de 24 horas. Após a coleta foi lavado abundantemente para retirar o excesso de epifíticos, matéria orgânica e resíduos sólidos. Antes do processo de descontaminação externa os pecíolos foram vedados com parafina, a fim de evitar que os agentes de descontaminação penetrassem por essas aberturas, alterando o resultado real do isolamento.

Em seguida, em câmara asséptica, as folhas foram lavadas em água destilada esterilizada por duas vezes e posteriormente o material foi imerso em álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito 3% por 4 minutos e novamente em álcool 70% por 30 segundos, e lavado três vezes em água destilada estéril da qual foi retirado 50 μL para fazer o controle da assepsia. Após desinfestação, foram retirados discos foliares (6 mm diâmetro) transferidos para placas de Petri contendo o meio batata-dextrose-ágar (BDA) suplementado com o antibiótico cloranfenicol (100 mg.L-1) e incubados à temperatura ambiente (25 ± 2 ºC).

As colônias fúngicas que se apresentavam distintas umas das outras, de acordo com observações macroscópicas (coloração e características de crescimento em meio de cultura), foram agrupadas, com a finalidade de facilitar o estudo. O crescimento das colônias fúngicas foi acompanhado diariamente. À medida que surgiram, foram transferidas para tubos de ensaio contendo BDA inclinado e armazenadas a 4ºC (Pimentel *et al*., 2006). A identificação dos fungos endofíticos realizou-se através da observação macroscópica das colônias e das estruturas de reprodução pela técnica do microcultivo e sua identificação baseou-se em literatura especializada. Para garantir a presença de apenas um exemplar na amostra para posterior identificação foram purificadas em meio BDA, preservadas pelo método da sub-cultura e armazenadas a ± 4 ºC. Após 14 dias de crescimento em estufa foram obtidos 14 grupos de fungos classificados de FEM (fungo endofitico de mamona). Após 30 dias de crescimento em estufa foram obtidos 18 grupos de fungos divididos de A até R, e então foram subdivididos numericamente conforme a quantidade e diversidade de fungos que cada placa continha, obtendo-se a placa A1, A2, A3 e assim sucessivamente. Desta forma, houve o isolamento fúngico através da técnica do esfregaço com alça de Drigalsk, com placas que continham Agar Sabouraud – clorofenicol. Após o procedimento as placas foram incubadas na estufa a 28°C para novo crescimento e, em seguida perfizeram-se as lâminas para a identificação fúngica por microscopia óptica. Para conservar as colônias fúngicas isoladas, utilizou-se meio inclinado Ágar Rose.

Para verificar se as cepas fúngicas produziam lipase, foram realizados testes em placas de Petri com meio em ágar BDA (batata dextrose ágar) contendo o corante Rodamina B 0,001 %, óleo de oliva 1 %, MgSO4.7H2O 0,2 g/L; K2HPO4 0,7 g/L, KH2PO4 0,4 g/L; extrato de levedura 2,0 g/L e Tween 80 0,01 %. A produção de lipase em placas de Petri foi confirmada pela presença de halos alaranjados, fosforescentes ao UV, após 24, 48, 72, 96, e 120 h de incubação em estufa a 290C. As cepas produtoras de lipases foram mantidas em meio sólido de ágar Rose com repiques mensais.

**Resultados e Discussão**

Este trabalho demonstrou um estudo preliminar do isolamento de fungos endofíticos das folhas da mamona (*Ricinus communis L.*) para a produção de lipases. O crescimento fúngico, resultado do isolamento das folhas da mamona (*Ricinus communis L.*), foi observado pelo período de 30 dias. Após 7 dias obtiveram-se os primeiros crescimentos (grupos A, B, C, D e E). Com 16 dias na estufa surgiu um segundo grupo de fungos que foram classificados como F, G, H, I, J, K, L, M e, com 20 dias cresceram o terceiro e último grupo que foram designados em N, O, P, Q, R. As placas que restaram foram observadas até 30 dias, porém não apresentaram crescimento algum. De acordo com a quantidade e diversidade dos fungos os grupos foram subdivididos de forma numérica, obtendo-se ao final do isolamento um total de 30 fungos.

Após novo crescimento destes fungos, foi realizado um estudo preliminar para se conhecer o fungo com melhor produção de lipase em placas de Petri contendo ágar BDA (batata dextrose ágar) contendo o corante Rodamina B 0,001 %, óleo de oliva 1 %, MgSO4.7H2O 0,2 g/L; K2HPO4 0,7 g/L, KH2PO4 0,4 g/L; extrato de levedura 2,0 g/L e Tween 80 0,01 %. Esse método é de “*screening”* de produção de lipase, onde o óleo de oliva age como indutor da produção de lipase e a Rodamina B como corante para identificação em câmara de UV (região 254 nm). A produção de lipase foi confirmada pela presença de halos alaranjados, fosforescentes ao UV. Após 24 h de incubação em estufa a 290C, foi observada fluorescência em 25 das 30 cepas fúngicas isoladas. Porém, os melhores resultados foram observados para os fungos R1 e R2. O fungo R1 foi observado em microscópio óptico onde se constatou a ausência de esporos. As cepas isoladas são selvagens e ainda não foram caracterizadas, mas serão enviadas para caracterização. Na literatura, encontram-se alguns trabalhos científicos nos quais foram estudados os fungos endofíticos da mamona (*Ricinus communis L.*). Zarela *et al.* (2004) descreveu alguns fungos isolados de sementes de mamona, tais como os gêneros: *Fusarium, Penicillium, Rhizopus, Alternaria, Epicocum, Botrytis, Cladosporium e Pestalotia.* Rocha *et al.* (2007) também estudou os fungos de sementes de seis cultivares de mamona (*Ricinus communis L.*) observando a incidência dos gêneros *Fusarium ssp.* (84,5%), seguido de *Penicillium* ssp. (48,6%), *Alternaria* ssp. (17%) e *Rhizopus* ssp. (13,6%).

**Conclusões**

Verificou-se que foi possível realizar o isolamento das cepas fúngicas a partir das folhas de *Ricinus communis L.* (mamona). Em trabalhos futuros, o estudo será ampliado, buscando a caracterização dessas cepas fúngicas.

**Agradecimentos**

A Unioeste pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de iniciação científica.

**Referências**

Bennett, J.W. (1998). Mycotechnology: O papel dos fungos em biotecnologia. *Journal Biotechnol* **66**, 101-107.

Fernandes, M.L.M. (2007). *Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise*. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Química Orgânica, Universidade Federal do Paraná.

Huang, N., An, H., Song, H., Mao, H., Shen, W., Dong, J. (2015). Diversity and biotrasformative potencial of endophytic fungi associated withth emedicinal plant *Kadsura angustifolia. Researchin microbiology* **166**, 45-55.

Moreira, M.A., Rodrigues, M.L.F. (2009). *Produção de lipases fúngicas por FES com aplicações biotecnológicas.* Trabalho de Conclusão de Curso, Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde, Universidade Tuiuti do Paraná.

Pimentel, I.C.; Kuczkowski, F.R.; Chime, M.A.; Auer, C.G.; Grigoletti, J.A**.** (2006). Fungos Endofíticos em Folhas de Erva-Mate (*llex paraguariensis* *A. St.-Hil*.).*Floresta*, **36**, 123-128.

Rocha, M.S.R, Oliveira, M.I.P., Medeiros, C., Azevedo, C.F, Beltrão,N.E.M., Carvalho, J.M.F.C., Almeida, F.A.C., Nascimento, L.C., Bruno, R.L.A. (2007) Fungos associados à sementes de mamoneira cultivadas na região de Barbalha, CE, Safra 2007. 3º Congresso Brasileiro de Mamona. Campina Grande, Paraíba, Brasil.

Sordi, R. (2007). Estudo químico e biológico de fungos endofíticos isolados das folhas de *Styrax camporum Pohl* (*Styracaceace*). http://hdl.handle.net/11449/97987. Acesso em 18 de julho de 2016.

Souza, A.Q.L., Souza, A.D.L., Astolfi, S.F., Pinheiro, M. L., Sarquis, M I.M., Pereira, J.O. (2004). Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourealongiflora* (aubl.) riche *Strychnoscogens* bentham. *Fundação Oswaldo Cruz* (185-195). Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Tan, M., Yan, M., Wang, L., Yan, X., Fu, C., Wang, L. (2013). Replication of pistillate plants of *Ricinus communis L.* and investigation of the sexstability and genetic variation of the soma clones. *Industrial crops and products* **50**, 50-57.

Zarela, G.C.N.Z., Ueno, B., Silva, S.D.A., Gomes, A.C. (2004). Fungos associados às sementes de seis cultivares de mamoneira (*Ricinus communis L.*) cultivadas na região de Pelotas, RS, Safra 2003/2004. 1 º Congresso Brasileiro de Mamona. Campina Grande, Paraíba, Brasil.