

Fungos produtores de enzimas associados à macrófitas aquáticas do rio Negro, Manaus

João Marcelo Lima¹, José Odair Pereira², Ieda Hortêncio Batista³, Pedro de Queiroz Costa Neto⁴, Suely de Souza Costa⁵, João Lúcio Azevedo⁶

1. Universidade do Estado do Amazonas - UEA, Brasil.

jlima873@gmail.com

<http://lattes.cnpq.br/5666694288994264>

<http://orcid.org/0000-0002-3470-2516>

2. Universidade do Amazonas, UA, Brasil.

joseodairpereira@yahoo.com.br

<http://lattes.cnpq.br/5559640659851194>

<http://orcid.org/0000-0002-0441-381X>

3. Núcleo de Estudos Superiores de Manacapuru (Universidade do Estado do Amazonas - UEA, Brasil).

iedahbatista@gmail.com

<http://lattes.cnpq.br/5290529604475961>

<http://orcid.org/0000-0001-8465-3129>

4. Departamento de Ciências Fundamentais e Desenvolvimento Agrícola, Faculdade de Ciências Agrárias (Universidade Federal do Amazonas, Brasil).

senaneto16@yahoo.com.br

<http://lattes.cnpq.br/9441888603413825>

<http://orcid.org/0000-0002-1907-7492>

5. Coordenação de Pesquisas em Ciências Agrônomicas, Departamento de Ciências Agrônomicas (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Brasil).

sscosta@inpa.gov.br

<http://lattes.cnpq.br/7541403510959881>

<http://orcid.org/0000-0003-4127-7324>

6. Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Universidade de São Paulo, Brasil).

jlazevedo@usp.br

<http://lattes.cnpq.br/2302429651674634>

<http://orcid.org/0000-0003-0503-3525>

RESUMO

O ambiente amazônico se destaca por exuberante biodiversidade, principalmente, em relação aos micro-organismos como fungos e bactérias associados a diferentes espécies de plantas; nesse ambiente, a procura por enzimas produzidas por esses micro-organismos é de extrema importância, pois abre caminho para conhecer essa biodiversidade e transformá-la em potencial enzimático com várias finalidades. Fungos isolados de macrófitas aquáticas, encontradas no rio Negro, Manaus-AM foram selecionados por meio de diferentes testes enzimáticos. Nesta avaliação utilizaram-se diferentes protocolos para amilase, celulase, proteases, pectinase e lacase. A seleção dos isolados foi avaliada por meio de um índice enzimático representado por um halo ao redor das colônias, sendo considerado como parâmetro para todas as análises. Os métodos estatísticos multivariados aplicados foram: Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agupamento (AA). A identificação molecular das cepas foi realizada com o kit comercial Plant/Fungy DNA isolation (NorgenBiotekCorp), sendo identificados os seguintes fungos: *Fusarium fugikuri*, *F. oxysporum* (dois isolados), *F. proliferatum*, *Phoma* sp (dois isolados) *Rhizopus oryzae* (dois isolados). Dentre os 8 isolados avaliados, todos produziram amilase (0,7 a 4,4 cm) e protease (1,9 a 4,4 cm), cinco produziram pectinase (1,8 a 2,9 cm) três produziram celulase (0,1 a 1,7 cm) e somente um isolado produziu lacase (1,04 cm). Por meio da análise multivariada foi possível verificar que os *Fusarium* spp. apresentaram maior similaridade quanto aos índices registrados. Esses resultados evidenciam o potencial desses micro-organismos em relação à produção de enzimas pelos fungos associados à macrófitas aquáticas encontradas no rio Negro em Manaus.

Palavras-chaves: Fungos, enzimas, plantas aquáticas.

Enzyme-producing fungi associated to aquatic macrophytes of the Negro river, Manaus

ABSTRACT

The Amazonian environment stands out due to its exuberant biodiversity, speciously when it comes to microorganisms such as, fungi and bacteria associated to different plant species. In such an environment, the search for these microorganisms-producers of enzymes is of utter importance since it opens the way to learn more about this biodiversity so as to turn its enzymatic potential into various purposes. Fungi isolated from aquatic macrophytes found on the Negro river, were selected through enzymatic assays. The present assessment has utilized the protocols for amylase, cellulase, proteases, pectinase and laccase. The selection was evaluated by means of an enzymatic index, which represented a halo around the colony and was considered a parameter for all the analyses. The multivariate statistical methods applied were: Principle Component Analysis (PCA) and Cluster Analysis (AA). The molecular identification of the strains was performed with the commercial Plant / Fungi DNA isolation kit (Norgen Biotek Corp), and the following fungi were identified: *Fusarium fugikuri*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *Phoma* sp and *Rhizopus oryzae*. Amongst the eight isolates assessed, every one produced amylase (0.7-4.4 cm) and protease (1.9-4.4 cm), however, five of them produced pectinase (1.8-2.9 cm), three cellulase (0.1-1.7 cm) and just one laccase (1.04 cm), as well. Through the multivariate analysis it was possible to verify that *Fusarium* spp., presented greater similarity to the recorded indexes. These results demonstrated the potential of these micro-organisms when it came to the production of enzymes by fungi associated to the aquatic macrophytes found on the Negro river in Manaus.

Keywords: Fungy, enzymes, aquatic plants.

Introdução

O Brasil se destaca em biodiversidade por possuir um vasto campo a ser explorado: a busca de micro-organismos que apresentem características desejadas para diferentes aplicações como, por exemplo, a produção de enzimas é um campo de destaque.

A região Amazônica concentra a maior floresta tropical e a maior bacia hidrográfica do mundo com, respectivamente, 6,7 milhões e 6,9 milhões de quilômetros quadrados. A biodiversidade da Amazônia está distribuída em diferentes ambientes representadas pela floresta de terras altas, sava-

na, floresta de igapó e planícies de enchimento, tornando o Brasil um dos países com maior biodiversidade do planeta (PEREIRA et al., 2017).

Neste contexto, os micro-organismos endofíticos, aqueles que habitam pelo menos um período do seu ciclo de vida no interior de um vegetal, e os epifíticos que vivem na superfície das plantas, ambos ainda pouco explorados na Amazônia, tem muito a contribuir para a busca de novas enzimas (ARAÚJO et al., 2010; WENZEL et al., 2013; AZEVEDO e QUECINE, 2017). Esses micro-organismos associados a diferentes espécies de vegetais, incluindo as

macrófitas, podem gerar, em condições otimizadas, diferentes enzimas de interesse comercial. Dentre as enzimas de importância industrial, produzidas por fungos, foram abordadas neste estudo a lacase, pectinase, amilase, protease e celulase.

As lacases são de extrema importância na área biotecnológica, pois são enzimas responsáveis pela quebra da lignina e de polímeros complexos de efluentes industriais e hidrocarbonetos do petróleo. Micro-organismos que produzem enzimas dessa natureza, podem ser facilmente empregados em processos de descontaminação desses ambientes poluídos (ALMEIDA et al., 2017). Neste sentido, Pacheco e Soares (2014) utilizaram lacase produzida por *Aspergillus niger* para a biodegradação de efluentes da indústria papelreira, obtendo ótimos resultados na degradação de compostos fenólicos. Souza et al. (2016) utilizaram as enzimas lacases provenientes de *Megasporoporia* sp. e *Sordariales* sp. isolados de sedimentos contaminados por hidrocarbonetos na Amazônia para serem utilizados na degradação de HPAs.

As pectinases são enzimas hidrolíticas, utilizadas na indústria de bebidas na clarificação de sucos de frutas e vinhos e, neste sentido, a utilização industrial dessa classe de enzimas cresce continuamente. Andrade et al. (2011) descreveram a produção de poligalacturonase da mesma família das pectinases por *Bacillus* sp. por meio de fermentação submersa. Lima et al. (2017) mostraram que linhagens de *Penicillium griseoroseum*, isolados de plantas na cidade de Viçosa (MG) foram utilizadas na produção de pectinases. Na revisão bibliográfica realizada por Lima et al. (2017) observa-se que essas enzimas são importantes no processo industrial, pois podem ser utilizadas na degradação de polissacarídeos, sendo que as pectinases seriam as únicas capazes de degradar a pectina altamente esterificada sem a prévia ação de outras enzimas.

De acordo com Freitas et al. (2014), as amilases são enzimas de amplo espectro na indústria de aditivos, detergentes e alimentos. Neste sentido, Almeida et al. (2017) descrevem que os fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Rhizopus oryzae* endofíticos isolados de material em decomposição na Mata Atlântica, mostraram-se bons produtores de amilase.

As proteases são enzimas que além da importância fisiológica são utilizadas no processo industrial, principalmente na área de alimentação e na produção de detergentes (RAZZAQ, 2019). Neste sentido, Mandal (2019) relata a importância comercial desta enzima devido a sua demanda em escala mundial, mais precisamente dois terços do mercado mundial requer a utilização desta enzima na indústria de alimentos. Esta mesma autora chama a atenção para a pesquisa por fungos endofíticos, devido ao seu potencial na produção desta e de outras enzimas.

As celulases são enzimas extremamente importantes no processo de sacarificação e já são amplamente utilizadas no processo de produção de álcool de segunda geração. Neste contexto Tescher et al. (2016) utilizaram o fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. para a produção de celulase para diferentes usos na indústria.

Esta pesquisa teve como principal objetivo identificar a produção de diferentes enzimas de interesse comercial, por fungos endofíticos e epifíticos associados a plantas aquáticas do rio Negro.

Metodologia

Amostras e material biológico

Os isolados utilizados fazem parte da Coleção de Culturas do Laboratório de Bioativos da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). As amostras fúngicas foram obtidas em 2014 de macrófitas aquáticas *Cyperus ligularis* L. e *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. provenientes do rio Negro. As coordenadas geográficas dos locais de coleta foram: Latitude Sul: 3° 8' 30" Longitude W. G. R. 50° 59'. As espécies vegetais foram identificadas no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). As respectivas catalogações foram: (INPA 259.241), (INPA 259.239) e os fungos isolados foram armazenados conforme o método Castellani (1939).

Os ensaios com os fungos foram feitos após cultivá-los em placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA) (Himedia) a 28 °C ± 2 °C por nove dias.

Isolamento dos fungos epifíticos e endofíticos

Os fungos epifíticos e endofíticos foram isolados de raízes, caules, folhas e flores. Para os epifíticos o material vegetal coletado foi lavado superficialmente com água corrente, e a seguir cortados em tamanho padrão (5 cm). Os fragmentos foram friccionados com o auxílio de um swab esterilizado nos tecidos vegetais e estriados nas placas de Petri. O meio de crescimento BDA foi suplementado com o antibiótico clorafenicol na proporção de 2 mL de antibiótico para 1000 mL de meio. As placas foram incubadas em estufa a temperaturas de 30 °C e permaneceram por um período de 3 a 10 dias.

Para o isolamento dos endófitos, foi realizada a desinfecção superficial dos tecidos vegetais. O material foi tratado com álcool a 70% por 1 minuto, solução de hipoclorito de sódio a 3% por 1 minuto, solução de álcool 70% por 30 segundos. Como controle foi utilizada a água de lavagem inoculada em placas de Petri contendo BDA. Após esse processo, o material foi cortado em fragmentos de 5 a 7 mm com o auxílio de um furador de papel e dispostos em placas. As condições para crescimento foram as mesmas dos epifíticos (PEREIRA et al., 1993; PETRINI; MULLER, 1986).

Identificação molecular dos fungos

A identificação molecular dos fungos foi realizada somente para as amostras que deram resultado positivo para a produção de enzimas. Para a extração do DNA foi utilizado o plant/fungo DNA isolation kit (Norgen Biotek Corp) conforme as recomendações do fabricante. Foram utilizados os primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para amplificação da região conservada em posições específicas do 18S e 28S do gene rDNA. Os fragmentos obtidos do gene rDNA contendo a região ITS1-5,8S-ITS2 originaram (531 pb a 562 pb). Os amplicons foram purificados com polietileno glicol 8000 e sequenciados em analisador genético ABI 3500xL (Applied Biosystems®). As sequências foram alinhadas e editadas no programa MEGA com agrupamento pelo método Neighbor-Joining e utilizadas para classificação dos isolados comparando-se com as sequências tipo com base nos resultados observados no BLASTn.

Avaliação das Atividades Enzimáticas

Avaliação de atividade da Lacase

Para esta análise 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. Os demais reagentes foram solubilizados a pH 7 e autoclavados. O meio foi vertido em placas de Petri e posteriormente inoculado com culturas jovens e 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 (SANTOS, 2007).

Avaliação da atividade da Amilase

O cultivo foi realizado em placas de Petri contendo meio mínimo no qual a glicose foi substituída por amido e pH 6,8. As colônias foram incubadas a 25 °C sob um fotoperíodo de 12 h. Após cinco dias de cultivo foram então aplicados em cada placa 2 mL de solução lugol 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).

Avaliação da atividade de Celulase

A atividade da celulase foi observada a partir do cultivo em placas de Petri contendo ágar carboximetilcelulose. As colônias foram incubadas por cinco dias a 25 °C no escuro e, em seguida, submetidas a choque térmico, por 16 h a 50 °C; após esse período, foram adicionados 10 mL de solução corante de vermelho congo em cada placa. Após 30 minutos, a solução foi descartada e as culturas foram lavadas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M, visando revelar o halo claro e estreito de degradação da celulose ao redor da colônia (PEREIRA, 2009).

Avaliação da atividade da Proteinase

Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio solidificado específico com pH 6. A gelatina foi autoclavada separadamente e, em seguida, misturada ao meio antes de vertê-lo em placas de Petri. As colônias foram incubadas por 48 h a 25 °C, no escuro. Após este período, o halo é caracterizado por uma região amarelada ao redor da colônia, contrastando com o revelador vermelho de metila (2%) utilizado (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

Avaliação da atividade de Pectinase

Os isolados fúngicos foram cultivados em meio de cultura Czapeck ágar com pH 6,8. 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%).

Para a avaliação dos halos de produção enzimática revelados, foi utilizada a fórmula a seguir:

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

Análise Estatística

O emprego dos procedimentos multivariados (Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise de agrupamentos – AA) permitiram avaliar o conjunto de amostras de fungos filamentosos, nos quais são conhecidos os valores de características quantitativas (enzimas). A ACP é útil para obtenção de um *insight* sobre os padrões de associação entre as variáveis e, analisando cada coluna da tabela dos componentes principais é possível definir cada componente, de acordo com as variáveis as quais estão fortemente associadas (LATTIN et al., 2011). Essa análise, em outros termos, tem o seguinte entendimento: a ordem decrescente de importância, a máxima variância, ou seja, a primeira componente principal exibe as mais fortes correlações com eixo 1, a segunda componente principal exibe menor variância do que a primeira variância máxima e não sendo correlacionada com eixo 1 e assim por diante (MOITA; NETO 1998; JOHNSON, 2000). Posteriormente foi realizada a Análise de Agrupamento (AA) onde foi possível agrupar as atividades enzimáticas por similaridade e dissimilaridade. A suposição básica de sua interpretação é esta: quanto menor a distância entre os pontos, maior a semelhança entre as amostras (JOHNSON, 2000).

As estatísticas foram realizadas por meio do Software SPADN/WINSPADN versão 3.5.

Resultado e Discussão

Identificação molecular dos isolados

O resultado da comparação das sequências com as do *National Center for Biotechnology Information* estão plotados na (Tabela 1). Os fragmentos do gene rDNA contendo a região ITS1-5,8S-ITS2 apresentaram entre 531 a 562 pb. Os fungos epifíticos (S31 e S36) isolados de *C. ligularis* foram identificados como *Phoma* sp.; *Rhizopus oryzae* (S24 e S25); *Fusarium oxysporum* (S32 e S33); e *F. proliferatum* (S42). Foram selecionados dois isolados endofíticos, *F. fujikuroi* (S42) e *Rhizopus oryzae* (S24 e S25).

Tabela 1. Identificação molecular dos fungos endofíticos e epifíticos isolados de macrofitas do rio Negro- Amazonas/Brasil, utilizando como referência os dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Iso*	Micro-organismos	Sequências Comparadas NCBI	Sequências depositadas NCBI	Hospedeiros	Endo.*	Epi.*	Id.*(%)
S24	<i>Rhizopus oryzae</i>	KJ460029.1	KU948381	<i>Cyperus ligularis</i>		X	99
S25	<i>Rhizopus oryzae</i>	KF031329.1	-	<i>E. crassipes</i>	X		97
S36	<i>Phoma</i> sp.	KM246267.1	-	<i>C. ligularis</i>		X	100
S31	<i>Phoma</i> sp.	KM979945.1	KU948382	<i>C. ligularis</i>		X	100
S32	<i>Fusarium oxysporum</i>	JX406507.1	KU948385	<i>Eichhornia crassipes</i>		X	99
S33	<i>F. oxysporum</i>	EU151472.1	KU948386	<i>C. ligularis</i>		X	98
S42	<i>F. proliferatum</i>	KJ020897.1	KU948386	<i>C. ligularis</i>		X	99
S46	<i>F. fujikuroi</i>	KM369868.1	KU948383	<i>C. ligularis</i>	X		99

*Iso= Isolado; Endo = Endofítico; Epi = Epifítico; Id = Identidade

Atividade enzimática obtida

Os resultados obtidos para avaliar a capacidade de produção enzimática das oito amostras de fungos estão sumarizados na (Tabela 2). Todos os isolados foram capazes de produzir pelo menos duas enzimas dentre as cinco avaliadas.

A lacase foi produzida somente por *Phoma* sp. De acordo com a revisão encontrada na publicação de Pacheco e Soares (2014) as lacases são enzimas que catalisam pela abstração de um elétron, uma grande variedade de substratos orgânicos e inorgânicos e, estas enzimas vêm sendo estudada em diversas aplicações na indústria e em processos de biorremediação; além da produção de enzimas, na literatura mais recente há relatos sobre a produção de importantes metabólitos bioativos pelo gênero *Phoma* como por exemplo: o composto chamado isocumarinas fomasatina, que mostrou atividade citotóxica seletiva contra a linhagem de células HL-60 (SANG et al., 2017).

Rai et al. (2015) relataram o uso de espécies desse gênero na síntese biológica de nano partículas de prata (NPs) por *Phoma gardeniae*. Neste trabalho eles encontraram inibição de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Salmonella choleraesuis* e *Pseudomonas aeruginosa* quando comparados com antibióticos comerciais.

Lima et al. (2016) relataram a utilização desse gênero isolado de macrofitas aquáticas do rio Negro na produção de emulsificantes, com baixa atividade tóxica para *Artemia salina*. Lee et al. (2016) descobriram que o gênero *Phoma* isolado de algas marinhas da espécie *Pterocladia capillacea*, produz a partir de caldo fermentativo diferentes compostos, entre estes um com potencial anti-inflamatório.

Esses dados demonstram que o gênero *Phoma*, comum na região amazônica, necessita de estudos tanto do ponto

de vista enzimático quanto da produção de novos compostos bioativos de importante aplicação na saúde.

A produção de pectinase foi observada nos gêneros *Fusarium* e *Phoma* com variação da atividade enzimática entre 1,8 a 2,4 cm, que pode ser considerada como uma boa produção, pois estão próximos ou acima de 2 cm. Farias et al. (2015) destacaram a importância do estudo das pectinases de origem fúngica, devido às inúmeras aplicações, como na indústria de fermentação dos chá, café e cacau, além de aplicações na extração de óleos essenciais. Santos et al. (2019); também evidenciaram a produção de pectinase por fungos endofíticos isolados de *Sapindus saponaria* L. Isso mostra que esses micro-organismos são extremamente importantes na geração de produtos de origem natural.

Amilases e proteases foram medidas em todos os isolados. As atividades enzimáticas evidenciaram que a produção de amilase foi maior que os registrados na literatura por Santos et al. (2019). Wenzel et al. (2013) realizaram estudos com fungos endofíticos e evidenciaram a degradação de amido em cultivos de *Fusarium* sp. e *Phoma* sp. na produção de amilase e proteases, empregando-se a mesma metodologia deste trabalho.

O *Fusarium oxysporum* foi relatado por Picoli et al. (2016) na produção de nanopartículas de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) biogenicamente sintetizadas que atuaram eficientemente em todas as bactérias produtoras de beta-lactamases, dentre elas a *E. coli* tipo selvagem e bactérias produtoras de beta-lactamases.

Os trabalhos de Villela et al. (2018), Odeniyi et al. (2019), Mezzomo et al. (2019) e Zang et al. (2020), relatam o uso do gênero fusário para obtenção de diferentes enzimas extracelulares. Mostrando com isso o potencial desse gênero na busca por enzimas, assim como na compreensão de sua relação com o solo e plantas hospedeiras.

Tabela 2. Atividade enzimática dos isolados frente aos diferentes substratos enzimáticos.

Fungos	Teste enzimático medido em triplicata				
	Atividade enzimática das amostras (cm)				
	Lacase	Pectinase	Amilase	Proteases	Celulase
S 24 <i>Rhizopus oryzae</i>	0	0	0,9	4,2	0
S 25 <i>Rhizopus oryzae</i>	0	0	0,7	4,2	0
S 31 <i>Phoma</i> sp.	1,04	0	2,9	2,6	0
S 36 <i>Phoma</i> sp.	0	2,4	4,4	4,4	0,2
S 33 <i>Fusarium oxysporum</i>	0	2	3,1	1,8	0,1
S 32 <i>Fusarium oxysporum</i>	0	1,8	4,2	1,9	0,7
S 42 <i>Fusarium proliferatum</i>	0	2,9	0,6	3,4	0
S 46 <i>Fusarium fugikuroi</i>	0	2	2,5	3,6	0

Proteases também foram produzidas por todos os oito fungos ensaiados e observou-se índices de produção variando de 1,8 a 4,4 cm, evidenciando uma alta produção quando se compara com o halo de produção enzimática acima de 2 cm como referência. *Phoma* sp. produziu o maior índice medido de 4,4 cm, seguido da espécie *Rhizopus oryzae*.

Wenzel et al. (2013) utilizando *Phoma* sp. isolado da folha de soja, não encontrou atividade proteolítica para este gênero, e sim para amilase. No presente trabalho ao contrário, evidenciamos atividade ou índice observável tanto para amilase quanto para protease. Esse resultado vem ao encontro da hipótese de que a produção de diferentes enzimas por fungos endofíticos depende da espécie e de cada isolado.

A espécie *Rhizopus oryzae* produziu 4,2 cm de índice para protease seguido de *Fusarium fugikuroi* com de 3,6 cm.

Bueno et al. (2009) e Orlandelli et al. (2012) mostraram que a espécie *Rhizopus oryzae* já é um conhecido produtor de protease obtida industrialmente, assim como as espécies do gênero *Fusarium* sp. Gueneser et al. (2017) analisaram a produção de compostos aromáticos a partir de resíduos de azeite por *Rhizopus oryzae* e *Candida tropicalis*.

Os índices acima apresentados mostram-nos que de maneira geral que esses fungos são potenciais produtores de enzimas. No entanto, para verificar a contribuição da produção enzimática por indivíduo ou grupos de indivíduos, lançamos mão da análise da componente principal para averiguar melhor essa relação.

Análise da componente principal para a produção enzimática

A matriz de dados (Tabela 2) dos fungos em função da atividade enzimática dos isolados, frente aos diferentes

substratos enzimáticos permitiu a análise multivariada – ACP que estimou conjuntamente as correlações entre as variáveis dos componentes principais. No gráfico da ACP é possível visualizar as proximidades entre os fungos e os vínculos entre atividades enzimáticas (Figura 1).

A correlação positiva foi entre amilase e celulase ($r=0,66$). As correlações negativas foram encontradas entre as enzimas pectinase e lacase ($r = -0,47$), amilase e protease ($r = -0,43$) e ($r = -0,49$) entre Protease e celulase.

Na ACP no primeiro eixo fatorial absorveu (44,72%), tendo maior contribuição da variância máxima pelas enzimas: celulase, amilase e protease. No segundo eixo fatorial absorveu (29,34%), tendo contribuição das variâncias máxima das enzimas lacase e pectinase, estas não correlacionadas com a primeira componente principal. A inercia total é formada pelo plano fatorial (74,06%), reduzindo para as duas primeiras componentes principais (Figura 1).

No posicionamento das enzimas (variáveis), verifica-se que a amilase e celulase apresentaram correlação negativa com eixo 1, enquanto que a protease apresentou correlação positiva com o eixo 1. Por outro lado, a lacase apresentou correlação positiva com o eixo 2, enquanto a pectinase obteve correlação negativa com eixo 2.

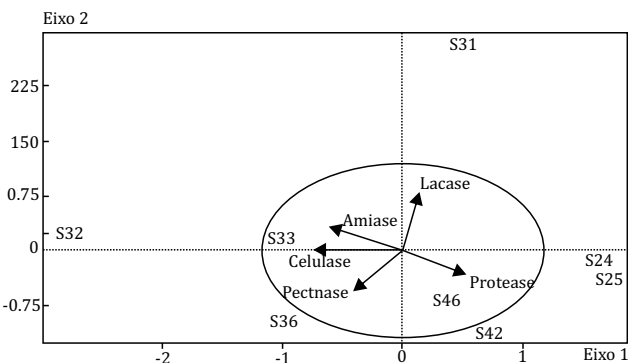


Figura 1. Representação das enzimas (variáveis) usadas na Análise de Componentes Principais.

De um lado, a análise multidimensional ACP analisa conjuntamente as variáveis contínuas. Por outro lado, ACP e AA são importantes, pois dessa forma permitem levantar hipóteses sobre a similaridade e dissimilaridade dos indivíduos (fungos) por meio da produção de substâncias entre eles (Figuras 2). Cada componente é formado pela combinação linear entre as enzimas. Sales et. al. (2010) utilizaram da mesma forma análise multivariada, para avaliar a produção de celulase e xilanase para espécies do gênero *Aspergillus*.

Na análise de agrupamento, o dendrograma na horizontal (Figura 2) mostra a ordem hierárquica do agrupamento de cada espécie em função da produção das diferentes enzimas. Percebe-se que os grupos são formados em função da quantidade ou ausência das enzimas (Tabela 2). O primeiro grupo é formado isoladamente por *Fusarium* (S32) que produziu maiores quantidades de celulase e amilase e menor quantidade de protease. O segundo grupo é formado por diferentes espécies de *Fusarium* (S33, S42 e S46) e *Phoma* (S36), com maior produção de amilase, protease e celulase e sem produção de lacase. O terceiro grupo é formado por um grupo isolado *Phoma* sp. (S31), sendo o único que produziu lacase, não produzindo pectinase e celulase, porém produzindo amilase e protease, (embora esteja mais próxima dos grupos da espécie *Rhizopus oryzae*). Finalmente, o quarto grupo foi formado por *Rhizopus oryzae*. (S25 e

S24), grupo que produziu a maior quantidade de protease, baixa quantidade de amilase, sem produção de lacase, pectinase e celulase (Figura 2).

Classificação hierárquica direta

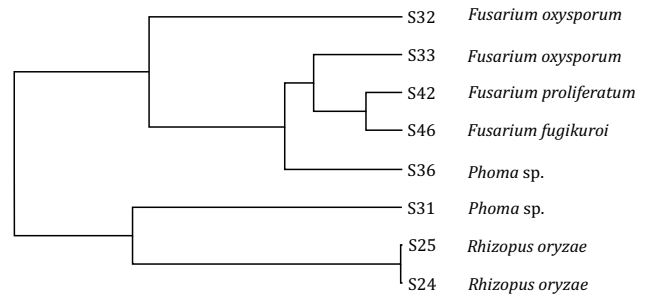


Figura 2. Dendrograma obtido da análise de agrupamento hierárquico utilizando as amostras de fungos em função das diferentes produções de enzimas (Lacase, Pectinase, Amilase, Proteases e Celulase).

Conclusão

As amostras dos isolados de fungos oriundos de plantas aquáticas do rio Negro, Manaus-AM, mostraram-se por meio da análise da componente principal - ACP, promissoras quanto à produção das enzimas: celulase, amilase e proteases. Por outro lado, foi possível verificar que os isolados de *Fusarium* spp. apresentaram maior similaridade quanto aos índices registrados. Esses resultados evidenciam o potencial desses micro-organismos em relação à produção de enzimas pelos fungos associados à macrófitas aquáticas. Assim, a presente pesquisa contribuiu para identificar fungos associados às plantas aquáticas do rio Negro, Amazônia, que podem ser utilizados para a produção de diferentes enzimas para aplicação em diferentes setores da indústria e da saúde.

Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, P. Z.; PEREIRA, M. G.; CARVALHO, C. C.; HEINEN, P. R.; ZIOTTI, L. S.; MESSIAS, J. M.; JORGE, J. A.; POLIZELLI, M. L. T. M. Bioprospection and characterization of the amylolytic activity by filamentous fungi from Brazilian Atlantic Forest. *Biota Neotropica*, v. 17, n. 3 p. 217- 337, 2017.
- ANDRADE, M. V. DELATORRE, A. B.; LADEIRA, S. A. ANDRADE VANESSA V. V.; MARTINS, M. L. L. Produção de poligalacturonase usando *Bacillus* sp. por fermentação submersa. *Perspectiva on line.com.br*, v. 5, n. 17, 2011.
- ARAÚJO, W. L.; LACAVA, P. T.; MARCON, J.; LIMA, A. O. S.; SOBRAL, J. K.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. *Guia Prático: Isolamento e caracterização de Micro-organismos Endofíticos*. Departamento de Genética. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo. Piracicaba, São Paulo, 167 p. 2010.
- AZEVEDO, J. L. QUECINE, M. C. *Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics*. Springer International Publishing, 2017.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 24, p. 270-276, 1939.
- FARIAS, T. N.; CARVALHO, I. F.; MACHADO, FABIANO. P. P.; SANDE, N. L.; SILVA, C. J. Produção de pectina liase por linhagens de fungos filamentosos em polpas de buriti e maracujá como fontes de carbono. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n.22, p. 3095, 2015.
- FREITAS, L. S.; MARTINS, E. S.; FERREIRA, O. E. Produção e caracterização parcial de α -amilase de *Syncephalastrum racemosum*. *Revista Brasileira Biociências*, Porto Alegre, v. 12, n. 4, p. 226-232, 2014.
- GUENESER, O.; DEMIRKOL, A. Y.; YONCA, K.; TOGAY, S. O.; HOSOGLU, M. I.; ELIBOL, M. Production of flavor compounds from olive mill waste by *Rhizopus oryzae* and *Candida tropicalis*. *Brazilian journal of microbiology*, v.4, n. 8, p. 275-285, 2017.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. G. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycology*, v. 67, p. 97-607, 1975.
- JOHNSON, D. E. *Métodos Multivariados Aplicados al Análisis de Datos*. México: International Thomson Editores, 2000.
- LATTIN, J.; CARROLL, J. D.; GREEN, P. E. *Análise de Dados Multivariados*. São Paulo: Cengage Learning, 2011.
- LEE, M. S.; WANG, S.W.; WANG, G. J.; PANG, K.L.; LEE, C. K.; KUO, Y. H.; CHA, H. J.; LIN, R. K.; LEE, T. H. Angiogenesis Inhibitors and Anti-Inflammatory Agents from *Phoma* sp. NTOU4195. *Journal National Producto*. n. 79 v. 12, p. 2983-2990, 2016.

- LIMA, J. M.; PEREIRA, J. O.; BATISTA, I. H.; COSTA NETO, P. Q.; SANTOS, J. C.; ARAÚJO, S. P.; PANTOJA, M. C.; MOTA, A. J.; AZEVEDO, J. L. Potential biosurfactant producing endophytic and epiphytic fungi, isolated from macrophytes in the Negro River in Manaus, Amazonas, Brazil. **African Journal of Biotechnology**, v. 15 n. 24, p. 1217-1223, 2016.
- LIMA, J. O.; PEREIRA, J. F.; ARAÚJO, E. F.; QUEIROZ, M. V. Pectin lyase overproduction by *Penicillium griseoroseum* mutants resistant to catabolite repression. **Brazil Journal Microbiology**, v. 48, n. 47, 2017.
- MANDAL, S.; BANERJEE D. Proteases from Endophytic Fungi with Potential Industrial Applications. In: YADAV A., MISHRA S., SINGH S., GUPTA A. (eds) **Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi**. Fungal Biology. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1_10. (2019).
- MEZZOMO, R.; ROLIM, J. M.; SANTOS, A. F.; POLETTI, T.; WALKER, C.; MACIEL, C. G.; MUNIZ, M. F. B. Aggressiveness of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* isolates to yerba-mate and production of extracellular enzymes. **Summa Phytopathologica**, v.45, n.2, p.141-145, 2019.
- MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma Introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 467-369, 1998.
- ODENIYI, O. A.; OGUNSANYA, A.; UNUOFIN, J. O. Optimization and Characterization of Tyrosinases from Multi-enzyme Producing *Fusarium solani* and *Fumago* sp. **Periodica Polytechnica Chemical Engineering**, v. 63 n. 4, p. 582-590, 2019.
- PACHECO, S. M. V.; SOARES, C. H. L. Imobilização e caracterização de lacase e seu uso na biodegradação de efluentes de indústrias papeleiras. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 209-214, 2014.
- PEREIRA J. O.; AZEVEDO J. L.; PETRINI O. Endophytic Fungi of Stylosanthes: A First Report. *Mycologia*. v. 85, p. 362-364, 1993.
- PEREIRA, J. O.; SOUZA, A. Q. L.; LEÃO, A. D.; FRANÇA, S. C.; OLIVEIRA, L. A. Overview on Biodiversity, Chemistry, and Biotechnological Potential of Microorganisms from the Brazilian Amazon In: AZEVEDO, J. L.; QUECINE, M. C. (Ed.). **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**: Springer International Publishing AG, 2017, p. 73-98.
- PEREIRA, W. V. **Caracterização e identificação molecular de espécies de Colletotrichum associadas à antracnose da goiaba no Estado de São Paulo**. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- PETRINI, L. E.; MULLER, E. Haupt-Und Nebendfruchtformen europaischer Hypoxylon-Arten (Xylariaceae, Sphaeriales) and verwandter Pilze. *Mycology Helvetica*. v. 1, p. 501-627, 1986.
- PICOLI, SIMONE U., DURÁN, M., ANDRADE, P. F., DURAN N. S. Silver nanoparticles/silver chloride (Ag/AgCl) synthesized from *Fusarium oxysporum* acting against *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) and extended spectrum beta-lactamase (ESBL). **Frontiers in Nanos Science and Nanotechnology**, v. 2 n.2, p. 107-110, 2016.
- RAI, M., INGLE, A. P., GADE, A., DURAN, N. Synthesis of silver nanoparticles by *Phoma gardenia* and *in vitro* evaluation of their efficacy against human disease-causing bacteria and fungi. *IET Nanobiotechnology*; v. 9, n. 2, p. 71-75, 2015.
- RAZZAQ, A.; SHAMSI, S.; ALI, A.; ALI Q.; SAJJAD, M.; MALI, A.; ASHRAF, M. Microbial Proteases Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, June v. 7, n. 10, 2019.
- SALES, M. R.; MOURA, R. B.; PORTO, T. S.; MACEDO, G. R.; PORTO, A. L. F. Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 11, p.1290-1296, 2010.
- SANG, X. N.; CHEN, S. F.; CHEN, G.; WANG, H. F.; PEI, Y. H. A novel 3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one with spiro-butyrolactone and a new isocoumarin isolated from the endophytic fungus *Phoma* sp. YN02-P-3. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 19, n. 5, p. 436-443, 2017.
- SANTOS, C. M.; RIBEIRO, A. S.; GARCIA, A.; POLLI, A. D.; POLONIO, J. C.; AZEVEDO J. L.; PAMPHILE, J. A. Enzymatic and antagonist activity of endophytic fungi from *Sapindus saponaria* L. (SAPINDACEAE). **Acta biológica Colombia**, Bogotá, v. 24, n. 2, p. 322-330. 2019
- SANTOS, E.S. **Micro-organismos promissores para degradação de compostos fenólicos presentes em bagaço de cana de açúcar, lodo e águas residuais de agroindústrias sulcro-alcooleiras**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2007.
- SOUZA, H. M. L., SETTE, L. D., MOTA, A. J., NETO, J. F. N., RODRIGUESA, OLIVEIRA, D. B. OLIVEIRA, F. M., OLIVEIRA, L. A., BARROSO, H. S., ZANOTTO, S. P. Filamentous Fungi Isolates of Contaminated Sediment in the Amazon Region with the Potential for Benzo(a) pyrene Degradation. **Water, Air, Soil Pollut**, v. 229, n. 451, p. 227-431, 2016.
- SPADN. Versão 3.5. Programme de Recherche et d'Enseignement en Statistique Appliquée, 1999.
- TESCHER L. Z.; MARQUES, N. P.; PEREIRA, J. C. GOMES, E.; GOMES, E.; MARTINS, D. A. B. Aplicação de celulases produzidas pelo fungo Endofítico *Botryosphaeria* sp. na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar. **Ciência & Tecnologia**: Fatec-JB, Jaboticabal, v. 8, 2016.
- VILLELA, E.S.D.; PAZIANOTTO, R.A.A. REYNALDO, E.F.; SILVA, E.H.F.M.; BUENO, A.C.S.O.; MAY, A. Evaluation of microbial and enzymatic communities in soil. And rhizosphere from soybean plants. **African Crop Science Journal**, v. 26, n. 1, p. 79 – 92, 2019.
- WENZEL, J. B.; MORESCO, A. A. DE A.; BOAS, E. V. BURIN, F. A. G.; SOUZA, R. O. Atividade enzimática e antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de soja. Perspectiva on-line. **Biologia & Saúde**, v. 9, n. 3, p. 01-15, 2013.
- ZANG, Y.Y.; YANG, S.; XU, Y.Q.; CHEN, Z.G.; WU, T. Carrier-Free Immobilization of Rutin degrading enzyme extracted from *Fusarium* spp. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. 470, 2020.