

Prospecção de atividade esterase em fungos endofíticos com indicador de pH.

Carolina Rabal Biasetto*¹ (IC), Helen C. F. Lisboa¹ (PG), João B. Medeiros¹ (IC), Dulce H. S. Silva¹ (PQ), Angela R. Araujo¹ (PQ), Henrique C. Trevisan¹ (PQ). *e-mail: carolinarabal@yahoo.com.br

¹UNESP, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Rua Francisco Degni, s/n, Araraquara, SP, Brasil, 14800-900.

Palavras Chave: Fungos endofíticos, esterases, high-throughput screening (HTS).

Introdução

Metabólicos naturais provenientes de plantas, animais e microorganismos atuam como valiosos agentes na medicina e agricultura, proporcionando uma série de benefícios à humanidade. Os fungos endofíticos são microrganismos que vivem sistematicamente no interior celular de plantas, reconhecidos pelo seu potencial na produção de fármacos, toxinas, fatores de crescimento e também como produtores de enzimas, tais como as esterases que são biocatalisadores importantes para preparação de compostos opticamente ativos, muito importantes para aplicações industriais.

Desta maneira, objetivou-se a prospecção de atividades esterases nesta classe de fungos, através de ensaios tipo "high-throughput screening" (triagem de alto desempenho), os quais permitem analisar uma determinada atividade enzimática em um grande número de microorganismos em tempo reduzido. Desenvolveu-se neste trabalho um ensaio para esterases utilizando indicador de pH, de baixo custo, fácil manuseio e boa sensibilidade.

Resultados e Discussão

A atividade esterase foi detectada por método com indicador de pH adaptado da literatura¹. O indicador utilizado foi o azul de bromotimol cuja faixa de pH está entre 6,0-7,6. Neste ensaio, a esterase hidrolisa o substrato butirato de etila levando à formação de ácido butírico que causa mudança no pH, resultando assim em uma variação de cor do meio reacional do azul ao amarelo, que pode ser observada visualmente ou monitorada espectrofotometricamente em 416 nm.

Os ensaios foram realizados em microplacas, utilizando uma suspensão fúngica de 1mg/mL. As leituras foram obtidas em termos de absorbância em 416 nm, ao final do período de 10h de incubação, sob agitação e temperatura de 37°C.

A prospecção da atividade esterase em 47 fungos resultou na classificação de grupos de fungos com diferentes níveis de atividade enzimática.

Considerando-se os resultados do controle positivo (amarela, Abs= 0,050) e do controle negativo (azul, Abs= 0,864), estabeleceu-se o critério da tabela 1:

Tabela 1. Níveis de atividade esterase em termos de absorbância.

Intervalo de Absorbância	Critério Utilizado
0,050 – 0,590	Alta atividade
0,591 – 0,750	Atividade Intermediária
0,751 – 0,850	Baixa atividade
Acima de 0,850	Não detectado

Segundo esta classificação, encontrou-se 5 fungos com alta atividade (AS-04, CV-02, PA-06, PR-03 e *T.formosa* 1), 16 com atividade intermediária (AS-02, CB-15-4, CS-02, CV-01, MC3-caule, MCF-3-16-F, PA-05, PAJ-01, RUV-02, RUV-04, RUV-06, SC-01, SF-01, SF-02 e TCF-02, *T. formosa* 2), 23 com baixa atividade (ALG-02, ALG-03, ALG-06, CB-8-3, CB-9-3, CB-10-3, CB-4-4, CL-01, CL-04, CS-01, CSY-01, CSY-06, CV-03, MC-3C, MCF-3-1, PAJ-08, PL-03, PM-03, PM-04, PR-045, RUV-01, SC-03 e XIA-01) e em 3 a atividade esterase não foi detectada (CB-7-3, MC-5F e PL-04)

Os fungos endofíticos citados foram previamente isolados atribuindo-se um código a cada linhagem como mostrado acima. Alguns foram classificados e outros se encontram em fase de classificação.

Conclusões

Dos fungos estudados, 45% apresentam alguma atividade esterase, ainda que em diferentes níveis, sendo 5 deles com alta atividade biocatalítica (AS-04, CV-02, PA-06, PR-03 e *T.formosa* 1). Os ensaios em microplaca (HTS) mostraram maior sensibilidade do método, se comparado ao ensaio em placas (dados não mostrados) realizado anteriormente, no qual em 31 dos fungos ensaiados não foi detectada a presença de atividade. O estudo está sendo feito com outros fungos usando diferentes metodologias além da prospecção de outras enzimas de interesse comercial.

Agradecimentos

A CAPES e FAPESP-BIOprospecTA pelo suporte financeiro e a CNPq pela bolsa de IC.

¹ Banerjee, A.; Kaul, P.; Sharma, R. e Banerjee, U. C. *Journal .of Biomolecular Screening* **2003**:559-565.