

Avaliação da atividade nitrilase em fungos endofíticos

Helen C.F.Lisboa^{*1} (PG), Carolina R. Biasetto¹ (IC), João B. Medeiros¹ (IC), Helder L. Teles² (PQ), Ângela R. Araújo¹ (PQ), Dulce H.S. Silva¹ (PQ), Henrique C. Trevisan¹ (PQ).

¹UNESP, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Rua Francisco Degni, s/n, Araraquara, SP, Brasil, 14800-900, e-mail: helcrisiq@yahoo.com.br

²UFMT, Instituto de Ciências Naturais e Exatas – ICEN, Departamento de Ciências Biológicas, Rod. Rondonópolis / Guiratinga Km 6, Rondonópolis, MT, Brasil, 78735-901

Palavras Chave: Fungos endofíticos, nitrilases, high-throughput screening

Introdução

Os fungos endofíticos, microrganismos que vivem nos espaços intercelulares de plantas, vêm sendo reconhecidos como potenciais produtores de metabólitos secundários bioativos e de enzimas, tais como as nitrilases. Essas podem ser utilizadas como biocatalizadores em síntese orgânica mediando uma bioconversão ecologicamente correta, limpa e branda com alta seletividade e rendimento.

As nitrilases podem ser detectadas por ensaios no formato “high-throughput screening” (triagem de alto desempenho), que permite a prospecção da atividade enzimática em grande número de amostras, gerando um banco de dados dos fungos com determinada atividade biocatalítica.

Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade nitrilase em 54 fungos endofíticos isolados de espécies do Cerrado e Mata Atlântica do Estado de SP.

Resultados e Discussão

A atividade nitrilase foi detectada através de um método colorimétrico em que uma solução tamponada de CoCl_2 é adicionada à reação de hidrólise catalisada pela nitrilase. Neste ensaio, a enzima nitrilase hidrolisa o substrato (acetnitrila) gerando amônia, que forma um complexo com o íon cobalto resultando na variação de coloração de rosa claro a amarelo. A variação de cor pode ser monitorada pela absorbância em 375 nm, sendo a hidrólise proporcional à coloração amarela formada.¹

Os ensaios foram realizados em microplacas, com concentração micelial aproximada de 1mg/mL, e as leituras feitas após 2 horas de reação.

A triagem desta atividade enzimática resultou na detecção de 4 grupos fúngicos, reunidos de acordo com os níveis de atividade biocatalítica.

Considerando que a atividade enzimática é proporcional ao aumento da densidade ótica (absorbância) em 375 nm, e que os resultados dos controles positivo (máxima coloração) e negativo (mínima coloração) foram de 0,335 e 0,089,

respectivamente, estabeleceu-se o seguinte critério:

Tabela 1. Atividade nitrilase de acordo com a medida da absorbância em 375 nm

Intervalo de Absorbância	Atividade Nitrilase
0,328 – 0,248	Alta atividade
0,247 – 0,170	Atividade Intermediária
0,169 – 0,90	Baixa atividade
Abaixo de 0,090	Não detectado

Seguindo esse critério de classificação, obteve-se 1 fungo com alta atividade nitrilase (ALG-06), 3 com intermediária atividade (PL-07, PA-04 e CL-04) e 13 apresentaram baixa atividade (TCF-02, RUV-04, MCF-3-16F, CV-01, PAJ-08, CV-03, PR-045, CL-01, SF-021, ALG-03, PAJ-01, CL-06, CS-02).

Os fungos endofíticos citados foram previamente isolados, atribuindo-se um código a cada linhagem como mostrado acima.

Conclusões

Os resultados mostram uma pequena porcentagem dos fungos com alguma atividade nitrilase (31%), sendo apenas 1 com alta atividade biocatalítica. O trabalho será prosseguido com outros fungos e diferentes metodologias, além da prospecção de outras enzimas de interesse comercial.

Agradecimentos

À CAPES, CNPq e FAPESP, pelo suporte financeiro

¹ Yazbeck, D.R.; Durao, P.J.; Xie, Z. e Tao, J. *J. of Mol. Catal. B: Enzymatic*. **2006**, 39, 156-159.