

Avaliação de atividade protease em fungos endofíticos.

Carolina R. Biasetto¹ (PG), Helen C. F. Lisboa¹ (PG), Henrique C. Trevisan (*in memoriam*) (PQ)¹, João B. Medeiros¹ (PG), Angela R. Araújo¹ (PQ), Dulce H. S. Silva¹ (PQ).

*carolinarabal@yahoo.com.br

¹NuBBE – Núcleo de Biossíntese, Bioensaios e Ecofisiologia de Produtos Naturais – UNESP, Instituto de Química, CEP 14800-900, Araraquara, SP, Brasil.

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

Introdução

Metabólicos naturais provenientes de plantas, animais e microrganismos atuam como valiosos agentes na medicina e agricultura, proporcionando uma série de benefícios à humanidade. Os fungos endofíticos são microrganismos que vivem nos espaços intercelulares de plantas. São reconhecidos pelo seu potencial na produção de fármacos, toxinas, fatores de crescimento e também como produtores de enzimas que são biocatalisadores importantes para preparação de compostos enantiomericamente puros.

Desta maneira, objetivou-se a prospecção de atividade protease 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 microrganismos em tempo reduzido. Desenvolveu-se neste trabalho um método fluorimétrico baseado no sistema calceína-cobre.

Resultados e Discussão

A atividade protease foi detectada pelo método fluorimétrico baseado na utilização de um sensor não-fluorescente para determinação indireta da atividade enzimática. Este sensor é chamado de sistema “calceína-cobre”, onde a calceína, um derivado da fluoresceína, forma um complexo não-fluorescente com o cobre. A solução contendo a enzima é submetida à reação com o substrato e o sensor. O substrato para protease é Soro de Albumina Bovino. Na presença da enzima, ocorre a liberação do aminoácido correspondente, o qual se liga ao cobre liberando o ligante calceína, cuja fluorescência é monitorada a $\lambda_{ex} = 450 \pm 50$ nm ($\lambda_{em} = 530 \pm 25$)¹. Os ensaios foram realizados em microplacas, utilizando uma suspensão fúngica de 1mg mL⁻¹. As leituras foram obtidas ao final do período de 10h de incubação, sob agitação e temperatura de 30°C. A prospecção da atividade protease em 65 fungos resultou na classificação de grupos de fungos com diferentes níveis de atividade enzimática. Considerando-se os resultados do controle positivo de 179 (máxima fluorescência) e

do controle negativo de 21 (ausência de fluorescência), estabeleceu-se o critério da Tabela 1:

Tabela 1. Níveis de atividade protease.

Faixa de Fluorescência	Critério Utilizado
113 - 83	Alta atividade
82 - 52	Atividade Intermediária
51 - 22	Baixa atividade
< 22	Não detectado

Segundo esta classificação, encontrou-se 22 fungos com alta atividade (ALG-03, CB-4-4, CB-8-3, CB-9-3, CB-10-3, CL-01, CL-03, CL-04, CS-01, CSY-01, CV-03, CV-06, MC-8R, MC-5F, MCF-3-1, PA-06, PAJ-01, PAJ-11, PR-045, RUV-01, SC-03 e XIA-01), 25 com atividade intermediária, 2 com baixa atividade e em 16 a atividade protease não foi detectada. O expressivo número de fungos com atividade protease pode ser atribuído ao fato de proteínas e peptídeos serem utilizados como fontes de nitrogênio, e requererem a presença de proteases para hidrolisá-los a peptídeos menores ou aminoácidos livres. Desta forma pode-se considerar os fungos endofíticos como excelentes produtores de proteases.

Conclusões

Boa porcentagem dos fungos apresentaram alguma atividade protease (75%). Destes, um número significativo de 34% e 38% mostraram alta e intermediária atividade, respectivamente. Estes resultados demonstram boa sensibilidade deste método para prospecção de atividade protease em grande número de amostras. Com este ensaio foi ampliada a perspectiva para novos estudos enzimáticos em coleções de fungos visando à aplicação destes em biocatálise, além da prospecção de outras enzimas de interesse comercial.

Agradecimentos

A CAPES e FAPESP pelo suporte financeiro e a CNPq/PIBIC pela bolsa de IC.

¹ Dean, K.E.S.; Klein, G.; Renaudet, O.; Reymond, J.L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2003**, *13*, 10, 1653.