



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO SUL E SUDESTE DO PARÁ
FACULDADE DE QUÍMICA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA**

PAULO DINIZ AUSTRÍACO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS
EXTRACELULASES POR FUNGOS ENDOFÍTICOS DO BABAÇU.**

MARABÁ-PARÁ

2022

PAULO DINIZ AUSTRIACO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS
EXTRACELULARES POR FUNGOS ENDOFÍTICOS DO BABAÇU.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para a obtenção grau de Licenciatura em Química, Faculdade de Química, Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marilene Nunes
Oliveira

MARABÁ-PARÁ

2022

PAULO DINIZ AUSTRIACO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS
EXTRACELULARES POR FUNGOS ENDOFÍTICOS DO BABAÇU.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Química, Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Licenciatura em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marilene Nunes Oliveira.

Data de aprovação: Marabá (PA), 24 de junho de 2022.

Banca examinadora

Profa. Dra. Marilene Nunes Oliveira
Orientador - FAQUIM/Unifesspa

Prof. Sebastião da Cruz Silva
Membro Interno - FAQUIM/Unifesspa

Prof. Dr. Darlisson de Alexandria Santos
Membro Externo - UFPE

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP) Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará Biblioteca Setorial II da UNIFESSPA

A784a Austriaco, Paulo Diniz

Avaliação do potencial de produção de enzimas extracelulares por fungos endofíticos do babaçu / Paulo Diniz Austriaco. — 2022. 29 f. : il.

Orientador(a): Marilene Nunes Oliveira.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Campus Universitário de Marabá, Instituto de Ciências Exatas, Faculdade de Química, Curso de Licenciatura em Química, 2022.

1. Babaçu. 2. Óleo de babaçu. 3. Óleos vegetais. 4. Enzimas de fungos. 5. Química vegetal. I. Oliveira, Marilene Nunes, orient. II. Título.

CDD: 22. ed.: 665.3

Dedico este trabalho a minha família em especial minha avó, mãe e tia que muito me incentivou para que este sonho se tornasse realidade.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por ter me presenteado com saúde e perseverança para realizar este trabalho, entre outras tantas coisas.

Á minha família, em especial a minha avó, tia e mãe, meu refúgio. Á minha avô Antunildes Galvão Austríaco, tia Domingas Galvão Austríaco e mãe Ângela Oliveira Diniz Maria pelos ensinamentos e apoio, as minhas irmãs Gabriele Oliveira Diniz e Taynara Diniz Amorim pela cumplicidade e amor.

Agradeço à prof^a. Dr^a. Marilene Nunes Oliveira pelos ensinamentos como orientadora, pela dedicação, apoio, paciência, oportunidades e valiosas contribuições.

Aos professores Dr. Sebastiao da Cruz Silva, Dr^a. Simone Y. S. Silva, Dr. Ulisses Brigatto Albino e Dr. Darlisson de Alexandria Santos, pela imensa contribuição no Laboratório para a execução dos experimentos e tratamento de dados.

Aos amigos Anderson Rodrigues Silva e Deisiane de Souza Silva pela amizade, por sempre estarem dispostos a ajudar não só no trabalho, mas também em todas as horas.

À Unifesspa pela oportunidade de realização deste trabalho. Enfim, àqueles que embora não citados nominalmente, que nesta caminhada, em todos os momentos, ajudaram, se não com ações, com exemplos e ensinamentos.

RESUMO

As enzimas são substâncias que vem ganhando destaque e importância para sociedade em função dos mais variados setores que encontra aplicação, por este motivo são consideradas produtos de alto valor biotecnológico. Sob a justificativa de atender uma demanda crescente por novas fontes produtoras de enzimas, o presente trabalho teve como objetivo explorar os fungos endofíticos do babaçu como produtores de enzimas extracelulares. A partir dos frutos e da folha em diferentes estágios de maturação (verde, maduro e pós-colheita) totalizando 12 fungos endófitos isolados, dos quais 11 foram testados quanto à capacidade de produção de celulase do tipo FPAses. Entre os isolados testados, CA1M apresentou atividade celulolítica de 2,27 FPU/g de substrato, atividade superior à registrada para os demais isolados. O registro de fungos endofíticos produtores de celulase, associados ao babaçu, uma espécie nativa da região amazônica, contribui para valorização desse recurso natural, bem como fornecer uma nova fonte renovável na busca por enzimas com potencial para aplicação industrial.

Palavras-chave: Babaçu. Fungos Endofíticos. Enzimas extracelulares.

ABSTRACT

Currently, enzymes are substances that occupy the second place in importance to society, due to the most varied sectors in which they find application, for this reason they are considered products of high biotechnological value. Under the justification of meeting a growing demand for new sources of enzymes, the present work aimed to explore babassu endophytic fungi as producers of extracellular enzymes. From the fruits at different stages of maturation (green, ripe and post-harvest) and leaves, 12 endophytic fungi were isolated, of which 11 were tested for the production capacity of cellulases of the FPAses type. Among the tested isolates, CA1M showed cellulolytic activity of 2,27 FPU/g of substrate, higher than that recorded for the other isolates. The record of cellulase-producing endophytic fungi associated with babaçu, species native to the Amazon region, contributes to the enhancement of this natural resource, as well as providing a new renewable source in the search for enzymes with potential for industrial application.

Keywords: Babaçu. Endophytic Fungi. Enzymes Cellulases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição geográfica dos babaçuais no brasil (Nascimento, 2004)	15
Figura 2 – Vista Esquemática do côco	16
Figura 3 – Substâncias produzidas por fungos.....	18
Figura 4 – Esquema de atuação das enzimas endoglucanase, exoglucanase e beta-glicosidase na lise da celulose.....	20
Figura 5 – Ilustração da equação do cálculo enzimático	23
Figura 6 – Isolados fúngicos.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reúne os isolados fúngicos associados e fase de maturação	24
Tabela 2 - Dados quantitativos das atividades enzimáticas em FPU/g de substrato.....	25

LISTA DE SIMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURA

g	Gramas
%	Porcentagem
PA	Pará
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMNs	Produtos Naturais Microbianos
sp.	Espécie Desconhecida
min	Minuto
s	Segundos
BDA	Batata, Dextrose e Ágar
mg	Miligrama
DNS	3,5-dinitrosalicílico, tártaro duplo de sódio e potássio.
L	Litro
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
°C	Grau Centígrado
mL	Mililitro
M	Molar
[]	Concentração
FPU	Filter Paper Unit
FPase	Filter Paper Activity
mm	Milímetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVO.....	14
2.1	Objetivo Geral.....	14
2.2	Objetivo Específico.....	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1	<i>Attalea speciosa</i>	14
3.2	Fungos Endofíticos.....	17
3.3	Enzimas extracelulares.....	19
4	METODOLOGIA.....	22
4.1	Coleta do Material Botânico.....	22
4.2	Prospecção dos Fungos Endofíticos.....	22
4.3	Produção dos Extratos Enzimáticos.....	22
4.4	Determinação da Atividade Celulolítica.....	23
4.5	Cálculo da Atividade Enzimática.....	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	24
5.1	Fungos Endofíticos do Babaçu.....	24
5.2	Avaliação do Potencial de Produção de Enzimas do Tipo Celulases.....	25
6	CONCLUSÃO.....	27
	REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA.....	28

1 INTRODUÇÃO

As enzimas, principalmente as hidrolíticas, representam uma das classes de substâncias de maior importância para sociedade atual, encontrando aplicação em diversos setores industriais, tais como, têxtil, alimentício, ambiental, biocombustíveis, entre outras sendo, portanto, consideradas produtos de alto valor biotecnológico (RIGO *et al.*, 2021).

Estudos revelam que o mercado das enzimas movimenta bilhões de dólares anualmente. Além disso, a maior fonte de produção de enzimas tem origem microbiana, com destaque aos fungos filamentosos (PAPADAKI *et al.*, 2020), que possuem a capacidade de produção de uma grande quantidade de proteínas, motivando sua exploração na busca por enzimas que possam ser aplicadas industrialmente. Entre as diversas classes de enzimas hidrolíticas (lipase, protease, pectinase, etc.) estão as celulases que vem ganhando cada vez mais atenção por sua aplicação na hidrólise da parede celular de vegetais, assumindo papel importante nos processos de produção do bioetanol de segunda geração (SCHNEIDER *et al.*, 2018).

As enzimas microbianas apresentam uma série de vantagens em relação as de outras origens, tais como, produção em larga escala, menor custo de produção e uso de condições controladas passíveis ainda de otimização durante o processo fermentativo (CORRÊA, 2014; LI *et al.*, 2021). Assim, a identificação de novas fontes promissoras à produção de enzimas microbianas surge como uma estratégia para suprir a demanda de enzimas aos mais variados setores industriais, bem como possibilita a descoberta de sistemas enzimáticos únicos. Nessa perspectiva, o presente trabalho teve como objetivo explorar o potencial de produção de celulases por fungos endofíticos do babaçu.

Os fungos endofíticos, são fungos que vivem de modo assintomático nos tecidos internos de espécies vegetais e são considerados pela literatura como produtores de metabólitos secundários que apresentam uma diversidade de atividades biológicas (ZHENG, 2021; MATTOO, 2021; FALADE *et al.*, 2021). Apesar de possuírem dois sistemas enzimáticos que possibilitam seu desenvolvimento no interior de tecidos vegetais: a) o sistema hidrolítico responsável pela degradação de polissacarídeos consistindo principalmente em xilanases e celulases; e b) o sistema ligninolítico que degrada a lignina, compreendendo principalmente as lacases, ligninases e peroxidases, são poucos os estudos voltados à exploração de fungos endofíticos como produtores de enzimas (CORRÊA, 2014). Nesse contexto, entende-se que os fungos endofíticos podem ser considerados como novas fontes

promissoras à produção de enzimas com aplicações biotecnológicas, o que motivou a realização do presente trabalho.

O babaçu (*Attalea speciosa* Mart ex Spreng), por sua vez, é uma palmeira nativa da região amazônica, de expressão econômica e social e pode ser uma excelente fonte de fungos endofíticos que possam ser aplicados em diversos processos biotecnológicos. Além disso, sua cadeia produtiva é uma das mais significantes do extrativismo vegetal no país (CAMPOS *et al.*, 2015). A partir da comprovada importância do babaçu e dos escassos estudos voltados à exploração da microbiota desta espécie, o presente trabalho merece destaque por sua originalidade, potencial para geração de bioprodutos com aplicação biotecnológica, bem como por contribuir com os esforços para conservação dos babaçuais por meio de um maior valor agregado. Este é o primeiro registro sobre fungos endofíticos associados ao babaçu e seu potencial para produção de celulases.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de produção de enzimas celulasas a partir de fungos endofíticos associados ao babaçu (*A. speciosa*).

2.2 Objetivos Específicos

Para realização do presente trabalho foi necessário:

- a) Realizar coleta do material botânico;
- b) Prospectar fungos endofíticos associados ao material botânico coletado;
- c) Produção de extratos enzimáticos ricos em celulasas;
- d) Determinação da atividade celulolítica.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Attalea speciosa*

O babaçu é uma palmeira oleífera originária do Brasil, com vasta distribuição por mais de 18 milhões de hectares, principalmente nos estados do Maranhão, Piauí, Mato Grosso e Tocantins (Figura 1). Palmeira pertencente a espécie da família botânica Aracaceae, com forte ocorrência dos babaçuais em zonas de várzeas e em pequenas colinas e elevações. O babaçu é muito conhecido entre populações tradicionais brasileiras, sendo chamada também de coco-palmeira, coco-pindoba, baguaçu, dentre outros (CARRAZZA et al., 2012).

Figura 1 - Distribuição Geográfica dos babaçuais no Brasil.

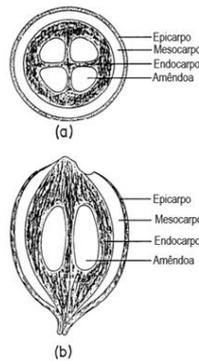


Fonte: Nascimento, 2004.

A palmeira de coco babaçu é uma planta que faz parte da vegetação secundária, ou seja, a partir do momento que ocorre o desmatamento, seguido do fogo, para o plantio de roçados, a germinação dos frutos é potencializada. As plantas de babaçu se desenvolvem bem em regiões de clima quente sendo a propagação da planta feita através das sementes (PINHEIRO, 2010). Essa espécie pode atingir 20 m de altura, folhas de 6 m de comprimento com geração de frutos a partir do 8º ano de vida, mas alcança a produção máxima aos 15 anos, vivendo por aproximadamente 35 anos. Seus frutos disponíveis em até seis cachos por palmeira, estão agrupados de 150 a 300 cocos, podendo ter entre duas a seis amêndoas em cada coco (DESER, 2007). A estrutura do fruto (Figura 2) é composta de 11% de epicarpo fibroso, 23% de mesocarpo, 59% de endocarpo e 7% de amêndoa (ARARUNA et al., 2020). De acordo com Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento (2012), apesar das poucas

informações e dados científicos no que tange a sua biologia reprodutiva e ecologia, a palmeira é uma das espécies com maior expressão econômica nas regiões de ocorrência.

Figura 2 – Vista esquemática do coco babaçu: (a) seção transversal; (b) seção longitudinal.



Fonte: Emmerich & Luengo, 1996

Uma característica ímpar do babaçu em relação a muitas outras fontes de matéria-prima é que dele se aproveita tudo. Sua madeira e folhas são utilizadas em projetos de edificação residencial. Do coco retiram-se as amêndoas, usadas na fabricação do óleo conhecido como azeite, o mesocarpo é utilizado na preparação de farinhas e sua casca é aproveitada na produção de carvão. Tudo isso é utilizado no dia-a-dia das famílias (VIVA TERRA, 2013).

Segundo o Ministério do Desenvolvimento Agrário em 2009 já havia sido catalogados mais de 60 subprodutos comercializados provenientes do babaçu desde óleo, azeite, leite, material de limpeza, cosméticos, além de carvão e outros subprodutos. Essas diferentes maneiras de aproveitamento da palmeira têm permitido uma maior agregação de valor aos seus produtos, bem como tem viabilizado a manutenção da exploração do coco babaçu.

Em termos de valor da produção, até 2011, o babaçu era considerado o segundo produto florestal não madeireiro no país, após o açaí, alcançando naquele ano R\$ 142 milhões. A partir de 2012, o valor gerado por outros produtos (castanha do-pará, erva-mate e carnaúba) passa a superar o do babaçu. A produção de amêndoas de babaçu, que se aproximava de 200 mil toneladas anuais, resumiu-se a 60 mil toneladas em 2016 (IBGE, 2016).

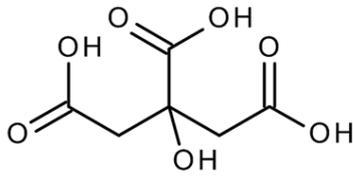
Contudo, devemos compreender a importância econômica dos produtos do babaçu e condições necessárias para delinear instrumentos não apenas para o fortalecimento desta economia, como também para reforçar a conservação dos babaçuais, proporcionando melhores condições de vida para as comunidades agroextrativistas.

3.2 Fungos Endofíticos

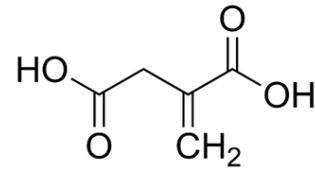
Os fungos, amplamente distribuídos em todos os habitats, são microrganismos que participam da decomposição primária em todos os ecossistemas terrestres e desempenham um importante papel ecológico no ciclo do carbono e reciclam nutrientes; são essenciais para sobrevivência de muitos grupos de organismos com os quais estão associados (mutualismo); muitos são patógenos de plantas, humanos e animais (patogênicos) (ABREU *et al.*, 2015); e outros vivem no interior de tecidos vegetais sem causar-lhes por um certo período de suas vidas danos aparentes às espécies (endofíticos).

Os fungos são potencialmente importantes para vários setores da sociedade em função do seu elevado potencial biotecnológico (ABREU *et al.*, 2015). Diferentes linhagens fúngicas têm sido utilizadas com como uma importante fonte de genes e vias metabólicas para a síntese de compostos economicamente significantes, incluindo peptídeos, vitaminas, enzimas, ácidos orgânicos (cítrico, itacônico, lático e succínico), antibióticos (penicilina), entre outros. A figura 3 traz algumas substâncias produzidas por fungos, bem como atividade biológica e espécie vegetal hospedeira.

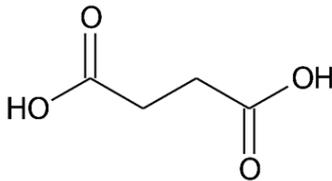
Figura 3 - Substâncias produzidas por fungos.



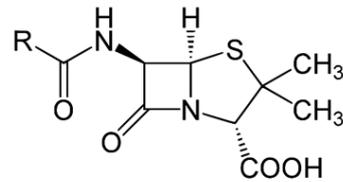
Substância: Ácido Cítrico; **Fungo:** *Aspergillus niger*;
Propriedades: controle biológico de *Salmonella*. **Fonte:**
 (Magalhães *et al.*, 2019).



Substância: Ácido Itacônico; **Fungo:** *A. itaconicus*;
Propriedades: antiviral e material de partida para produtos de
 importância agrícola e farmacêutica **Fonte:** (Cruz *et al.*, 2015).



Substância: Ácido succínico **Fungo:** *Actinobacillus succinogenes*;;
Propriedades: anti-inflamatória; **Fonte:**
 (Rodrigues *et al.*, 2021).



Substância: Penicilina; **Fungo:** *Penicillium chrysogenum*.
Planta: *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze;
Propriedades: Antibiótico; **Fonte:** (Pereira e Oliveira.,
 2016).

Entre essa gama de compostos, as enzimas, em especial produzidas por fungos, são amplamente utilizadas em processos biotecnológicos, como por exemplo nas indústrias têxteis, na produção do papel, degradação da celulose, curtimento do couro, produção de detergentes e bebidas destiladas, produção de cervejas, na panificação, produção de xaropes (sacarificação do amido), ração animal, indústria química e farmacêutica (LYND; ZHANG, 2002; MEYER, 2008; MONTEIRO; SILVA, 2009; ORLANDELLI, 2012).

Entre as classes de fungos, os endofíticos têm despertado um interesse mais acentuado por serem considerados ainda pouco explorados, gerando a expectativa para a descoberta de novas substâncias bioativas (FREIRE, *et al.*, 2014). Muitos pesquisadores demonstraram que esses metabólitos podem atuar como poderosas drogas contra patógenos humanos e de plantas, além de produtos com aplicação biotecnológica como as celulases, uma vez que vivendo no interior do tecido vegetal, naturalmente em seu desenvolvimento degradam a celulose.

Diniz e colaboradores (2020) exploraram o potencial enzimático dos isolados fúngicos endofíticos associados à bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart) e identificaram que *Aspergillus* sp., e *Phomopsis* sp. são fontes promissoras á produção de celulases e lipases. Nesse mesmo contexto, Li e colaboradores (2021) desenvolveram um estudo de otimização para a produção de celulases pelo endofítico *Penicillium oxalicum* isolado de *Taxus cuspidata*, onde chegaram

a medir uma atividade enzimática do tipo FPAse equivalente a $1,45 \text{ U mL}^{-1}$. O trabalho desenvolvido por Li e colaboradores deixa em evidência a possibilidade de melhorar o rendimento na produção das enzimas por meio de estudos de otimização através da modificação das condições de cultivo.

Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulases, porém apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural. Em condições laboratoriais, algodão, papel de filtro, dentre outros, têm sido utilizados como substratos indutores para a produção de enzimas permitindo analisar a atividade celulolítica total (RAMOS, 2003).

Nesse contexto, o presente trabalho explorou o potencial de produção de enzimas degradadoras da celulose a partir de fungos endofíticos do babaçu e usando papel de filtro como substrato.

3.3 Enzimas extracelulares

As enzimas são um grupo de proteínas que desempenham funções essenciais no metabolismo atuando como catalisadoras de processos bioquímicos (LEHNINGER *et al.*, 1995). Dentre várias funções, são capazes de decompor moléculas complexas em unidades menores (OLIVEIRA; MULLER; SEGATO, 2004). Elas detêm um importante papel principalmente na degradação da matéria orgânica originando novos produtos (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

As enzimas extracelulares estão divididas em classes e algumas delas são: lipases, proteases, pectinase, celulases, entre outras (LI *et al.*, 2021).

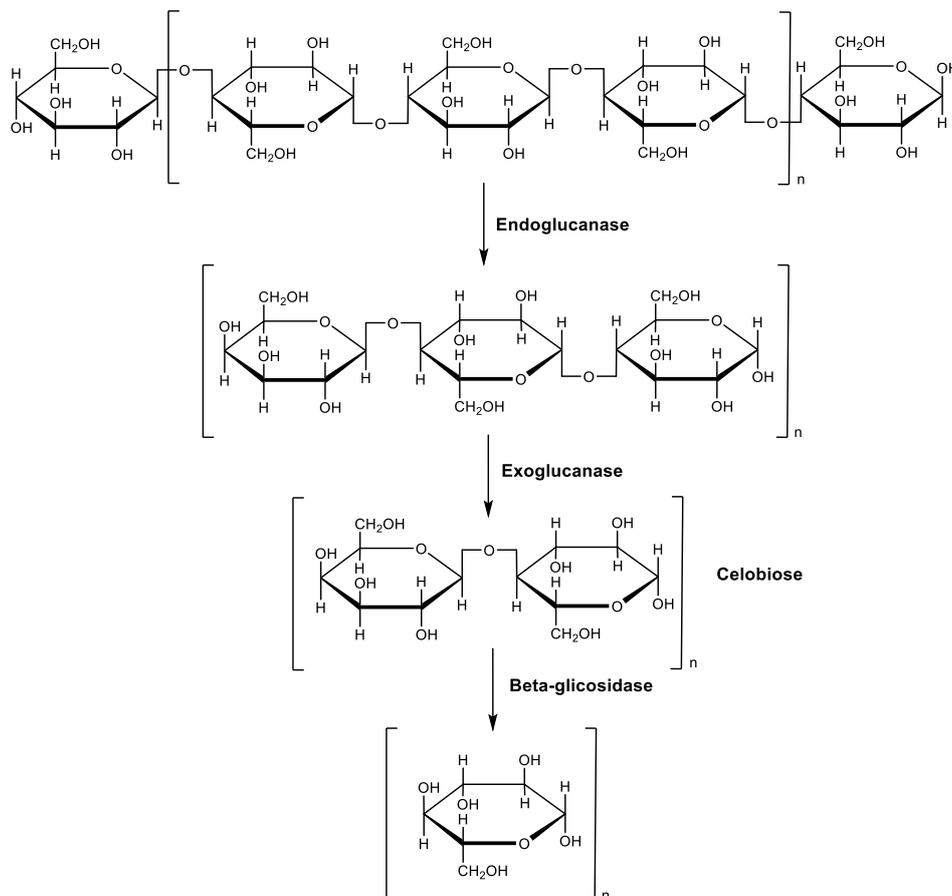
As celulases tiveram sua produção em escala industrial iniciada na década de 80, visando sua aplicação como aditivo alimentar para ração animal, de forma a aumentar a digestibilidade de ruminantes (bovinos, caprinos, etc.). Em seguida, começaram a ser utilizadas no processo de fabricação de bebidas, promovendo a clarificação de sucos de frutas e vinhos. Já na década de 90, as celulases, juntamente com as hemicelulases, representavam mais de 20% do mercado mundial de enzimas (DEKA, 2011).

As celulases possuem uma vasta aplicação na área industrial e sua demanda tem crescido nos últimos anos. Muitas indústrias utilizam celulases em diversos processos entre elas as do ramo do papel que inclui o biobranqueamento, biopolpação, descascamento,

remoção de tinta, etc; em indústrias têxteis possuem utilidade em processos que envolvem bioscruagem, biopolimento, biostonewashing, amaciamento de fibras, desbotamento de jeans, etc; e um dos maiores destaques desse tipo de enzima está na indústria de bioetanol (SINGH e BAJAR, 2021).

A atuação das enzimas do tipo celulases provém da combinação de outras enzimas que atuam em etapas diferentes do processo de hidrólise das ligações glicosídicas da celulose, sendo denominadas de endoglucanases, exoglucanases e beta-glicosidases (SHIVA e SRIVETHI, 2022). A atuação dessas três enzimas envolve etapas diferentes do processo de lise da celulose, sendo que a endoglucanase atua quebrando as cadeias de celulose em cadeias menores (oligossacarídeos), na etapa seguinte as exoglucanases exercem a função de dividir as cadeias menores em dissacarídeos do tipo celobiose, e por fim as beta-glicosidases agem quebrando as ligações glicosídicas transformando a celobiose em unidades de beta-glicose (figura 4) (PODREPSEK e KNEZ, 2019).

Figura 4 - Esquema de atuação das enzimas endoglucanase, exoglucanase e beta-glicosidase na lise da celulose.



Das classes de microrganismos conhecidas os fungos têm maior relevância frente as bactérias devido à sua capacidade de penetração e variabilidade de utilização de substrato (SINGH e BAJAR, 2021). É reportado que somente fungos possuem um tipo específico de GH (Glicosídeo hidrolase) denominado de GH7 que em ação sinérgica com outros GH's hidrolisam a celulose (LIU e HUANG, 2021).

Dentre os vários tipos de fungos os classificados como filamentosos têm maior relevância na produção de enzimas do tipo celulase (LIN e ZHAO, 2021), com destaque para os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* que são extensivamente utilizados na indústria de enzimas (LIU e HUANG, 2021).

Nesse contexto e baseado no fato de que fungos endofíticos habitam o interior de vegetais, podendo naturalmente degradar a celulose, atualmente estes microrganismos são reconhecidos como fontes potenciais à produção de celulases, objeto de exploração do presente trabalho.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta do Material Botânico

Para o isolamento dos fungos endofíticos foram feitas coletas de diferentes partes do babaçu (frutos em estágios diferentes de maturação e folhas). A coleta foi realizada no Campus II da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará-UNIFESSPA, localizada na folha 17, Quadra 04, Lote especial, Nova Marabá, Pará.

4.2 Prospecções dos Fungos Endofíticos

De cada fase de desenvolvimento do coco babaçu, foram utilizados fragmentos das partes da fibra, da casca, do fruto, além de pedaços da folha. Com o objetivo de eliminar os microrganismos epifíticos, o material botânico foi submetido ao seguinte processo de assepsia: lavagem com água e sabão e imersões em álcool 70% (1 min), solução de hipoclorito de sódio 3% (4 min) e água estéril (20 seg), nesta ordem. Após o procedimento de esterilização, os fragmentos foram dispostos em placas de Petri (03 fragmentos) com meio BDA (batata, dextrose e ágar) e antibiótico tetraciclina (500 mg L⁻¹). Após o inóculo, as placas foram armazenadas em incubadora do tipo BOD a 25 °C. A partir do surgimento das colônias fúngicas, foram feitos repiques sucessivos para a obtenção de culturas puras. Os endofíticos isolados foram armazenados conforme metodologia descrita por Castellani (1939).

4.3 Produção dos Extratos Enzimáticos

Para a produção de enzimas do tipo celulase inicialmente, os isolados fúngicos foram inoculados em meio sólido de farelo de trigo, que é preparado a partir da adição de 10 mL de solução de peptona pH 6,0 [ureia (0,30 g L⁻¹), peptona (0,75 g L⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (1,40 g L⁻¹), KH₂PO₄ (2 g L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (0,30 g L⁻¹), CaCl₂.2H₂O (0,40 g L⁻¹), ZnSO₄ (1,40 mg L⁻¹), FeSO₂.7H₂O (5,00 mg L⁻¹), CoCl₂.6H₂O (2,00 mg L⁻¹) e MnSO₄.5H₂O (1,60 mg L⁻¹)] e 5,0 g de farelo de trigo em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, o qual foi posteriormente esterilizado em autoclave à uma temperatura de 120 °C durante 20 min. Após 7 dias de cultivo, a extração das enzimas totais se deu por meio da adição de uma solução tampão de acetato de sódio 0,05 M, pH 4,5, na relação 10 mL de tampão pra cada 1 g de substrato. A mistura foi submetida à agitação vigorosa com auxílio de um agitador magnético durante 60 min, logo após, o sistema

foi submetido à filtração usando vácuo e o sobrenadante filtrado foi acondicionado em tubos Falcon de 15 mL.

4.4 Determinação da atividade Celulolítica.

Para determinar a atividade das celulases presentes no extrato enzimático, 1 mL do extrato foi transferido para 1 tubo de ensaio contendo papel de filtro (6 cm x 1 cm). Na sequência foram adicionados ao tubo 2 mL de solução de citrato de sódio 0,05 M, pH 4,8. Os tubos então foram mantidos em banho maria a 50 °C por 60 min. Após o ensaio, 0,33 mL da solução presente no tubo foram transferidos para um novo tubo de ensaio, ao qual foram adicionados 0,33 mL de água destilada e 1 mL de solução DNS (1% 3,5-dinitrosalicílico, 30% tartarato duplo de sódio e potássio e 0,4 M de NaOH). O sistema foi aquecido a 100 °C e mantido por 5 min. A solução obtida após esses procedimentos foi analisada em espectrofotômetro ajustando o comprimento de onda para 540 nm para a revelação dos açúcares redutores produzidos. O branco utilizado para esta medição foi feito na ausência do papel de filtro, mas seguindo todos os procedimentos descritos acima.

4.5 Cálculo Da Atividade Enzimática

A atividade enzimática foi obtida através da equação geral adaptada por (Ghose, 1987), como segue, e expressa em termos de *Filter Paper Units* por grama de substrato (FPU/g).

Figura 5 - Ilustração da equação do cálculo enzimático.

$$\text{Atividade} = \text{ART} \times \frac{\text{Vt}}{0,18 \times \text{Ve} \times t}$$

ART: açúcares redutores totais;

Vt: volume total do ensaio;

Ve: Volume de extrato enzimático usado;

0,18: massa referente a 1 μmol de glicose;

t: tempo de reação (min).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Fungos Endofíticos do Babaçu

A partir das amostras de babaçu foram obtidos 12 isolados fúngicos endofíticos, sendo 4 isolados a partir do epicarpo, 5 a partir do endocarpo, 1 da amêndoa e 2 a partir das folhas do babaçueiro. A tabela 1 reúne os isolados fúngicos associando-os as amostras vegetais e fase de maturação. Atualmente, os isolados estão preservados na micoteca do Laboratório de Biologia multidisciplinar da Faculdade de Química/Unifesspa.

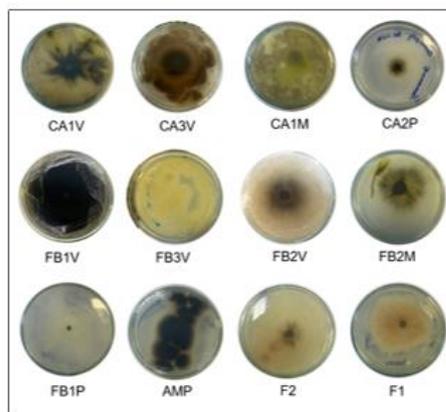
Tabela 1 - Reúne os isolados fúngicos associados e fase de maturação.

	Epicarpo	Endocarpo	Amêndoa	Folhas
Coco verde	CA1V CA3V	FB1V, FB2V, FB3V		
Coco maduro	CA1M	FB2M		
Coco pós-colheita	CA2P	FB1P	AMP	
Folhas				F1, F2

CA1, CA2 e CA3 = isolados da casca do coco; V, M e P = fases de maturação do coco; FB1, FB2 e FB3 = isolados da fibra do coco; AM= isolado da amêndoa; F1 e F2 = isolados das folhas.

Fonte: Autor, 2022.

Figura 6 - Isolados fúngicos



Fontes: Autor, 2022

5.2 Avaliação do Potencial de Produção de Enzimas do Tipo Celulases.

A partir dos 12 isolados fúngicos obtidos, 11 deles foram submetidos ao teste de avaliação da produção de enzimas extracelulares do tipo celulases, mais especificamente as FPAses. De acordo com a tabela 2 que mostra os dados quantitativos das atividades enzimáticas expressas em FPU/g de substrato, o endofítico CA1M se destacou por apresentar uma produção de celulases superior aos demais; com uma atividade enzimática de 2,27 FPU/g de substrato pode ser considerado uma fonte promissora à produção de celulases. Nos estudos de Santos e colaboradores (2017) foram registradas atividades enzimáticas do tipo FPAses na faixa de 0,73 e 1,92 FPU/g para o isolado fúngico *Aspergillus sidowii*, bem como de 2,41 FPU/g para um isolado fúngico marinho da espécie *Mucor racemosos*. A atividade enzimática do isolado endofítico CA1M também se aproxima da produção de celulases pelo isolado *Fomitopsis* sp. RCK2010 que teve uma atividade celulolítica de 3,268 FPU/g de substrato (Lodha *et al.*, 2020). Dessa forma, os dados da literatura permitem afirmar uma produção de FPAses significativa pelo endofítico CA1M e motiva a realização de estudos que visem a otimização da produção de celulases, uma vez que as linhagens citadas acima tiveram o processo de produção de celulases otimizado, enquanto a linhagem CA1M apresentou a produção de 2,266 FPU/g de substrato ainda sem qualquer tipo de otimização.

Tabela 2 – Dados quantitativos das atividades enzimáticas em FPU/g de substrato.

Isolados endofíticos	Atividade Enzimática em FPU/g
CA1P	0,04
FB2M	0,24
CA2P	0,10
FB1V	0,20
CA1M	2,27
FB2V	0,08
F1	0,09
F2	0,12
CA3V	0,46
FB2V	0,34
FB1P	0,39

Fontes: Autor, 2022.

As demais linhagens descritas na Tabela 2 também apresentaram atividade FPase, evidenciando que fungos endofíticos filamentosos podem apresentar a capacidade de utilizar celulose como fonte de carbono. Além disso, as linhagens CA3V, FB2V e FB1P também apresentaram atividades comparáveis a outras linhagens descritas na literatura, como foi o caso da linhagem *Myceliophthora* sp., que apresentou 0,74 FPU/g de substrato mesmo após a otimização das condições de cultivo (BADHAN *et al.*, 2006). Desta forma, pode-se afirmar que os fungos endofíticos podem ser uma alternativa para a produção de enzimas lignocelulíticas, fazendo-se necessário o desenvolvimento de mais estudos com esta classe de microrganismos a fim de descobrir novas linhagens com elevado potencial biotecnológico.

6 CONCLUSÃO

Os estudos de prospecção de fungos endofíticos do babaçu (*A. speciosa*) levaram ao isolamento de 12 isolados fúngicos endofíticos, sendo 4 isolados a partir do epicarpo, 5 a partir do endocarpo, 1 da amêndoa e 2 a partir das folhas do babaçueiro. A partir dos isolados fúngicos obtidos, 11 foram avaliados quanto ao seu potencial biotecnológico visando a produção de enzimas extracelulares do tipo celulasas. O isolado CA1M produziu 2,27 FPU/g de substrato e pode ser considerado um endofítico promissor à produção de *FPAses*.

O conjunto de resultados obtidos, apesar de preliminares, associados ao fato de que até o momento não foram encontrados na literatura registros do perfil de fungos endofíticos associados ao babaçu, evidencia a relevância deste trabalho e motiva o desenvolvimento de estudos mais aprofundados, como a otimização da produção de celulasas a partir do isolado CA1M visando aplicação industrial.

Vale ressaltar que esses resultados integram um conjunto maior de dados associados ao projeto Avaliação do Potencial Biotecnológico de fungos associados como endofíticos do babaçu, projeto de dissertação do discente Anderson Rodrigues Silva, vinculado ao PPGQ/Unifesspa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Revista uningá review**, v.2, n.1, p.55-59, 2015.

ALVES, M. C. Fungos filamentosos utilizados para produção de ácido cítrico e degradação de matéria orgânica de água residuária do café (*coffea arabica* l.). 2019. 149 f. Tese de doutorado (obtenção do título de doutora) - **Universidade Federal de Lavras** com parceria do programa de pós-graduação em ciência de alimentos, 2019.

APARECIDA, J e MARIA, E. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, Vol. 31, n. 7, p 1807-1813, 2008.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT** NBR ISO 12836: odontologia: dispositivos para sistemas CAD/CAM para restaurações dentárias indiretas: métodos de ensaio para avaliação de exatidão. Rio de Janeiro (RJ): ABNT; 2017.

BADHAN, A. K.; CHADHA, B. S.; KAUR, J.; SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresource Technology**, Vol. 98, n.3, p 510, 2007.

Brasil. Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010. Dispõe sobre a política nacional de resíduos sólidos. **Diário Oficial da União**. 03 ago 2010;147(Seção 1):3.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes [Internet]. Brasília (DF): MAPA; 2009. [citado em 16 jul 2020]. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise_sementes.pdf

CRUZ, J.C.; FARIAS, J.P; CASTRO, A.M; E.F.C. Otimização da produção de ácido itacônico por via microbiana. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia química**, Florianópolis, Vol. 1, n.2, p 8, 2015.

CARRAZZA, L. R.; SILVA, M. L.; ÁVILA, J. C. C. Manual Tecnológico de Aproveitamento Integral do Fruto do Babaçu. Brasília-DF. **Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPAN)**. Brasil, 2012.

CORRÊA RC, RHODEN SA, MOTA TR, AZEVEDO JL, PAMPHILE JA, DE SOUZA CG, POLIZELI ML, BRACHT A, PERALTA RM. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Vol. 41, n.10, p 1467-78, 2014.

CAMPOS, J.L.A.; DA, S. T.L.L.; ALBUQUERQUE, U.P.; PERONI, N. A.; EL. K. Use, and Management of the Babassu Palm (*Attalea speciosa* Mart. Ex Spreng) in the Araripe Region (Northeastern Brazil). **Economic Botany Journal**, Vol. 69, n.3, p 240-250, 2015.

CASTELLANI, A. Viability of mold culture of fungi in destiled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene Impact Facto**, Vol. 42, n.2, p 270-276, 1993.

DESER – **Departamento de Estudos Socio-Economicos Rurais**. A Cadeia Produtiva Do Babaçu – Estudo Exploratório. Curitiba, 2007.

DEKA, D.; BHARGAVI, P.; SHARMA, A.; GOYAL, D.; JAWED, M.; GOYAL, A. Enhancement of cellulase activity from a new strain of *Bacillus subtilis* by medium optimization and analysis with various cellulosic substrates. **Enzyme research**, v. 2011, p. 1-8, 2011.

DINIZ FV.; LIMA, Y. D. M.M.; PAZ, F.S.; SILVA, A. L.D.; GOMES, L.C.; SANTOS, G.S.; CARVALHO, C.M. Atividade enzimática de fungos endofíticos de bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.) **Revista Biota Amazônia Macapá**, v. 10, n. 3, p. 7-11, Agosto. /fev. 2020.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura 2016. Rio de Janeiro: **IBGE**, 2016. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pevs/quadros/brasil/2016>. Acesso em: 07/05/2022.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. Indianápolis – SP: Sarvier, 2 edição, 839 p., 1995.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H. V.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Vol. 66, n.3, p. 506, 2002.

LODHA A.; PAWAR S.; RATHOD V. Optimised cellulase production from fungal co-culture of *Trichoderma reesei* NCIM 1186 and *Penicillium citrinum* NCIM 768 under solid state. **Journal of Environmental Chemical Engineering**. Vol. 8, n. 5, p. 103958, 2020.

LI H.; DOU M.; WANG X.; GUO N.; KOU P.; JIAO J.; FU Y. Optimization of Cellulase Production by a Novel Endophytic Fungus *Penicillium oxalicum* R4 Isolated from *Taxus cuspidata*. **Sustainability**. Vol.13, n.11, p. 6006, May; 2021.

MATTOO, AJ.; NONZOM, S. Endophytic fungi: understanding complex cross-talks. **Symbiosis**. Vol. 83, n.3, p. 273-264, Jan; 2021.

PAPADAKI E, KONTOGIANNOPOULOS N K, ASSIMOPOULOU NA, MANTZOURIDOU FT. Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using *Aspergillus niger* in an integrated citric acid-enzymes production process. **Bioresource Technology**. Vol. 309, n.123317, 2020.

PEREIRA, E. L.; OLIVEIRA, A.; F.; A. A produção de antibióticos por processos fermentativos aeróbios. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**. Vol. 14, n. 2, p. 1058-1078, ago./dez. 2016.

PINHEIRO, C. U. B.; ARAUJO, N. A.; AROUCHE, G. C. Plantas úteis do maranhão: região da baixada maranhense. **Revista Brasileira de Geografia Física**. Vol.09, n.5, p 1410-1427. 2016

RAMOS, C. L.; ALMEIDA, E. G.; PEREIRA, G. V. M.; CARDOSO, P. G.; DIAS, E. S.; SCHWAN, R. F. **Determination of dynamic characteristics of microbiota in a fermented beverage produced by brazilian**. Vol.140, n.2-3, p.225-31, 2010.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. **Química nova**, Vol. 26, n.6, p. 863-871, 2003.

RODRIGUES, B. W.; ROTH, D. A. M.; FAVARETTO, F. F.; DALMAGRO K.; PEREIRA, M. C. Produção de ácido succínico a partir da fermentação do bagaço da cana-de-açúcar. **Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria**, trabalho de conclusão de curso. p.241. 2021.

VIVA TERRA. Disponível em: <http://archive.is/cuq7a#selection-8.18-1051.27> Acesso em: 1/04/2016. Acesso em: 08/04/2020.

ZHANG, D.; LUO, Y.; CHU, S.; ZHI, Y.; WANG, B.; ZHOU, P. Enhancement of cellulase and xylanase production using ph-shift and dissolved oxygen control strategy with *Streptomyces griseorubens* JS D-1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Vol. 178,n.2, p. 338-352, 2016.

ZHENG R.; LI S.; ZHANG X.; ZHAO C. Biological Activities of Some New Secondary Metabolites Isolated from Endophytic Fungi: **A Review Study**. Vol. 22, n.2, p.959, 2021.