

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL  
UNIDADE UNIVERSITÁRIA EM PORTO ALEGRE  
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA**

**BRUNA GABRIELE LOESER**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADO FÚNGICO AMBIENTAL  
PRODUTOR DE LIPASE**

**PORTO ALEGRE**

**2022**

**BRUNA GABRIELE LOESER**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADO FÚNGICO AMBIENTAL  
PRODUTOR DE LIPASE**

Trabalho de conclusão de curso II apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia na Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Lúcia Kern

**PORTO ALEGRE**

**2022**

Catálogo de Publicação na Fonte

L826i Loeser, Bruna Gabriele.  
Identificação molecular de isolado fúngico ambiental produtor de lipase /  
Bruna Gabriele Loeser. – Porto Alegre, 2022.  
65 f.

Orientadora: Ana Lúcia Kern.

Monografia (Graduação) – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul,  
Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Unidade em Porto  
Alegre, 2022.

1. *Penicillium Steckii*. 2. Lipase. 3. Fungo filamentoso. 3. Bioprospecção.  
4. Identificação molecular. I. Kern, Ana Lúcia. II. Título.

**BRUNA GABRIELE LOESER**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADO FUNGICO AMBIENTAL  
PRODUTOR DE LIPASE**

Trabalho de conclusão de curso dois, apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia na Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Lúcia Kern

Aprovada em:     /     /

**BANCA EXAMINADORA**



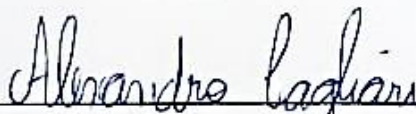
Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Lúcia Kern

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Débora Vom Endt

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS



Prof. Dr. Alexandre Cagliari

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul - UERGS

**PORTO ALEGRE**

**2022**

*Dedico este trabalho aos meus pais  
Regina e Flavio, pela companhia e fé que  
depositaram no meu potencial.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida.

A Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, pelo ensino gratuito e de qualidade, por ceder estrutura física para realização de etapas do estudo.

Ao laboratório de Interação Planta-Patógeno (LIPP) da Embrapa Uva e Vinho em Bento Gonçalves, pelo aprendizado e por ter cedido espaço para execução de etapas do estudo, em especial agradeço ao Dr. Fábio Rossi Cavalcanti, por ensinar que humildade é fundamental e uma das virtudes mais belas do ser humano.

Agradeço de forma especial a Professora Dra. Ana Lúcia Kern, por todos os ensinamentos, conselhos, discussões, por toda atenção, disponibilidade, por ser mulher maravilhosa, inspiradora, pela paciência, confiança, pelo respeito, obrigada por acreditar no meu potencial.

Aos meus pais Regina e Flavio por me ensinarem a persistir, estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis e mais bonitos de minha vida. Obrigada por todo apoio e ajuda financeira durante a vida e a graduação, pela oportunidade de estudar, por proporcionar as condições necessárias para ser possível alcançar essa conquista.

A todas as equipes onde trabalhei, em especial as pessoas com quem dividi minha vida durante os momentos no laboratório. Obrigada pela companhia Uirajá, Luisa, Carla, Jéssica, Fabiana, Larissa, Alnilan, Bruna, e todos que me ajudaram de alguma forma.

Também agradeço as novas pessoas conhecidas pós pandemia, Crystyan, Vinícius, Thais, Daniela, Eduardo, Mariana, Lorraine, obrigada por sempre me incentivarem, pela companhia de almoço, café, discussões, pela parceria na caminhada até o trem e por estarem ao meu lado na maioria dos dias que trabalhei no TCC, e todos que de alguma forma contribuíram e estavam lá para me apoiar com palavras de otimismo, ou para um simples abraço.

Agradeço a todas as pessoas (funcionários, professores, amigos, colegas e familiares) que de alguma forma contribuíram para meu crescimento pessoal durante esses longos anos de estudo e pesquisa, muito obrigado!

## RESUMO

A busca por microrganismos produtores de biomoléculas de interesse comercial tem aumentado, visto que as questões do cunho ecológico e renovável tem se intensificado. Dentro da infinidade de compostos químicos sintetizados pelos seres vivos, os biocatalizadores vem sendo alvo de inúmeras pesquisas. As enzimas têm sido aplicadas com sucesso nos mais diversos processos industriais no ramo alimentício, na produção de bebidas, queijos, no ramo da medicina em diagnósticos, medicamentos, cosméticos, na síntese orgânica, no tratamento de efluentes, no tratamento de couro, na produção de biocombustíveis. Mesmo com todas as prospecções já realizadas estima-se que menos de 1% dos microrganismos são cultiváveis em laboratório, por isso novas prospecções com o intuito de descobrir biomoléculas diferentes ou linhagens com capacidades lipolíticas são relevantes, principalmente em países onde muito da tecnologia é vinda de outros países, como o Brasil. Outro fator que contribui para essa prospecção é a exploração da biodiversidade nacional. Considerando o contexto acima, o presente estudo tem como objetivo identificar e fazer uma caracterização parcial molecular de linhagens de fungos produtores de lipase, isolados de diversos substratos. Uma primeira seleção foi realizada com um teste qualitativo envolvendo substrato rodamina B. Dessa triagem inicial sete isolados se destacaram. Um deles não desenvolveu esporulação em meio V8. Dessa forma a atividade lipolítica de seis isolados foi determinada através da capacidade de hidrolisar o substrato p-nitrofenilpalmitato (p-NPP). O isolado OFS 11 demonstrou a maior atividade lipolítica. Deste realizou-se à amplificação da região espaçadora transcrita interna (ITS) pelos iniciadores ITS1 (direto) e ITS4 (reverso), enviado para realização de sequenciamento em empresa terceira. Após o tratamento das sequências de nucleotídeos com o resultado proveniente do sequenciamento foram executado alinhamento via Blastn. Os resultados desses alinhamentos apontaram mais de 99% de homologia com fungos do gênero *Penicillium*. Porém a identificação a nível de espécie ainda apresentou imprecisões mais precisamente entre *Penicillium steckii* e *citrinum*. Deste modo ainda são necessários ensaios envolvendo outras regiões conservadas como a  $\beta$ -tubulina, Calmodulina e EF1 alpha. A partir dos resultados obtidos frente a atividade lipolítica outra linha de pesquisa foi desenvolvida a qual compreende a definição das condições ótimas de cultivo objetivando a caracterização da enzima produzida.

**Palavras-chave:** *Penicillium steckii*. Lipase. Fungo filamentosos. Bioprospecção. Identificação molecular.

## ABSTRACT

The search for microorganisms that produce biomolecules of commercial interest has increased, as the issues of an ecological and renewable nature have intensified. Within the myriad of chemical compounds synthesized by living beings, biocatalysts have been the subject of research. Enzymes have been successfully applied in the most diverse industrial processes in the food industry, in the production of beverages, cheeses, in the field of medicine in diagnostics, medicines, cosmetics, in organic synthesis, in wastewater treatment, in leather treatment, in production of biofuels. Even with all the surveys already carried out, it is known that less than 1% of the microorganisms are cultivable in the laboratory, so new surveys with the aim of discovering different biomolecules or strains with lipolytic resources are relevant, especially in countries where much of the technology comes from other countries, such as Brazil. Another factor that contributes to this prospecting is the exploration of national biodiversity. Prior to the above context, this study aims to identify and make a partial molecular characterization of lipase-producing fungal strains, requesting from various substrates. A first selection was performed with a qualitative test involving rhodamine B substrate. From this initial screening, seven stood out. One of them undeveloped sporulation in V8 medium. Thus, the lipolytic activity of six obtained provided through the ability to hydrolyze the substrate p-nitrophenyl palmitate (p-NPP). The OFS 11 isolate showed greater lipolytic activity. From this, the amplification of the internal transcribed spacer region (ITS) was carried out by the primers ITS1 (forward) and ITS4 (reverse), sent for sequencing in a third-party company. After treating the nucleotide sequences with the result from the sequencing, alignment was performed via Blastn. The results of these alignments showed more than 99% homology with fungi of the genus *Penicillium*. However, the identification at the species levels still showed inaccuracies more precisely between *Penicillium steckii* and *citrinum*. Thus, trials involving other conserved regions such as  $\beta$ -tubulin, Calmodulin and EF1 alpha are still needed. Based on the results obtained from the lipolytic activity, another line of research was developed, which includes the definition of optimal cultivation conditions, aiming at the characterization of the enzyme produced.

**Keywords:** *Penicillium steckii*. Lipase. Filamentous fungi. Bioprospecting. Molecular identification.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Hidrólise de triacilgliceróis.....	16
Figura 2 – Quadrículos para contagem de esporos.....	23
Figura 3 – Substrato sintético p-NPP e seus produtos após hidrólise enzimática...	26
Figura 4 – Teste Rodamina B isolados positivos .....	35
Figura 5 – <i>Rhizopus sp.</i> controles positivos.....	36
Figura 6 – Recuperação do OFS11 do estoque antigo.....	39
Figura 7 – Resultado da lâmina de microcultivo.....	40
Figura 8 – Morfologia – Padrões de ramificações de conidióforo observados e <i>Penicillium</i> .....	41
Figura 9 – Estrutura 3D Lipase de <i>Penicillium expansum</i> .....	41
Figura 10 – Extração de DNA OFS 11.....	42
Figura 11 – Amplificação da região ITS Mix 1 com programa 1.....	43
Figura 12 – Amplificação da região ITS Mix 2 com programa 2.....	44
Figura 13 – Gel de agarose com os produtos de amplificação com os primers novos.....	45
Figura A.1 – AMOSTRA 2ITS1_F10.....	56
Figura A.1.1 – AMOSTRA 2ITS1_F10 continuação.....	57
Figura A.2 – AMOSTRA 2ITS4_G10.....	58
Figura A.2.1 – AMOSTRA 2ITS4_G10 Continuação.....	59
Figura A.3 – AMOSTRA Mix 2 e programa 2.....	60
Figura A.3.1 – AMOSTRA Mix 2 e programa 2 continuações.....	61
Figura C.1 – 2ITS1_F10.....	63
Figura C.2 – 2ITS4_G10.....	63
Figura C.3 – Mix 2 e programa 2.....	63
Figura D.1 – 2ITS1_F10.....	64
Figura D.2 – 2ITS4_G10.....	64
Figura D.3 – Mix 2 e programa 2.....	64

**LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 1 – Atividade Lipolítica de cada Isolado Fúngico .....	37
Gráfico 2 – Atividade lipolítica do isolado OFS 11.....	38
Gráfico A.1 – Curva padrão de p-NP n°1 pH 8.....	55
Gráfico A.2 – Curva padrão de p-NP n°2 pH 8.....	55

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 –	Microrganismos estudados.....	22
Tabela 2 –	Diluição p-NP.....	27
Tabela 3 –	Soluções necessárias nas etapas de extração de DNA.....	30
Tabela 4 –	Primers utilizados na PCR.....	30
Tabela 5 –	Mix 1 e Mix 2. ....	31
Tabela 6 –	Programas utilizados.....	32
Tabela 7 –	Soluções tampões e condições de eletroforese.....	33
Tabela 8 –	Identificação molecular.....	46

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.2 OBJETIVOS .....	16
1.2.1 Objetivo Geral .....	16
1.2.2 Objetivos Específicos.....	16
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>17</b>
2.1 ENZIMA LIPASE FÚNGICA.....	17
2.2 BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS.....	18
2.3 APLICAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE LIPASE FÚNGICA .....	19
2.4 TESTES PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA .....	20
2.5 IDENTIFICAÇÕES MOLECULARES DE MICRORGANISMOS .....	21
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>24</b>
3.1 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS .....	24
3.1.1 Obtenção e manutenção de fungos filamentosos .....	24
3.1.2 Obtenção e quantificação de suspensão de esporos fúngicos.....	25
3.1.3 Microcultivo .....	26
3.2 MÉTODOS BIOQUÍMICOS DE DETECÇÃO DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA .....	27
3.2.1 Teste Rodamina B aplicação qualitativa .....	27
3.2.2 Teste com substrato sintético análise quantitativa .....	27
3.2.2.1 Preparo das soluções 1 e 2.....	28
3.2.2.2 Curva padrão de p-NP .....	28
3.2.2.3 Determinação da atividade lipolítica.....	30
3.3 MÉTODOS MOLECULARES:IDENTIFICAÇÃO ESPECÍFICA DE FUNGOS LIPOLÍTICOS .....	31
3.3.1 Extração de DNA total da biomassa micelial.....	31
3.3.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	32
3.3.3 Técnicas eletroforéticas.....	34
3.3.4 Revelação do Gel de Agarose.....	35
3.3.5 Técnicas de Purificação dos produtos de PCR .....	35
3.3.6 Quantificação do fragmento amplificado via Nanodrop. ....	36
3.3.7 Sequenciamento Sanger .....	36
3.3.8 BlastN.....	36
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>

4.1 TESTES DE DETECÇÃO DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA E SUA QUANTIFICAÇÃO.....	37
4.2 MICROCULTIVO E CARACTERÍSTICAS DO ISOLADO PROMISSOR.....	41
4.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	44
<b>4.3.1 Extração de DNA total da biomassa micelial.....</b>	<b>44</b>
<b>4.3.2 Amplificação da região ITS 1 e 4 .....</b>	<b>45</b>
<b>4.3.3 Amplificação de outras regiões de interesse.....</b>	<b>47</b>
<b>4.3.4 Resultados dos sequenciamentos e Alinhamentos. ....</b>	<b>49</b>
<b>5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>51</b>
<b>APÊNDICE A - Curvas padrão de p-NP .....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXO A – Eletroferogramas.....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXO B – Sequencias depuradas. ....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO C – Alinhamentos de sequências no BLASTn .....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXO D – Alinhamentos de sequências no MycoCosm .....</b>	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Estamos rodeados de microrganismos e eles fazem parte da maior parcela da biodiversidade dos organismos vivos do mundo. Deste modo, tanto a prospecção quanto a preservação da diversidade microbiana são essenciais para a manutenção dos ecossistemas. Adicionalmente, são fundamentais os estudos que elucidem os mecanismos de reações químicas catalisadas por esses microrganismos, suas vias metabólicas, bem como sua capacidade de fornecer biomoléculas de interesse comercial e industrial (OVERMANN, 2015; DE VERO *et al.*, 2019).

As biomoléculas possuem papel fundamental nos processos em que estão envolvidas porque fazem parte da maquinaria básica e necessária para existência de vida. Suas aplicações e os processos de beneficiamento intrínsecos onde são aplicadas vêm sendo desenvolvidos e aprimorados pelo ser humano no decorrer de nossa existência, objetivando proporcionar uma qualidade de vida melhor à população (CREMONESI, 2020).

Dentre a gama existente de biomoléculas microbianas temos como exemplo, carboidratos, aminoácidos, fosfolipídios, lipídeos, ácidos orgânicos, vitaminas, corantes naturais, aromas, antibióticos, biosurfactantes, biopolímeros alimentícios, proteínas. Esta última classe citada engloba as enzimas, que atuam como catalisadores de reações químicas e podem se destacar economicamente, pelos benefícios inerentes de suas aplicações industriais. As enzimas podem participar de reações brandas, gerando menor toxicidade aos efluentes produzidos, possuem seletividade, estabilidade, especificidade aos substratos, atendem as questões favoráveis ao meio ambiente e são biodegradáveis. Portanto, devido às qualidades essenciais que apresentam, as enzimas fomentam o interesse comercial amplo (MOLINA *et al.*, 2020; CASAS-GODOY *et al.*, 2018).

Segundo a Business Communication Company Research (2021) o mercado global de enzimas terá uma taxa composta de crescimento anual de 6,3% de 2021 a 2026, atingindo o valor de US \$ 8,7 bilhões. Estimativas mais otimistas preveem o valor de US \$ 10,5 bilhões para o mercado de enzimas de origem microbiana até 2024 (PAPADAKI, 2020).

No Brasil a aplicação de misturas de enzimas vem se mostrando promissora na indústria agroenergética, principalmente na busca por novas soluções para produção de etanol a partir de bagaço de cana (SANTANA, 2021).

Mais especificamente as enzimas lipases compõem 8% do mercado de enzimas, tendo o terceiro maior valor de mercado devido a sua alta demanda industrial, ficando atrás somente de carboidrases e proteases (ARBIGE, 2019; RIGO, 2021).

As enzimas podem ser prospectadas de diversos tipos de seres vivos, podendo eles serem procarióticos, eucarióticos incluindo plantas e animais superiores. Entretanto a prospecção possui êxito quando realizada na busca de seres microscópicos, devido às vantagens que eles possuem ao serem cultivados em escala laboratorial e industrial. Os benefícios se destacam também em relação aos custos de manutenção e na possibilidade da utilização de resíduos agroindustriais e industriais como fonte de carbono para crescimento dos mesmos. Por apresentarem ciclo de vida curto, ou seja, necessitam pouco espaço e pouco tempo para crescimento, para obtenção de biomoléculas de interesse (ZIMMER *et al.*, 2009; RAVEENDRAN *et al.*, 2018).

Quase metade das enzimas utilizadas comercialmente como proteases, amilases, celulases e lipases são de origem fúngica. Dentro da gama existente de fungos com interesse comercial, fungos filamentosos vêm se destacando pela capacidade de sintetizar e excretar enzimas capazes de biodegradar os mais diversos substratos (ALVES, 2020).

O curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia habilita profissionais com visão multidisciplinar e capaz de prospectar novas biomoléculas. Assim como planejar sua produção em escala laboratorial, gerir e definir todas as etapas de purificação e controle. Também pode atuar no melhoramento de processos já existentes ou criação de novos bioprocessos (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2021).

Todavia como prospectar biomoléculas? Como encontrar aquelas que temos interesse? Existem diversos caminhos para se prospectar biomoléculas de interesse e os estudos científicos com microrganismos possuem grande valor devido à sua reprodutibilidade em laboratório.

Dessa forma podem ser escolhidas metodologias modernas que englobam as chamadas “ômicas” como metagenômica, transcritômica, proteômica e metabolômica as quais possuem destaque na atualidade pois sabe-se que menos de 1% dos microrganismos pode ser cultivado em condições laboratoriais (MUGGIA *et al.*, 2020; ANDRIO; DEMAIN, 2014).

Em contrapartida, também existem técnicas clássicas de isolamento microbiano que podem consistir na aplicação de substratos sintéticos de forma quantitativa e qualitativa. As triagens iniciais visam diminuir a quantidade de isolados para manipulação nas etapas seguintes do estudo, são menos custosas se comparadas as técnicas quantitativas (REINEHR *et al.*, 2015).

O presente trabalho se enquadra dentro do contexto de técnicas clássicas. Porque busca aplicar nos isolados fúngicos ambientais disponibilizados, técnicas conhecidas com substratos sintéticos específicos para detecção de atividade lipolítica. Uma vez selecionado o isolado fúngico ambiental com maior capacidade catalítica seguem as aplicações de técnicas moleculares que objetivam a identificação molecular a nível de gênero e espécie.



## 1.2 OBJETIVOS

Englobam etapas fundamentais da pesquisa realizada e são elucidados em objetivo geral e subdividido em objetivos específicos.

### 1.2.1 Objetivo Geral

Este projeto de pesquisa tem como objetivo geral realizar a identificação molecular do isolado fúngico ambiental OFS11 por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando *primers* de regiões conservadas dentre os eucariotos.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar a atividade lipolítica dos isolados fúngicos ambientais;
- b) Amplificar por meio da reação de PCR a região do espaçador interno transcrito (ITS) do isolado OFS11;
- c) Amplificar por meio da reação de PCR a região da beta tubulina (bt2) do isolado OFS11;
- d) Amplificar por meio da reação de PCR a região da calmodulina (CDM e CF) do isolado OFS11;
- e) Amplificar por meio da reação de PCR a região do Fator de alongamento (EF1) do isolado OFS11;

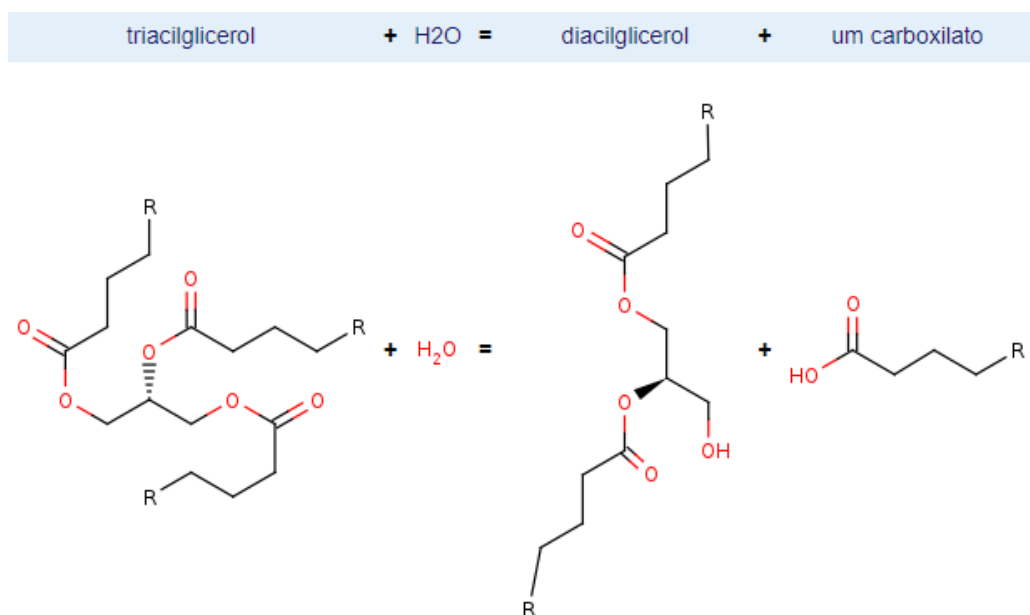
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

Neste capítulo será abordada a base teórica pesquisada para o desenvolvimento do presente trabalho.

### 2.1 ENZIMA LIPASE FÚNGICA

As enzimas lipases são classificadas segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology - IUBMB*), os quais se baseiam na reação que as enzimas catalisam e suas peculiaridades definem as subclasses e assim por diante. Dentre a gama enorme existente de enzimas (liases, ligases, oxiredutases, transferases, isomerasas, translocases e hidrolases) existem as denominadas lipases verdadeiras que são classificadas como hidrolases por serem conhecidas mundialmente por quebrarem gordura, ou seja, catalisam quebra de ligações covalentes (de substratos orgânicos. ex. ácido graxo) utilizando a água como nucleófilo. Segundo essa definição, recebem a designação de EC 3.1.1.3 pois reduzem os triacilgliceróis de cadeia longa em diacilgliceróis, e posteriormente em monoacilgliceróis e ácidos graxos livres (LOTTI; ALBERGHINA, 2007; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012; CASAS-GODOY *et al.*, 2018; CAVALCANTE *et al.*, 2020; PACHECO; MENDES, 2021; LUZ *et al.*, 2021).

Figura 1 – Hidrólise de triacilgliceróis.



Fonte: BRENDA, (a) 2021

Na figura 1 pode-se visualizar a representação de quebra da ligação covalente C-O da ligação de éster da molécula de triacilglicerol tendo no meio reacional a molécula de água como nucleófilo e a enzima lipase atuando como catalizadora desta reação, gerando como produtos monoacilglicerol ou diacilglicerol e ácidos graxos livres.

Essas enzimas podem atuar na superfície das micelas de gordura em meio aquoso pois, como substâncias anfipáticas, são solúveis em água. A sua estrutura física apresenta mecanismo de ativação interfacial definido, o qual possui conformação de tampa para regular a parte do sítio ativo. Logo quando em contato com a interface água óleo acontece uma interação, propiciando a abertura do orifício onde ocorre a hidrólise (LOTTI; ALBERGHINA, 2007; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012; CASAS-GODOY *et al.*, 2018; CAVALCANTE *et al.*, 2020; PACHECO; MENDES, 2021; LUZ *et al.*, 2021).

## 2.2 BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS

Como encontrar e de qual forma realizar essa prospecção? Atualmente, há uma disponibilidade grande de abordagens metodológicas sofisticadas com alto valor tecnológico agregado. Porém, o custo para adquirir os equipamentos torna essa forma de prospecção desvantajosa para certos pesquisadores, tornando as técnicas clássicas de isolamento mais difundidas pelo fácil acesso em relação aos custos dos reagentes e manutenção dos equipamentos (LÓPEZ-LÓPEZ; CERDÁN; SISO, 2014; FRANCO-DUARTE *et al.*, 2019).

Os locais mais diversos são possíveis de bioprospecções, tudo depende do que se almeja, como por exemplo o isolamento de microrganismos pode ser feito de folhas de decomposição em ambiente aquático (MENDES *et al.*, 2019), em lugares inóspitos como a prospecção de fungos marinhos na Antártica (VARRELA *et al.*, 2021).

Para a escolha de onde e quais microrganismos se buscar pode-se levar em consideração a forma como as biomoléculas de interesse estarão disponíveis. Comparando a forma de ação natural desenvolvida em relação a degradação de substrato entre as bactérias (procarióticos) e os fungos (eucarióticos) nos deparamos com uma grande diferença. Os fungos em seu ambiente natural têm a capacidade de secretar enzimas e expressar abundantes transportadores de membrana, preferencialmente para ponta de suas hifas, os quais auxiliam na decomposição dos substratos que os rodeiam para que dessa forma sejam mais fáceis de serem assimiladas e absorvidos. Essas características são uma consequência direta de seu estilo de vida ancestral em forma de pilhagem de organismos o que favoreceu o desenvolvimento nato para obtenção de nutrientes, o que os distingue como um dos eucariotos

mais bem sucedidos da terra. Já as bactérias possuem um sistema mais simples e diferenciado para obtenção de alimento. Também podem secretar, porém, não da mesma forma e quantidade que os fungos. Portanto, as enzimas provenientes de fungos filamentosos, por serem extracelulares, possuem uma menor quantidade de etapas de purificação e beneficiamento finais, o que as tornam mais rentáveis economicamente entre as fontes de prospecção de biomoléculas catalizadoras (MUGGIA *et al.*, 2020; MIGUEL; ORTIZ; GABALDON, 2019, LüBECK; LüBECK, 2020).

### 2.3 APLICAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE LIPASE FÚNGICA

A indústria tem interesse nas propriedades físico-químicas que os biocatalisadores podem oferecer, na utilização de forma combinada ou individual. Essas qualidades estão diretamente ligadas a atividade que cada biocatalisador oferece em relação a seu funcionamento em altas temperaturas e sua termoestabilidade, ou em baixas temperaturas, a atividade em pH alcalino, sua estabilidade na presença de solventes orgânicos, a tolerância na presença de sais, a seletividade (quimioenantiosseletividade e regioenantiosseletividade), a atividade na presença de detergentes e inibidores (LÓPEZ-LÓPEZ; CERDÁN; SISO, 2014).

Os gêneros de fungos filamentosos produtores de lipase que se destacam industrialmente são os *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Mucor sp.*, *Geotrichum sp.*, *Ashbya sp.*, *Beauveria sp.*, *Humicola sp.*, *Rhizomucor sp.*, *Fusarium sp.*, *Acremonium sp.*, *Alternaria sp.*, *Eurotrium sp.*, e *Ophiotoma sp.*.

A aplicação das lipases provenientes dos gêneros citados atende as necessidades que o ramo alimentício, farmacêutico, de biocombustíveis, indústria de couro exige (SALIS; MONDUZZI; SOLINAS, 2007; VARGAS *et al.*, 2018; CHANDRA *et al.*, 2020).

Na indústria alimentícia as lipases de fungos filamentosos podem ser aplicadas na produção de queijos, fermentação de chás, manteigas. (CHANDRA *et al.*, 2020). A busca pela produção de compostos que acarretam sabor, gosto e odor, ou seja, propiciam a melhora das propriedades organolépticas dos alimentos e consequentemente a aceitabilidade desses ao consumidor final são um dos principais alvos de suas aplicações (VERMA *et al.*, 2021).

Divakar e Manohar (2007) em seus estudos apresentaram um levantamento de várias pesquisas relacionadas a fungos produtores de aromas, entre eles os de banana (*Aspergillus niger*, *Rhizomucor miehei*), frutados diversos (*Rhizomucor miehei*) fragrâncias de mel (*Rhizomucor miehei*), lavanda (*Rhizomucor miehei*), bergamota (*Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum*, *Pencillium cyclopium*), além de surfactantes produzidos por

lipases microbianas, via reação de esterificação, desde os anos 90 até o início dos anos 2000. Esses aromas podem ser utilizados tanto nas indústrias alimentícias quanto nas farmacêuticas (CHANDRA *et al.*, 2020).

Nas últimas décadas, o interesse por compostos que conferem sabor e características específicas de origem microbianas tem crescido por fornecer aditivos naturais aos alimentos, além dos benefícios intrínsecos que propiciam. Conseqüentemente, estudos aprofundados das rotas metabólicas desses compostos se intensificaram, e uma delas é a via lipídica, onde a aplicação de microrganismos específicos são empregados para produção de inúmeros compostos aromáticos classificados como lactonas, ésteres de carboxilato, álcoois, cetona, aldeídos e pirazinas (VERMA *et al.*, 2021).

Na produção de biodiesel, as lipases fúngicas têm se mostrado catalisadores adequados, pois podem transesterificar tipos diferentes de óleos e ácidos graxos, consumir menos energia, oferecer mais segurança, permitir maior facilidade na recuperação de subprodutos, como por exemplo o glicerol. Conseqüentemente, tornam os processos mais amigáveis (VARGAS *et al.*, 2018).

Cavalcante *et al.* (2020) apresentam em seus estudos bibliográficos a relação da matéria prima utilizada nas diversas gerações de produção de biodiesel catalisado por lipases. Pode-se verificar que dentre os respectivos percentuais produtivos, aqueles em destaque estão ligados a lipases provenientes de fungos filamentosos como *Rhizopus oryzae*, *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizomucor miehei*.

A aplicação de lipases provenientes de *Rhizopus nodosus*, por exemplo, geram um acabamento melhor nos couros derivados de ovinos. Esse benefício está ligado diretamente ao desengorduramento eficiente que esta enzima causa (SOUZA, 2015; KHAMBHATY, 2020).

#### 2.4 TESTES PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA

A determinação da atividade enzimática se baseia na quantificação dos ácidos graxos que são liberados via hidrólise (MESSIAS *et al.*, 2011).

Os testes para seleção e determinação da atividade lipolítica de microrganismos podem ser realizados com meio de cultivos específicos, substratos sintéticos, por titulação, cromatografia gasosa, entre outros como microscopia eletrônica por detecção *in situ*, ensaios radioativos e métodos imunológicos (GEOFFRY; ACHUR, 2018; ARAUJO *et al.*, 2021; ZHENG *et al.*, 2014; MESSIAS *et al.*, 2011). Dos ensaios que estão disponíveis, os mais

utilizados são os colorimétricos e o titulométrico (MESSIAS *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2017).

Os testes colorimétricos que utilizam substratos sintéticos, usam ésteres de ácidos graxos de p-nitrofenila. Podendo ser eles acetato (C2), butirato (C4), caproato (C8), caprato (C10), laurato (C12), miristato (C14), palmitato (C16) e esterato (C18). Quando hidrolisados estes substratos geram dois produtos: o ácido graxo de cadeia específica e o p-nitrofenil (p-NP), o qual é um composto cromóforo que pode ser detectado em comprimento de onda de 410 nm, devido à sua coloração característica (BUSSAMARA *et al.*, 2010; MESSIAS *et al.*, 2011). Nos trabalhos realizados por Souza *et al.* (2014) e Silva *et al.* (2017) ambos utilizam o método colorimétrico com substrato sintético para determinação da atividade lipolítica dos fungos *Aspergillus japonicus* e *Penicillium roqueforti*.

## 2.5 IDENTIFICAÇÕES MOLECULARES DE MICRORGANISMOS

Principalmente para a área de microbiologia aplicada, a identificação e caracterização de microrganismos é fundamental, pois cada ser possui composição única, e essa “impressão digital” está dentro das células, mais especificamente, disponível no material genético, o DNA.

Os genes estão localizados em loci cromossômicos onde é possível encontrar diversidade genética pela composição de diferentes alelos, e por ser um alvo de regulação metabólica (expressão gênica) de mecanismos gerais de variabilidade (ex. crossing over) (GHERBAWY *et al.*, 2010; ALBERTS *et al.*, 2006).

Devido à descoberta de Kary Mullis frente a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) no ano de 1983, houve uma transformação completa na área da biologia molecular e diversos protocolos de amplificação de segmentos de DNA foram rapidamente otimizados e automatizados. Dessa forma, nesse período emergiram ferramentas moleculares e bancos de dados de sequências que com o passar dos anos, contribuíram significativamente para expandir o poder da microbiologia e aumentar o número de espécies microbianas conhecidas. (COX *et al.*, 2012; FRANCO-DUARTE *et al.*, 2019).

Contudo, as formas de classificações e identificações realizadas antes do advento da biologia molecular se baseavam apenas nas características fenotípicas, estruturas morfológicas e fisiológicas dos microrganismos de interesse. Dessa forma aplicava-se ensaios bioquímicos, técnicas de microcultivo juntamente com análises de microscopia para definição

da taxonomia dos isolados (ALEXOPOULOS; MIMS, 1979; LACAZ *et al.*, 1998; LEITE, 2010).

As técnicas de biologia molecular de certa forma são aplicadas estrategicamente para reduzir o tempo de identificação microbiana, se comparadas as técnicas clássicas, pois a identificação se dá de forma mais assertiva a nível de espécie, além da crescente busca de microrganismos com potencial produtivo de molécula alvo tem recebido destaque (FRANCO-DUARTE *et al.*, 2019).

Nas análises que envolvem PCR são utilizados pares de oligonucleotídeos, chamados de iniciadores sintéticos ou *primers*, que amplificam região específica conservada (COX *et al.*, 2012).

Entre as regiões fortemente conservadas do DNA existem partes que participam ativamente do controle da expressão gênica, contudo são transcritas e não traduzidas, e nessas sequencias que podem ser buscadas as variabilidades que caracterizam espécie dentro dos gêneros (WHITE *et al.*, 1990).

Uma das regiões que comumente se busca amplificar na identificação molecular de fungos são as compreendidas por íntrons e éxons entre as porções que codificam as subunidades do ribossomo, chamada de região espaçadora transcrita interna (ITS1 e ITS4). Para que a identificação seja confirmada, além das triplicatas de cada região, é adequado a amplificação de outras regiões como por exemplo a aquela que expressa proteínas que compõem microtúbulos do citoesqueleto das células, cuja função é proporcionar estrutura rígida, chamada de beta tubulina (Bt2a e Bt2b). Além dessas outras regiões também vem sendo amplificadas como o fator de alongamento (EF1-728F e EF1-1567R) que codifica uma proteína envolvida na ligação de RNA transportador em um sítio ribossomal durante o processo de tradução. A calmodulina (CF1 e CF4, CMD5 e CMD6) uma proteína em forma de altere que quando ligada em  $Ca^{2+}$  muda de conformação e se torna capaz de enrolar-se uma ampla gama de proteínas alvo, tornando-as incapazes de exercer suas funções (WHITE *et al.*, 1990; GLASS; DONALSON, 1995; CARBONE; KOHN, 1999; REHNER; BUCKLEY, 2005; HONG; GO, 2005; SAMSON *et al.*, 2014; ALBERTS, B. *et al.*, 2006).

Uma vez amplificados esses fragmentos, eles são destinados ao sequenciamento. Uma vez obtida o produto do sequenciamento pode ser depurado em programas específicos para análise do eletroferograma e definição da sequência de nucleotídeos. Em banco de dados como Genbank no NCBI (*National Center for Bioecnology Information*) é possível realizar a identificação do microrganismo pelo alinhamento de todas as sequencias existentes no banco

de dados mundial com a sequência de DNA de interesse, a partir do Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*) de nucleotídeos (PINHO; MACHADO, 2016).



### 3 METODOLOGIA

Nesta seção serão apresentados os ensaios executados, assim como os reagentes e equipamentos que cada técnica demanda.

Para uma melhor compreensão, a metodologia será apresentada em três partes, métodos microbiológicos, as metodologias aplicadas na determinação do isolado fúngico com maior potencial lipolítico e as etapas utilizadas para a sua identificação molecular.

#### 3.1 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

Métodos microbiológicos utilizados durante o estudo são apresentados nesse item, e abordam as técnicas de manutenção dos isolados fúngicos, a obtenção da suspensão de esporos assim como a técnica de microcultivo.

##### 3.1.1 Obtenção e manutenção de fungos filamentosos

Foram utilizados fungos provenientes do banco de microrganismos da linha de pesquisa “Prospecção de micro-organismos de interesse biotecnológico”. A nomenclatura apresentada na Tabela 1, foi definida conforme o local em que cada isolado foi coletado. Portanto, CCX significa coleta de compostagem, OFF óleo de fritura do fundo do recipiente, OFS óleo de fritura da superfície do recipiente e CTS conserva de tomate seco. Os microrganismos usados para realização do presente trabalho seguem listados abaixo na tabela com suas respectivas identificações.

Tabela 1 – Microrganismos estudados

CC2-19	OFF 6	OFS 4	OFS 9	OFS 12
OFF 2	OFS 1	OFS 6	OFS 10	OFS 14
OFF 3	OFS 3	OFS 7	OFS 11	CTS 1

Fonte: Autores (2021)

Os fungos foram repicados em meio de cultivo batata dextrose ágar (200 g/L infusão de batatas, 20 g/L dextrose, 15 g/L ágar), sob temperatura de 28°C durante 48h. Os estoques foram feitos em um tubo de ensaio com meio BDA inclinado e incubado por 48h a 28°C, mantidos a 4°C e renovados a cada 6 meses.

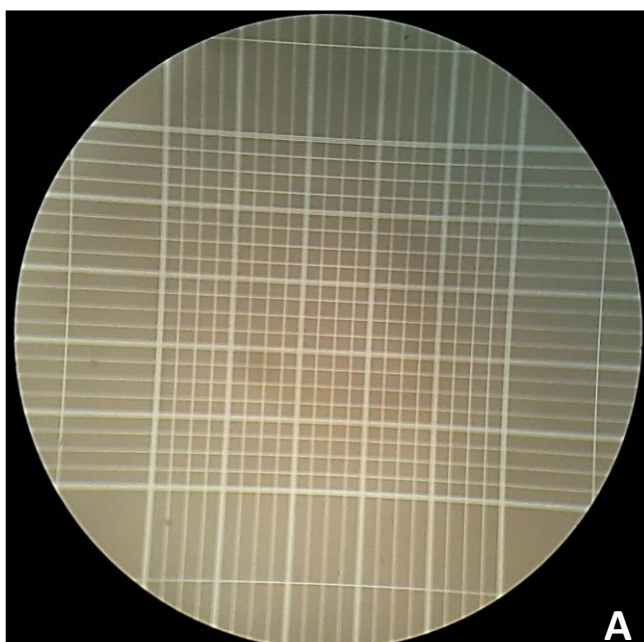
### 3.1.2 Obtenção e quantificação de suspensão de esporos fúngicos

Para a indução da esporulação dos isolados fúngicos foi realizado inóculo sobre meio V8 (20% de suco de tomate, 0,3% de  $\text{CaCO}_3$ , 1,5% de Ágar, pH 7,2) (TRIGIANO; WINDHAM; WINDHAM, 2010).

Após 48h de crescimento a 28°C, foi realizada a suspensão de esporos segundo Guedes, Ries e Rodrigues (2014, p. 46) a qual consiste na aplicação de sucessivas lavagens com alíquotas de 4 mL da solução de tween 80 (0,9%) sobre o isolado fúngico crescido em meio sobre o cultivo sólido. Após cada lavagem, com uma alça de Drigalsky friccionou-se o micélio levemente, com o intuito de liberar os esporos. Em seguida com pipeta, transferiu-se alíquotas para tubo centrífuga de 15 mL. Centrifugou-se em 3000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e então foram realizadas três lavagens com 10 mL de água destilada estéril. Na última alíquota que se adicionou 5mL, e armazena-se a 4°C.

A concentração dos esporos em suspensão proveniente de cada isolado fúngico foi estabelecida para determinar a quantidade necessária de inóculo em cada experimento. Esta contagem foi realizada em câmara de Neubauer, como descrito por Raimbault e Alazard (1981 apud Guedes, Ries e Rodrigues, 2014). A figura 2 apresenta os 25 quadrantes onde os esporos são distribuídos e sucessivamente contados para determinação da alíquota para realização do inóculo.

Figura 2 – Quadrículos para contagem de esporos.



1	2	3	4	5
10	9	8	7	6
11	12	13	14	15
20	19	18	17	16
21	22	23	24	25

**B**

Fonte: Autor (2021)

A determinação do número de esporos foi calculada pela equação 1 que segue abaixo.

$$N = \frac{n_e \times F_d}{n_q \times V_q} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

$F_d$ = fator de diluição;

$N$ = número de esporos por mL de suspensão (esporos/mL);

$n_e$ = número total de esporos contados;

$n_q$ = número de quadrículos;

$V_q$ = volume do quadriculo ( $4 \times 10^{-6}$  mL).

### 3.1.3 Microcultivo

Primeiramente são montados os kits para o micro cultivo da seguinte maneira: em uma placa de Petry colocar um papel filtro que cubra todo fundo, 3 palitos de dente uma lâmina de microscopia, duas lamínulas. A placa é fechada com sua outra metade, embalada, e autoclavada a 121°C, 1 atm, 15 min. Ao sair da autoclave os kits devem ser secos em estufa. Reorganizados com pinça estéril em capela de fluxo laminar. O meio de cultivo escolhido deve ser sólido e estar vertido de forma estéril em placa de Petry. Com auxílio de um tubo de ensaio estéril são cortados círculos de meio para colocar sobre a lâmina basal do kit organizado. A técnica do microcultivo objetiva a observação de estruturas fúngicas de interesse. A busca pelas visualizações de estruturas de crescimento do microrganismo de interesse pode auxiliar na identificação primária do gênero, além de poderem desvendar características específicas do isolado em questão. O inóculo pode ser realizado com alça de platina em quatro pontos do círculo de meio. E ao final a lamínula superficial é adicionada e o kit é levado até estufa com temperatura específica e incubado por tempos determinados. Após o transcorrido o período definido, a lamínula superficial é descolada de forma delicada com pinça, a fim de deixar a impressão contendo micélio proveniente do meio sólido aderida. Adicionada a outra lâmina basal limpa contendo 10 uL de corante azul-de-algodão, de forma sutil sem movimentos. Na sequência, são realizadas visualizações das estruturas obtidas no microscópio óptico (PINHO; MACHADO, 2016).

## 3.2 MÉTODOS BIOQUÍMICOS DETECÇÃO DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA

São apresentadas metodologias distintas, uma aplicada de forma qualitativa, que utilizou meio de cultivo com Rodamina-B objetivando uma seleção inicial e o segundo teste a resolução quantitativa com substrato sintético p-NPP (p-nitrofenilpalmitato).

### 3.2.1 Teste Rodamina B aplicação qualitativa

O teste da Rodamina-B foi adaptado de Kouker e Jaeger (1987) para fungos e aplicado de forma qualitativa para seleção inicial dos isolados mais promissores. O teste objetiva a seleção de microrganismos pela fluorescência emitida ao deixar as placas do cultivo já crescido sob UV em aproximadamente a 350 nm, como fonte de radiação o transluminador foi usado pois atendia a faixa exigida pelo ensaio.

O meio de cultivo é constituído de 1% de água peptonada (v/v), 0,2% de extrato de levedura (m/v), 0,05% de tween 80 (v/v), 6% de óleo de oliva(v/v), 2% de rodamina B (solução 0,001%(m/v), 2% de ágar. O seu preparo foi realizado em Erlenmeyer iniciando com a adição de água peptonada, extrato de levedura, tween 80, óleo de oliva e água, autoclavar a 121°C. Em outro recipiente foi feita a solução de rodamina-B na concentração 1mg/L. Uniu-se a proporção necessária da solução de rodamina-B filtrada apenas quando o meio basal estiver morno, porque ela é sensível em altas temperaturas e acaba degradando, ou seja, perde sua função. Misturou-se vigorosamente objetivando, uma distribuição homogênea ao verter o meio nas placas de Petry.

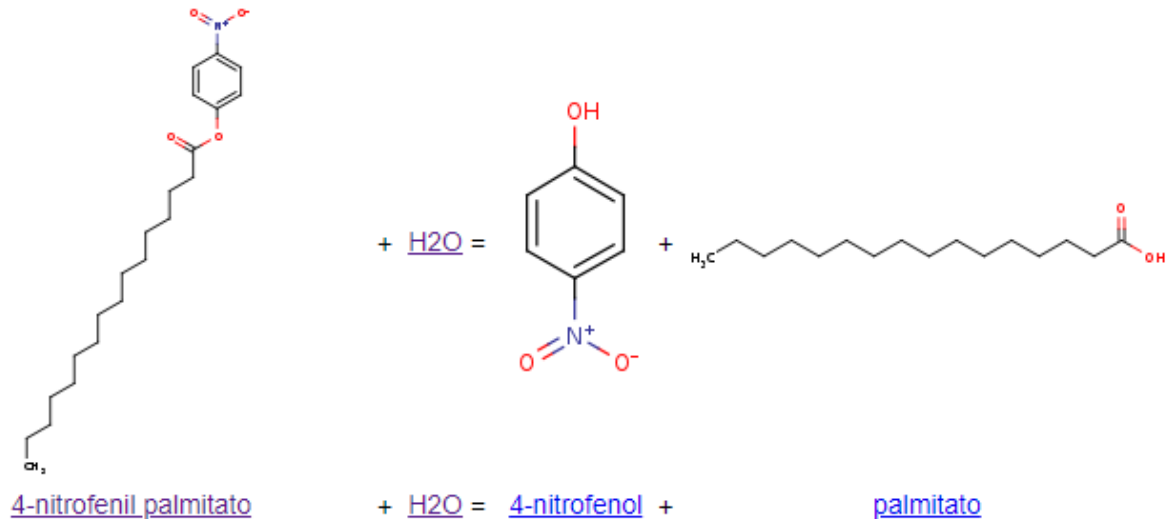
Após a gelificação do meio de cultivo nas placas, foram repicados diferentes microrganismos de interesse. Uma quantidade com alça de platina foi retirada das placas de estoque para fazer o teste. Após 168h de crescimento em meio sólido a 30°C buscou-se por halos de fluorescência alaranjada para microrganismos positivos para produção de lipase.

### 3.2.2 Teste com substrato sintético análise quantitativa

O protocolo discorrido neste item foi executado conforme aplicado nos trabalhos de Bussamara *et al.* (2010) e Semionato (2006). O substrato sintético p-NPP (p-nitrofenilpalmitato) utilizado nos ensaios foi o da marca Sigma. Quando hidrolisado pela enzima lipase dois produtos são gerados: o p-NP (p-nitrofenol) e o ácido palmítico (Figura 3). O p-NP é uma substância cromófora que pode ser detectada em espectrofotômetro UV visível

em comprimento de onda 410 nm. O objetivo deste teste é determinar quantitativamente o quanto de lipase é produzida pelos isolados.

Figura 3 - Substrato sintético p-NPP e seus produtos após hidrólise enzimática.



Fonte: BRENDA 2021(b)

### 3.2.2.1 Preparo das soluções 1 e 2

Para realização do teste com substrato sintético são necessários o preparo das soluções 1 e 2. A solução 1 é composta por 3mg/mL de p-NPP em isopropanol. Para solubilizar o p-NPP facilmente a alíquota de isopropanol deve ser pré-aquecida a 42°C. A solução se mantém estável por até 10 dias se armazenada sob refrigeração e ao abrigo da luz. A solução 2 é composta de de 4,4g de Triton X100, 1,1g de goma arábica e Tris- HCl 50Mm pH 8, nessas proporções para 1L de solução. A solução substrato é composta de uma parte da solução 1 e nove partes da solução 2 (proporção 1:9). A mistura dessas soluções deve ser feita lentamente com aquecimento em torno de 57°C, e utilizada imediatamente, pois o p-NPP degrada facilmente (SEMIONATO, 2006; BUSSAMARA *et al.*, 2010).

### 3.2.2.2 Curva padrão de p-NP

A curva padrão de p-NP tem como finalidade a padronização do ensaio pela equação da reta gerada, a qual correlaciona diferentes concentrações dessa substância com suas respectivas absorbâncias.

A partir de uma solução de p-NP à 0,1  $\mu\text{mol/mL}$  ou 100 $\mu\text{M}$  em água destilada foram realizadas diluições para aquisição de diferentes leituras em espectrofotometro UV-visível no comprimento de onda de 410 nm. O esquema dessas diluições segue listado na tabela 2.

Tabela 2 – Diluições do p-NP.

<b>Tubo de ensaio</b>	<b>Alíquota (<math>\mu\text{L}</math>) da Solução 2</b>	<b>Alíquota (<math>\mu\text{L}</math>) da solução de p-NP 100 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>Concentração final de p-NP <math>\mu\text{M}</math></b>
0	2000	0	0
1	1800	200	10
2	1600	400	20
3	1400	600	30
4	1200	800	40
5	1000	1000	50
6	800	1200	60
7	600	1400	70
8	400	1600	80
9	200	1800	90

Fonte: Autora (2021)

Com o auxílio do software excel foram plotadas as curvas com os dados obtidos em triplicata. A equação (2) descreve a relação entre a absorbância obtida versus a concentração do p-NP.

$$Y = aX \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

Y = Absorbância  $_{410\text{nm}}$ ;

a= coeficiente angular (variação da absorbância em função da concentração de p-NP);

X= Concentração do p-NP;

Também foi plotado o  $R^2$  com pelo menos cinco casa decimais, para avaliar a confiabilidade da curva produzida, ou seja, quanto mais próximo de 1, mais assertiva a curva padrão (SEMIONATO, 2006; BUSSAMARA *et al.*, 2010).

### 3.2.2.3 Determinação da atividade lipolítica

Dos isolados selecionados pela triagem inicial, foram retiradas alíquotas individuais das suas respectivas suspensões de esporos que equivalessem a  $10^6$  esporos por mL para crescimento em meio indutor (0,2% de glicose, 0,1% de fosfato de potássio dibásico, 0,5% de peptona bacteriológica, 0,01% de sulfato de magnésio e 2% de óleo de oliva), à 28°C, 48h, 120 rpm.

Após o término do crescimento, foram transferidas alíquotas de 1000  $\mu$ L de cada sobrenadante para tubos centrífugas com as respectivas identificações. Centrifugados brevemente 13000 rpm, 15 min. Transferidos 200  $\mu$ L do sobrenadante para tubos de ensaio limpos e secos. Levados a pré-aquecimento em banho-maria a 37°C durante 10 min. Em seguida foram adicionados 1800  $\mu$ L da solução substrato em cada tubo, cronometrando o tempo de entrada e o tempo de saída do banho maria. Para cada amostra foi deixado um tempo de incubação de 2 min, exceto para o Branco. As leituras de absorbância foram realizadas em cubetas de quartzo de 0,5 cm no espectrofotômetro FENTO 600 UV visível em comprimento de onda 410 nm. Para evitar contaminações, entre as leituras, foram realizadas 5 lavagens com água destilada nas cubetas. O cálculo da unidade de lipase por volume ( $U_{LV}$ ) foi aplicado conforme a equação (3).

$$U_{LV} = \frac{Y}{a} \times F \quad \text{(Equação 3)}$$

Onde:

$U_{LV}$ = Unidade de atividade de lipase por volume (U/mL);

Y= Absorbância de cada amostra a 410 nm;

F= fator de diluição (1:10);

a= coeficiente angular da curva padrão da solução 2 usada;

$T_{inc}$ = Tempo de incubação a 37°C.

O resultado foi multiplicado por 60 para expressar a unidade de lipase (U) por hora, ou seja, a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 mol de p-NPP por hora o ensaio atende a definição de unidade de atividade enzimática U, a qual é a quantidade de enzima que catalisa a conversão de um  $\mu$ mol do substrato por minuto, nas condições do ensaio (DYBKAER, 2001; COHEN *et al.*, 2007; PACHECO; MENDES, 2021).

### 3.3 MÉTODOS MOLECULARES: IDENTIFICAÇÃO ESPECÍFICA DE FUNGOS LIPOLÍTICOS

Quando se trabalha com microrganismos isolados do ambiente, devido suas características intrínsecas e ímpares esses passos acabam se tornando trabalhosos ao serem comparados àqueles desenrolados com microrganismos modelos disponíveis comercialmente.

#### 3.3.1 Extração de DNA total da biomassa micelial

A metodologia para extração de DNA de fungos filamentosos utilizada no presente trabalho teve como referência o protocolo de extração fenol-clorofórmio-álcool isoamílico descrito por Sambrook (1989). O qual consiste em oito etapas realizadas de forma sequencial, compostas pela aplicação de soluções, ação mecânica e centrípeta, buscando a ruptura eficiente da parede celular do fungo filamentosos.

Foi coletada uma alçada de isolado fúngico, crescida sob meio de cultivo sólido, inoculada em 300 mL de YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona bacteriológica, 2% de glicose), incubada por 7 dias, à temperatura média 28°C, 120 rpm. A cultura foi filtrada à vácuo, lavada três vezes com água destilada estéril. A maceração do micélio foi feita com nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino.

Em um tubo de centrifuga de 1,5 mL adiciona-se aproximadamente 100 mg do micélio macerado 200 µL de tampão de extração, uma ponta de espátula de pérolas de vidro estéreis e 200 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (Tabela 4). Manteve-se sob vortex constante durante 5 minutos. Adicionou-se a mistura obtida 200 µL de Tampão TE (Tabela 4), homogeneizar, centrifugar a 4°C, 11000 rpm durante 6 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo de centrífuga de 1,5 mL e repetiu-se as etapas anteriores sem adição das soluções tampões. O sobrenadante foi transferido à um novo tubo de centrifuga de 1,5 mL adicionado 400 µL de clorofórmio. Homogeneizou-se por inversão e centrifugou-se 11000 rpm 6 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de centrifuga de 1,5 mL adicionado 750 µL de etanol gelado para precipitação do DNA. Homogeneizou-se por inversão e centrifugou-se a 11000 rpm durante 10 minutos. Descartou-se do tubo o líquido, adicionou-se 1 mL de etanol 75%, homogeneizou-se e centrifugar 11000 rpm 3 minutos. Descartou-se o sobrenadante, e as amostras foram secas em estufa a 37°C por 12 horas, para evaporar todo etanol. Adicionou-se 50 µL de água ultrapura e permanece por mais 12 horas na estufa a 37°C. Após esse tempo as amostras foram armazenadas a -20°C.



Tabela 3 - Soluções necessárias nas etapas da extração de DNA

Fenol:clorofórmio:álcool isoamílico 100 mL	Tampão de Extração 100mL	Tampão TE 100mL
50% Fenol 50% Clorofórmio: Álcool isoamílico	2% de triton x-100 1% Dodecilsulfato de sódio (SDS) 100mM NaCl 10m/m Tris pH 8,0 1mM EDTA pH 8,0	10 mM Tris pH 8,0 1mM EDTA pH 8,0

Fonte: Adaptado SAMBROOK (1989)

### 3.3.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para execução da PCR é necessária a elaboração de uma mistura reacional (mix), o qual deve ser composto por pelo menos quatro componentes: os desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), amostra de DNA molde, enzima DNA-polimerase e um par de oligonucleotídeos iniciadores sintéticos (*primers*) (COX *et al.*, 2012).

Tabela 4 – *Primers* utilizados na PCR.

Região espaçadora	Sequência de nucleotídeos	Referências	**T <sub>m</sub> (°C)
* <sup>1,2</sup> ITS 1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	WHITE <i>et al.</i> , 1990	* <sup>1,2</sup>
* <sup>1,2</sup> ITS 4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC		* <sup>1,2</sup>
Bt2a	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC	GLASS; DONALSON, 1995	57,4
Bt2b	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC		60,8
EF1-728F	CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG	CARBONE; KOHN, 1999	51,8
EF1-1567R	ACH GTR CCR ATA CCA CCR ATC TT	REHNER; BUCKLEY, 2005	55,0
CMD5	CCG AGT ACA AGG ARG CCT TC	HONG; GO, 2005	54,9
CMD6	CCG ATR GAG GTC ATR ACG TGG		56,3
CF1	GCC GAC TCT TTG ACY GAR GAR	SAMSON <i>et al.</i> , 2014	55,3
CF4	TTT YTG CAT CAT RAG YTG GAC		49,5

\*<sup>1</sup>(GBToligos) ITS 1: 55,41°C; ITS 4: 49,73°C; \*<sup>2</sup>(Sigma) ITS 1: 68,5°C; ITS 4: 61,5°C;

\*\*T<sub>m</sub>: temperatura de melting, ou temperatura de fusão do primer (descrito pelo fabricante).

Fonte: Autora (2021)

Com a exceção dos pares de primers ITS 1\_4 sintetizados pela empresa Sigma e GBToligos, os demais foram comprados pela empresa Ludwig Biotecnologia e sintetizados pela GBToligos. Para o ensaio reacional utilizou-se dois mix distintos.

Tabela 5 – Mix 1 e Mix 2.

Componentes	MIX 1		MIX 2	
	Controle negativo	OFS11	Controle negativo	OFS11
H <sub>2</sub> O MilliQ estéril	24,5 µL	22,5 µL	µL	10,7 µL
Tampão específico da enzima	-	-	5 µL	5 µL
Tampão Booster	10 µL	10 µL	-	-
Tampão Extensa	10 µL	10 µL	-	-
dNTPs	1 µL - 10 mM	1 µL - 10 mM	4,5 µL - 1mM	4,5 µL - 1mM
Primer 1	1 µL - 20pmol	1 µL - 20pmol	1 µL - 20pmol	1 µL - 20pmol
Primer 2	1 µL - 20pmol	1 µL - 20pmol	1 µL - 20pmol	1 µL - 20pmol
MgCl <sub>2</sub>	1,5 µL – 50 mM	1,5 µL – 50 mM	1,5 µL – 25 mM	1,5 µL – 25 mM
DNA molde	-	2 µL	-	1 µL
Enzima	1 µL de Long Taq Ludwig (4U/µL)	1 µL de Long Taq Ludwig (4U/µL)	0,3µL de Taq Go (5U/µL)	0,3µL de Taq Go (5U/µL)
V <sub>final mix</sub>	50 µL	50 µL	25 µL	25 µL

Fonte: Autora (2021)

Foram realizadas reações de PCR com o Mix 1 utilizando todos os pares de primers (6 pares no total), de forma individual em tubos de microcentrífuga de 500 µL, e com o Mix 2 apenas com os pares de iniciadores sintéticos ITS1\_4 (Sigma).

Todos os programas usados nas ampliações das regiões de interesse iniciaram com um pré-aquecimento, seguidos ciclos contendo aquecimento (desnaturação), resfriamento (anelamento) e replicação (extensão), tabela 6 (COX *et al.*, 2012).

Tabela 6 – Programas utilizados.

Etapas e Equipamentos	Programa 1 utilizado no Mix 1		Programa 2 utilizado no Mix 2	
	Temperatura	*Tempo	Temperatura	*Tempo
<b>Pré aquecimento</b>	94°C	2'	95°C	5'
<b>Desnaturação</b>	94°C	30''	95°C	30''
<b>Anelamento</b>	55°C	45''	60°C	1'
<b>Extensão</b>	72°C	1'	72°C	1'
<b>Manutenção</b>	72°C	10'	72°C	10'
<b>Conservação</b>	4°C	∞	4°C	∞
<b>Termociclador</b>	Mastercycler® nexus gradient, eppendorf®		Applied Biosystems™ ProFlex™, ThermoFisher scientific®	

\*onde apresentar (') ler minutos, quando (") ler segundos, e (∞) ler tempo infinito.

Fonte: Autora (2021)

### 3.3.3 Técnicas eletroforéticas

Essa técnica pode ser utilizada para revelar se a extração de DNA foi bem-sucedida, também se o produto da PCR foi realmente amplificado. Quando as amostras inicialmente são colocadas nas canaletas em uma das extremidades do gel. Devido a carga negativa que as moléculas de DNA possuem elas migrarão em direção a extremidade que tem polo positivo e consequentemente são separadas por tamanho (COX *et al.*, 2012). O tempo das “corridas” (como são chamadas o período compreendido entre o a distância inicial e final que as amostras levam para migrar no gel de agarose), depende do tamanho do gel, da sua concentração, da procedência das amostras. Foram utilizadas preparações diferentes aos Mix elaborados. Esses dados seguem abaixo.

Tabela 7 – Soluções tampões e condições de eletroforese.

	<b>Produtos do Mix 1_ Programa 1</b>	<b>Produtos do Mix 2_ Programa 2</b>
<b>Solução Tampão</b>	**TAE 50x	*TBE
<b>Concentração do gel de agarose</b>	0,8%	1,2% e 1,5%
<b>Condições de corrida</b>	80V	120V

\* Tris-base 10,8g/L, Ácido bórico 5,5g/L, EDTA 0,5M pH8,00 – 4mL

\*\*Tris-Base 242g/L, ácido acético glacial 57,1 mL, Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O 37,2g/L (50 x) para utilização usar 1x, 20mL TAE 50x para 1L de água destilada.

Fonte: Autora (2021)

### 3.3.4 Revelação do Gel de Agarose

Após o término da migração das amostras, o gel de agarose foi cuidadosamente retirado da cuba de eletroforese, e imerso em uma solução de brometo de etídeo 0,5µg/mL por 50 minutos. As revelações foram feitas em transluminador convencional (Mix 1\_Programa 1) e em foto documentador Bio Rad® sob luz UV em 302nm (Mix 2\_Programa 2).

### 3.3.5 Técnicas de Purificação dos produtos de PCR

O objetivo dessa etapa baseia-se na inativação ou retirada dos possíveis interferentes e resquícios de reagentes das reações anteriores provenientes da PCR.

Foram utilizadas duas metodologias: Kit de purificação de PCR e o PCR Clean Up. O primeiro foi aplicado nas amostras provenientes do Mix 1 e Programa 1 e o segundo nas amostras Mix 2 programa 2.

O Kit de purificação utilizado foi da Cellco Biotec do Brasil Ltda, é disposto de 5 etapas: preparação da amostra, ativação da membrana de sílica (coluna), fixação do DNA na coluna, lavagem e eluição. O Princípio do kit é fixar apenas o DNA na membrana de sílica retirando o restante das impurezas.

Já a metodologia do PCR Clean up consiste na utilização de duas enzimas, a fosfatase alcalina (SAP) e a Exonuclease (EXO). As quais são responsáveis por degradar excesso de dNTPs e de primers. Sob refrigeração foram adicionados em tubo de centrífuga de 100 µL, 5 µL do produto da PCR, 1 µL de EXO e 1 µL de SAP. Em termociclador aplicou-se um ciclo composto por duas etapas, uma a 37°C por 15 minutos e a outra a 80°C por 15 minutos.

### 3.3.6 Quantificação do fragmento amplificado via Nanodrop.

A quantificação pelo equipamento Nanodrop™2000/2000c *Spectrophotometers* da marca Thermo Scientific é essencial para determinar a concentração e pureza dos fragmentos de DNA obtidos na PCR. O equipamento faz leitura de comprimento de onda em 260 nm, onde é a faixa de absorvância máxima de ácidos nucleicos. E apresenta os resultados em forma de duas razões a 260/280 e 260/230. Essas estão relacionando a pureza da amostra em relação a contaminantes, como por exemplo proteínas, fenol (280nm), e carboidratos, EDTA (230nm). A razão gerada entre essas absorvâncias estima o grau de pureza das amostras, para a razão 260/280 busca-se valores entre 1,8 e 2,0, já para a razão 260/230 valores entre 2,0 e 2,2 são os ideais. Além dessa relação o equipamento gera a concentração de cada amostra em ng/μL.

### 3.3.7 Sequenciamento Sanger

As amostras preparadas foram enviadas para análise externa na empresa ACTGene, onde foi realizado o sequenciamento pelo método de Sanger (1977). A empresa solicita que as amostras enviadas possuam de 30 a 60 ng de DNA molde mais 4,5 pmol de cada primer.

### 3.3.8 BlastN

Ao receber os dados provenientes do sequenciamento, os documentos foram abertos nos programas Chromas e Mega. Após ajuste da sequência, realizou-se o alinhamento das sequências obtidas com diversos outros fragmentos encontrados em banco de dados mundiais (GenBank), pelo BlastN disponível gratuitamente no NCBI ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) (PINHO; MACHADO, 2016). Também foram realizados alinhamentos em banco de dados acurados, específico de fungos, o MycoCosm (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/home>).

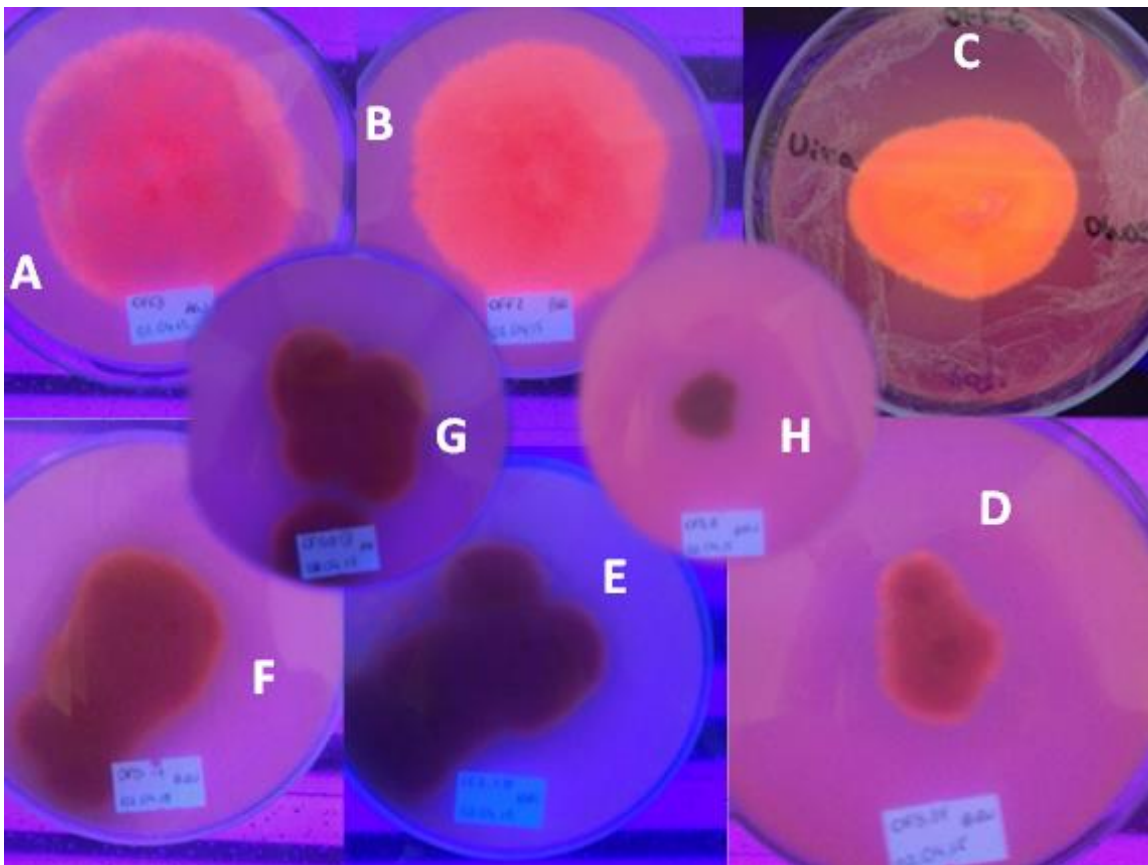
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir dos experimentos realizados, se encontram nesta seção, conforme a sequência apresentada na metodologia.

### 4.1 TESTES DE DETECÇÃO DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA E SUA QUANTIFICAÇÃO

O teste da rodamina-B foi aplicado em todos os 15 isolados fúngicos apresentados na tabela 1. Porém apenas 8 desenvolveram halos de fluorescência característica quando expostos a luz ultravioleta, figura 4.

Figura 4 - Teste da Rodamina-B isolados positivos.



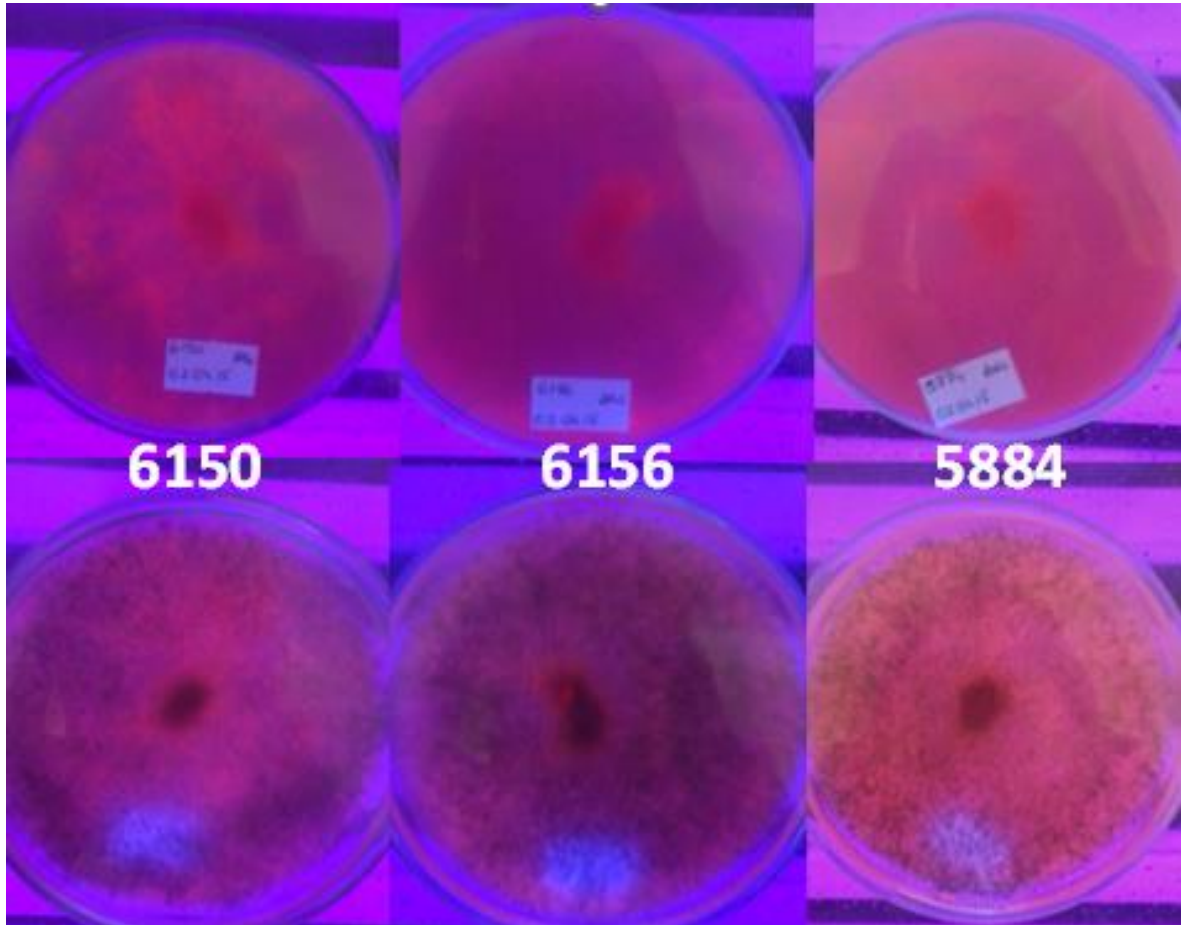
Fonte: Autora (2015)

Legenda: Letra A:OFF3, Letra B:OFF2, Letra C:OFF6, Letra D:OFS 11, Letra E: CC2 - 19, Letra F:OFS 1, Letra G:OFS 9 e Letra H: OFS 3.

Os microrganismos OFS 4, OFS 6, OFS 7, OFS 10, OFS 12, OFS 14 e CTS 1 não apresentaram fluorescência no teste rodamina- B, portanto reprovaram no teste da triagem

inicial. Já aqueles que desenvolveram halo característico foram selecionados para realização da suspensão de esporos: OFF 2, OFF 3, OFF 6, OFS 1, OFS 3, OFS 9, OFS 11 e CC2-19. Além dos isolados estudados três *Rhizopus sp.* nomeados como 5884, 6156 e 6150, foram utilizados como microrganismos controles positivos, figura 5.

Figura 5 –*Rhizopus sp.* controles positivos.



Fonte: Autora (2015)

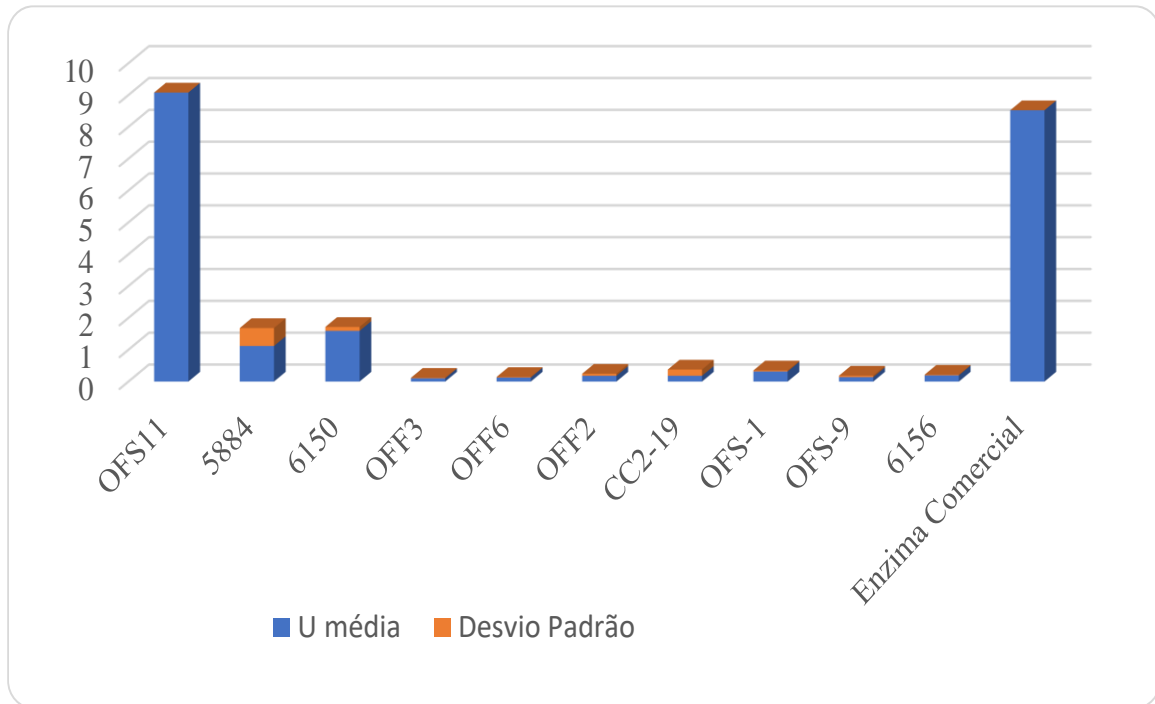
Legenda: fluorescências características dos controles positivos de *Rhizopus sp.* em teste em placas contendo meio de cultivo sólido com de Rodamina B.

A suspensão de esporos foi executada conforme descrito na seção 4,22. Sete isolados dos 8 apresentaram crescimento característico e pode-se obter os esporos, foram os seguintes: OFF 2, OFF 3, OFF 6, OFS 1, OFS 9, OFS 11, CC2-19 e os controles *Rhizopus sp.*. O isolado OFS 3 não esporulou, dessa forma não foi possível realizar a análise da atividade lipolítica quantitativa para este isolado.

As condições empregadas para o crescimento dos isolados na determinação da atividade lipolítica seguem descritas na seção 4.2.2.3 deste trabalho.

Foram testados 7 isolados, três controles positivos e enzima comercial. Os resultados obtidos em unidade de lipase por volume (U/mL) por hora que cada sobrenadante atingiu seguem no gráfico 1.

Gráfico 1- Atividade lipolítica de cada isolado Fúngico.



Fonte: Autora (2015)

Para obtenção desses resultados, cada isolado foi cultivado em Erlenmeyer e três leituras de alíquotas diferentes do mesmo cultivo foram lidas. No gráfico 1 o resultado do isolado OFS-11 apresentou maior atividade lipolítica que os demais isolados, que os controles positivos e a enzima comercial. Esse isolado chegou a produzir 8,6 U/mL em 48h de cultivo lipase por volume neste ensaio.

As curvas padrão de p-NP estão no apêndice A, ambas realizadas em pH 8. A partir delas foram adquiridos os coeficientes angulares utilizados na realização dos cálculos das atividades apresentadas em ambos os gráficos exibidos nessa seção.

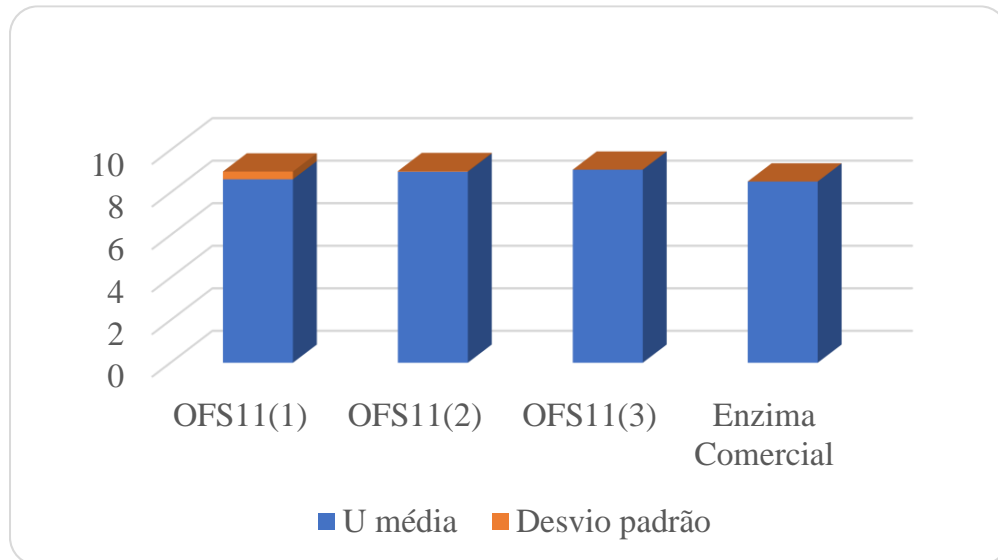
Cabe salientar que não foram realizados estudos individuais para definir a condição ideal de cada isolado frente a atividade lipolítica. Logo para esta condição e esse tipo de substrato de cadeia longa apenas um dos 7 isolados se destacou.

Portanto a fim de sancionar a produtividade do isolado com maior produção de enzima lipolítica, foram realizadas triplicatas biológicas repetindo as mesmas condições aplicadas no primeiro ensaio. Dos três cultivos iguais, porém em Erlenmeyer distintos com o mesmo



isolado, foram retiradas e analisadas três alíquotas de sobrenadante de cada frasco, totalizando nove amostras diferentes. Os resultados obtidos seguem apresentados em forma de barras no gráfico 2.

Gráfico 2 - Atividade lipolítica do isolado OFS-11



Fonte: Autora (2015)

Com a triplicata biológica foi possível confirmar o destaque da atividade do isolado OFS 11 frente a enzima comercial de (*Rhizopus oryzae* 40,8 U/mg Sigma) nestas condições. Dessa forma, este isolado foi selecionado para realização das etapas de identificação molecular.

Em trabalho realizado por Ortellado (2020), selecionou sete isolados de *Penicillium sp* dentre 20 na triagem inicial com rodamina-B. A aplicação do teste com p-NPP aos isolados de interesse foram atingidos melhores resultados nos tempos de 6 e 8 dias. A maior atividade no menor período foi obtida com o isolado LBM081 com 1224 U/mL. Contudo ao comparar o valor obtido pelo isolado OFS 11 de 8,6 U/mL para atividade lipolítica sob análise com mesmo substrato sintético verifica-se que este é menor que o apresentado nos estudos de Ortellado (2020). Essa grande diferença pode estar relacionada ao tempo de crescimento dos microrganismos consequentemente a análise de seus sobrenadantes. O presente trabalho utilizou sobrenadantes com 48h de indução, já nos experimentos de Ortellado (2020) os testes foram realizados em tempos de 144h e 192h.

Já nos estudos de investigação de produção de lipase em estado sólido utilizando *Penicillium aurantiogriseum* usando o p-NPP como substrato encontraram  $29,6 \pm 0,11$  U/mg utilizando popa de girassol como substrato alternativo (PALUZAR *et al.*, 2021).

Oliveira (2020) em seus estudos de revisão sobre lipases microbianas faz um levantamento de alguns microrganismos produtores de lipase descritos pela literatura entre os anos de 2015 e 2020, cita a produção de lipase Fúngica proveniente de *Penicillium reoqueforti* com rendimento de 186,9 U/mL sob condições de 72h, 30°C, 180 rpm, pH 7, tendo óleo de oliva como substrato em meio submerso. A determinação da produção lipolítica foi realizada por titulação com KOH (MAROTTI *et al.*, 2017).

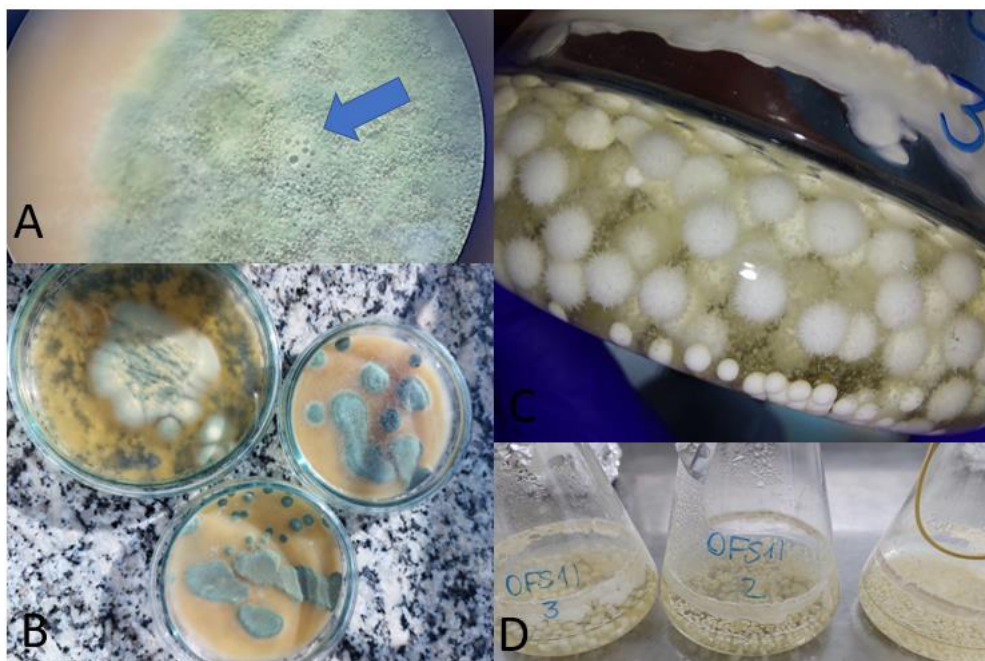
Deste modo ao comparar entre fungos do mesmo gênero o isolado OFS11 apresentou uma produção inferior. Porém entre os isolados estudados no presente estudo ele se destacou.

Cabe salientar que o óleo de oliva empregado nos testes tanto de rodamina B quanto de p-NPP servem para indução da produção de enzimas lipolíticas.

#### 4.2 MICROCULTIVO E CARACTERÍSTICAS DO ISOLADO PROMISSOR

Foi necessário todo mês de abril de 2022 para realizar a recuperação do isolado OFS 11 do estoque. Este foi obtido de um estoque feito de papelote de alumínio (Figura 6).

Figura 6 – Recuperação do OFS11 do estoque antigo.



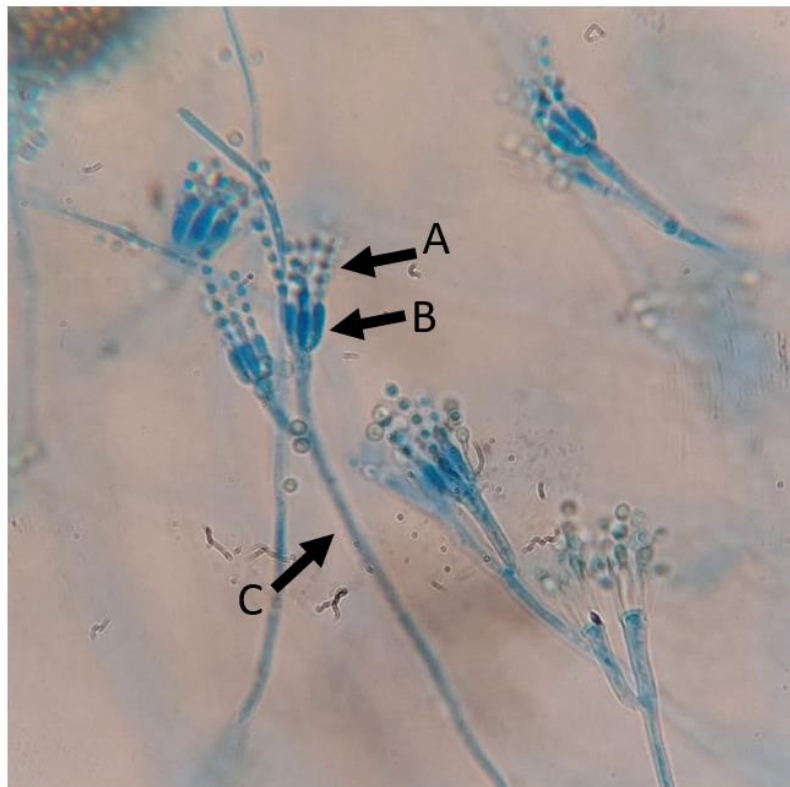
Fonte: Autora (2022)

Legenda: A. Crescimento em meio V8 do isolado OFS11 e destacado pela seta a produção de gotículas de biomoléculas; B. crescimento do OFS 11 em meio ASD placa grande e nas placas pequenas crescido em meio V8; C. Estruturas obtidas em forma de Pellet em meio indutor; D. triplicata e meio indutor todas com crescimento em forma de Pellet.

Essas características são normais pois existem inúmeros fatores que podem afetar a morfologia celular: a linhagem (espécie de fungo), concentração do inóculo, questões que envolvem a nutrição como a composição do meio de cultivo, e as condições de cultivo (concentrações de Oxigênio e gás carbônico dissolvido, pH, temperatura, agitação etc.) (BUFFO, 2020).

Após a obtenção do isolado de forma pura, sem contaminantes, foram realizadas suspensão de esporos para estoque. Também foi realizado o microcultivo do isolado OFS 11 para visualização das estruturas do micélio.

Figura 7 – Resultado da lâmina de microcultivo



Fonte: Autora (2022)

Legenda: Microcultivo em lâmina OFS 11 corado com azul-algodão, biverticilado, A. Conídios. B. Fiálides. C. Estipe (100x).

Pela comparação das estruturas obtidas no microcultivo ao visualizar no microscópio óptico pode-se concluir que se trata de um *Penicillium sp.* (VISAGIE *et al.*, 2014.).

Segundo Lacaz (1998) com a exceção do *Penicillium marneffei*, as espécies de *Penicillium* não são patogênicas para o ser humano e os animais.

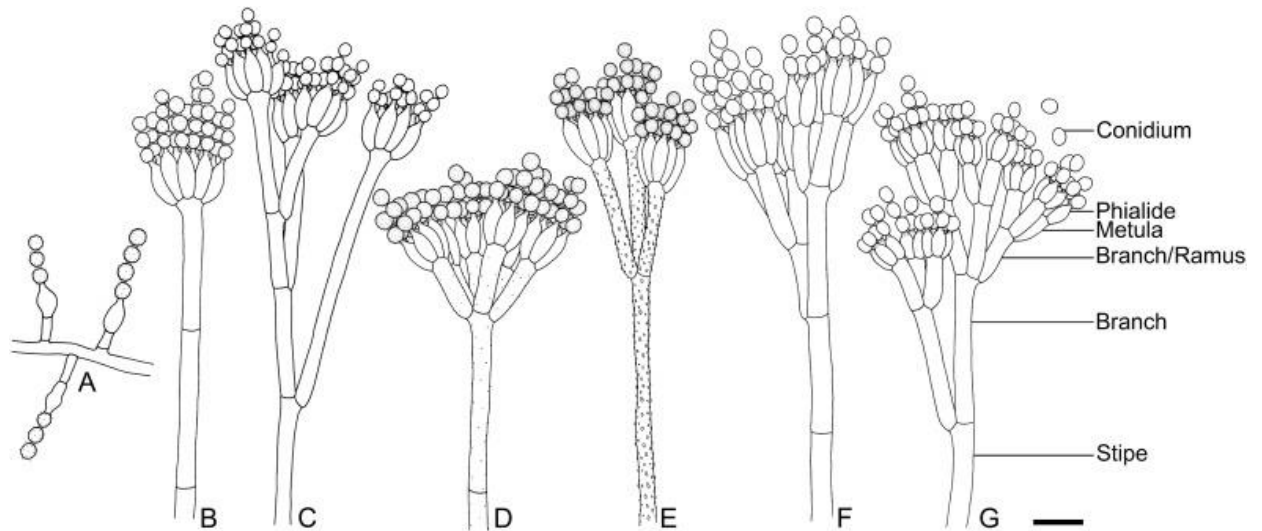


Figura 8 – Morfologia - Padrões de ramificação de conidióforo observados em *Penicillium*.

Fonte: VISAGIE *et al.* (2014)

Legenda: A. Conidióforos com fiálides solitárias. B. Monovérticilado. C. Divaricado. D, E. Bivérticilado. F. Terverticilado. G. Quaterverticilado. Barra de escala = 10 µm.

O gênero *Penicillium* está entre os grupos de fungos mais importantes estudados, devido seu metabolismo variado e adaptável. Essa virtude está ligada diretamente ao seu estilo de vida. Desenvolveram uma gama extraordinária de vias metabólicas, codificadas por vários agrupamentos de genes, que lhes permitem assimilar matéria orgânica como fonte de nutrientes. Várias espécies são notáveis fábricas de biomoléculas (RABHA; JHA, 2018). Abaixo segue uma molécula de lipase que podem ser produzidas pelo gênero *Penicillium*.

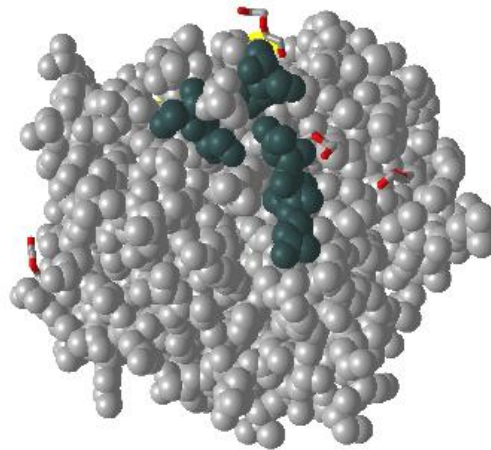


Figura 9 – Estrutura 3D Lipase de *Penicillium expansum*

Fonte: NCBI (2021)

Legenda: Em cinza escuro o sítio ativo e cinza claro a estrutura da enzima lipase de *Penicillium expansum*.

Malmstrom, Christophersena e Frisvadb (2000) apresentam a descoberta de novos ácidos carboxílicos, ácido tanzawaico, benzopirano 3,7-dimetil-1,8-dihidroxi 6-metoxi-isocromano, e micotoxina produzidos por *Penicillium citrinum*, *Penicillium steckii* prospectados de ambiente marinho, isolados de tunicado, seres filtradores do filo Chordata.

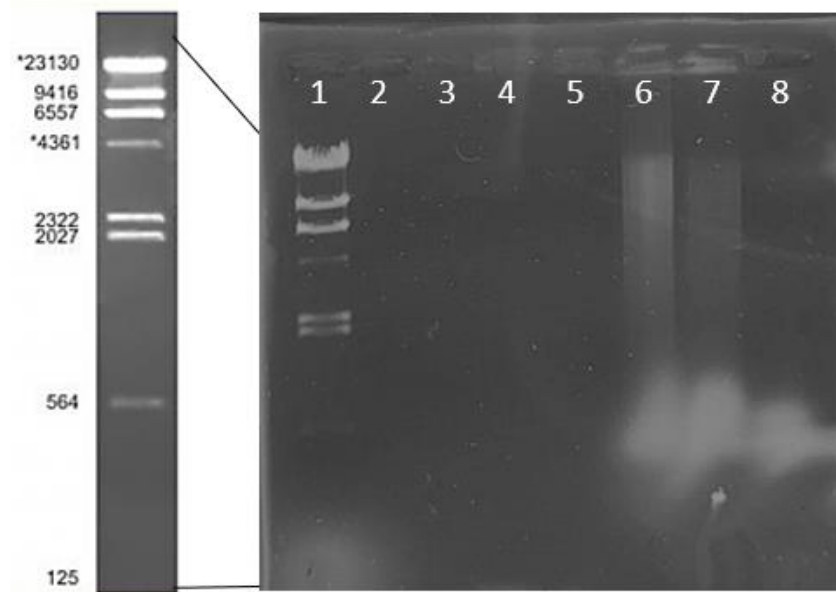
#### 4.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Esta seção é dividida em três etapas a extração de DNA, amplificação das Regiões de interesse e análise dos resultados obtidos no sequenciamento.

##### 4.3.1 Extração de DNA total da biomassa micelial

Os produtos provenientes das extrações de DNA foram verificados em gel de agarose 0,8%, e na imagem 10 abaixo pode ser visualizado apenas nas canaletas 6 e 7 o arraste característico.

Figura 10 – Extração de DNA OFS 11.



Fonte: Autora (2021)

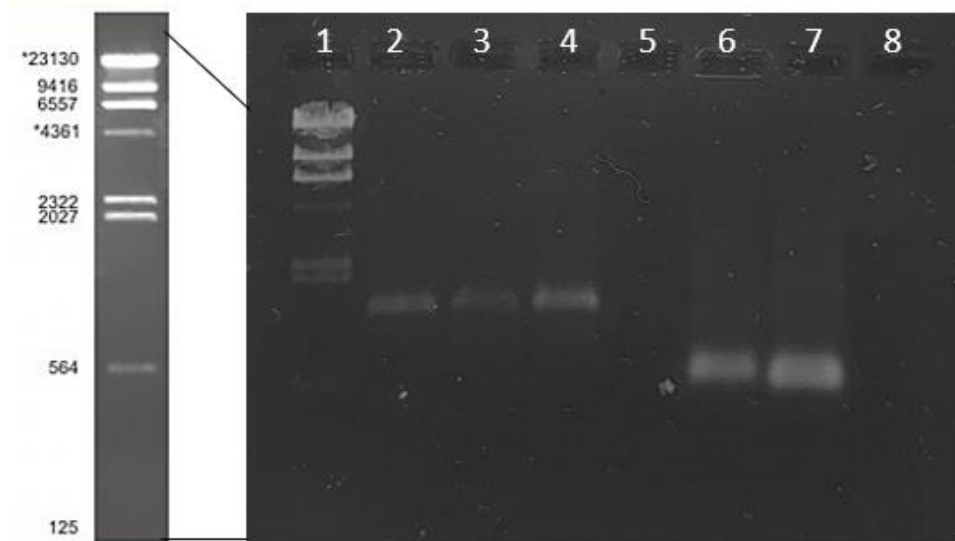
Legenda: Canaleta 1: Marcador de peso molecular Lambda/HindIII Ludwig biotec®; Canaleta 2: Extração de DNA OFS11\_tubo 0\_10.05.2022; Canaleta 3: Extração de DNA OFS11\_tubo 1\_10.05.2022; Canaleta 4: Extração de DNA 6156\_10.05.2022; Canaleta 5: Extração de DNA 6150\_10.05.2022; Canaleta 6: DNA antigo OFS11\_1; Canaleta 7: DNA antigo OFS11\_2; Canaleta 8: Extração de DNA OFS11\_29.04.2022.

A dificuldade nas extrações de DNA molde de boa qualidade e em grande quantidade, em fungos, pode ser justificada pela presença de uma parede celular quitinosa rígida. Por outro lado, a capacidade de secretar enzimas digestivas e de expressar abundantes transportadores de membrana, preferencialmente nas pontas das hifas, pode ser entendida como uma consequência direta de um estilo de vida ancestral dos fungos. Suas organizações celulares podem variar de organismos monopolares completamente unicelulares aos filamentos que podem formar estruturas macroscópicas (NARANJO-ORTIZ; GABALDÓN, 2019).

#### 4.3.2 Amplificação da região ITS 1 e 4

A amplificação da região ITS foi realizada com Mix 1 utilizando o programa 1. O resultado obtido pela revelação do gel de agarose 0,8%, segue exibido na figura 11.

Figura 11 – Amplificação da região ITS Mix 1 com programa 1.



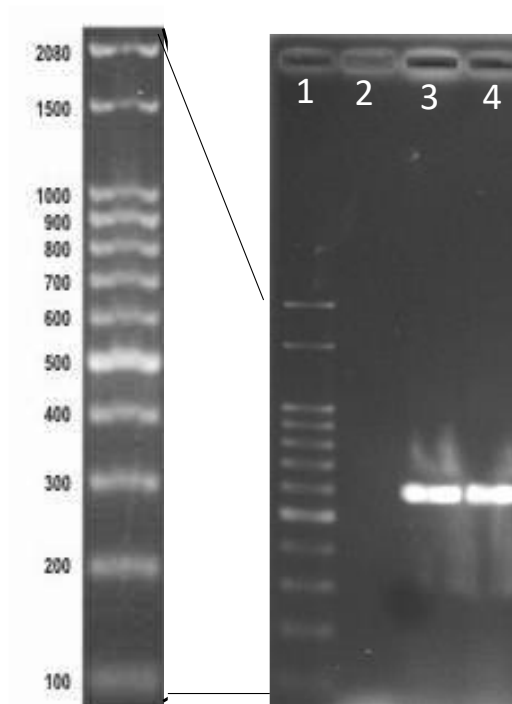
Fonte: Autora (2022)

Legenda: Canaleta 1: Marcador de peso molecular Lambda/HindIII Ludwig biotec®; Canaleta 2: Produto da PCR 16S CC2-17; Canaleta 3: Produto da PCR 16S CC2-17; Canaleta 4: Produto da PCR 16S CC2-17; Canaleta 5: Controle negativo; Canaleta 6: Produto da PCR \_ITS 1 e 4\_5884; Canaleta 7: Produto da PCR \_ITS 1 e 4\_OFS11; Canaleta 8: Controle negativo.

Os fragmentos obtidos na canaleta 7 conforme elucidado acima, apresentou tamanho aproximado de 564 pb ao fazer a comparação com os fragmentos do marcador de peso molecular, que está representado na canaleta 1.

Com o Mix 2 e o programa 2 foi possível à amplificação da região ITS, na temperatura de anelamento de 60°C, conforme pode ser visualizado na figura 12 canaletas 3 e 4.

Figura 12 – Amplificação da região ITS Mix 2 com programa 2



Fonte: Autora (2017)

Legenda: Canaleta 1: Ladder 100 PB da Ludwig biotec®, Canaleta 2:vazio; Canaleta 3 e 4:Amplificação da região ITS1\_4, produto com tamanho aproximado entre 600 e 500 pb.

### 4.3.3 Amplificação de outras regiões de interesse

Visagie *et al.* (2014) além de elucidar a morfologia dos *Penicillium*, traz diagrama com métodos de identificação e caracterização do gênero em questão, indica *primers* específicos como os da calmodulina, RPB2 e suas condições para PCR.

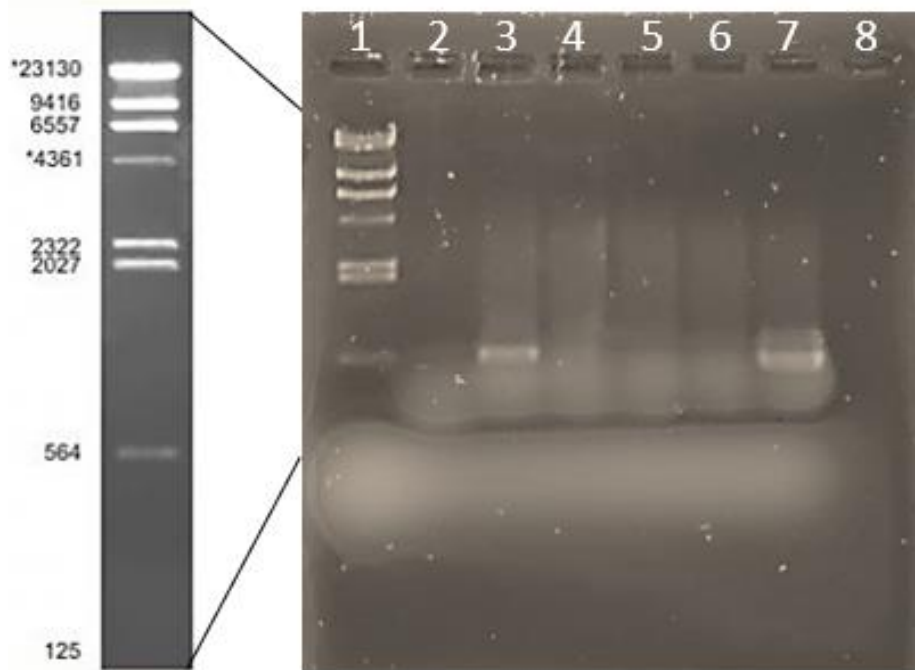
Lücking *et al.* (2020) relata que a identificação apenas com ITS não é suficiente e sustentável e propõem a utilização de outras regiões.

Dessa forma outros “*primers*” que amplificam regiões diferentes do ITS foram selecionados, conforme descrito na secção 4.3.2.

Todavia foi possível a realização de um teste inicial realizando o modelo de mix 1 programa 1 como tentativa, visto que os primers possuem temperatura de anelamento razoavelmente semelhantes. O resultado segue apresentado na figura 13.



Figura 13 – Gel de agarose com os produtos de amplificação com os primers novos



Fonte: Autora (2022)

Legenda: Marcador de peso molecular Lambda/HindIII Ludwig biotec®; Canaleta 2: Produto PCR\_ Controle negativo; Canaleta 3: Produto PCR\_ CMD 5 e 6; Canaleta 4: Produto PCR\_ CF 4 e 1; Canaleta 5: Produto PCR\_ ITS 1 e 4; Canaleta 6: Produto PCR\_ EF1-728 e 1567; Canaleta 7: Produto PCR\_ Bt2a e b; Canaleta 8: vazia.

Houve ampliações com os primers CMD 5 e 6 referentes a região da calmodulina. A banda característica está representada na canaleta 3 da figura 13, nas condições de Mix 1 e programa 1. Conforme relatado por Yin Guohua *et al.* (2017) o tamanho dos fragmentos gerados por esses pares de primers são de aproximadamente 580 pb. Portanto obteve-se êxito nessa amplificação e o produto de PCR será purificado e enviado ao sequenciamento.

Em contrapartida os pares de primers CF 4 e 1 (canaleta 4), ITS 1 e 4 novo (canaleta 5) e EF1-728 e 1567 (canaleta 6) não apresentaram fragmentos amplificados. Portanto condições de programa do manual de instruções da Long taq podem ser adaptadas como proposta de ajuste.

E por fim a canaleta 7 apresentou fragmentos referentes a amplificação da região de Bt2 a e b que compreende a proteína  $\beta$ -tubulina. Porém bandas inespecíficas acima do fragmento maior podem ser visualizadas, logo um aumento de até 2°C na temperatura de anelamento é sugerido para aumentar a especificidade de dos primers.

O teste aplicado foi de grande valia e foram traçadas estratégias para a busca de ampliações mais limpas e sem bandas adicionais.

#### 4.3.4 Resultados dos sequenciamentos e Alinhamentos.

Ao receber os resultados da empresa de sequenciamento, em primeira instância os documentos foram abertos no programa Chromas para avaliação dos eletroferogramas (Anexo A), na sequência abertos no programa Mega para obter-se a série de nucleotídeos correspondente (Anexo B). Por meio do site NCBI, utilizou-se Blastn, para realização do alinhamento com banco de dados mundial GenBank (Anexo C) e dados a partir da homologia com banco de dados específico de Fungos MycoCosm (Anexo D).

Tabela 8 -Identificação molecular

Isolado	Espécie	Banco de Danos	Similaridade	E-value	Publicação
OFS 11	<i>Penicillium steckii</i>	Genbank	99,63%	0	*NP mt582790.1
	<i>Penicillium citrinum</i>		100%	0	*NP kx610136.1
	<i>Penicillium steckii</i>		99,47%	0	*NP kx302053.1
	<i>Penicillium steckii</i>	MycoCosm	99,6	0	<sup>1</sup> Publicação
	<i>Penicillium steckii</i>		99,8%	0	<sup>2</sup> Publicação
	<i>Penicillium steckii</i>		100%	6,45E-147	<sup>3</sup> Publicação

\*NP: Não Publicado

\*\*<sup>1,2 e 3</sup> Nielsen JC, Grijsseels S, Prigent S, Ji B, Dainat J, Nielsen KF, Frisvad JC, Workman M, Nielsen J. Global analysis of biosynthetic agrupamentos de genes revela um vasto potencial de produção de metabólitos secundários em espécies de *Penicillium*. *Nat Microbiol.* 3 de abril de 2017;2():17044. doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.44

## 5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Dos 15 isolados estudados o microrganismo denominado OFS11 bioprospectado da superfície de um recipiente contendo óleo de fritura, apresentou halo fluorescente quando crescido em meio com Rodamina B, e se destacou em relação aos demais no ensaio quantitativo com substrato sintético p-NPP, onde apresentou atividade enzimática de 8,6 U/mL.

Quando realizado experimento de microcultivo as estruturas aderidas na lamínula quando coradas em azul-algodão puderam ser identificadas com o gênero *Penicillium sp.*

As identificações moleculares foram um desafio visto que a extração de DNA de fungos filamentosos possui muitos detalhes frente a ruptura da parede de quitina e a sensibilidade frente a degradação do DNA quando em temperatura ambiente e a movimentos muito abruptos.

Contudo foi possível uma extração bem sucedida a qual gerou DNA molde suficiente para realização da identificação pela amplificação região ITS a nível de gênero e espécie.

Foi feito um sequenciamento do amplicom (ITS1\_4) com o primer ITS1\_F e esse deu 100% homologia no banco de dados MycoCosm com *Penicilliu steckii*. Uma réplica da mesma PCR resultou numa homologia no mesmo banco de dados 99,8%. Indicando fortemente que o isolado faz parte desta espécie.

Portanto o OFS11 foi identificado com mais de 99% de homologia como *Penicillium Steckii* em banco de dados específico de fungos.

A região de Calmodulina foi amplificada com os primers CMD 5 e 6 com sucesso. As demais regiões precisam ser otimizadas ( $\beta$ tubullina, EF1-alpha e CF 1 e 4).

Testes com p-NPP foram iniciados para buscar a caracterização da enzima em pH e temperatura ideais. Entretanto muitos problemas surgiram, entre eles a questão da solubilização da solução substrato, porque ela ficava turva além do normal durante os testes. Nos estudos realizados por Paluzar *et al.* (2021), ele cita que problemas de medições podem ser causados pela baixa solubilidade do substrato sintético na água assim como a turbidez causada pelos ácidos graxos liberados.

Portanto antes da execução dos testes de caracterização enzimática com substrato sintético, será necessário padronizar as condições ótimas de produção de enzima. Nesses ensaios podem ser definidos fatores críticos para a produção da enzima de interesse, tais como: a indução com óleo, tempo de crescimento e quantidade de esporos por inóculo.

## REFERÊNCIAS

- ARBIGE, M. V.; SHETTY, J. K.; CHOTANI, G. K. Industrial Enzymology: The Next Chapter. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 12, p. 1355–1366, dez. 2019. DOI: 10.1016/j.tibtech.2019.09.010.
- ALBERTS, B. *et al.* **Fundamentos da Biologia Celular**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C.W. **Introductory Mycology**. 3. ed. EUA:John Wiley & Sons, 1979. Disponível em: <https://br1lib.org/dl/5828631/4dcc2c>
- ALVES, M. F. et al. Produção de enzimas por fungos filamentosos. *In*: SILVA, E. N. (org.). **Fundamentos e atualidades em tecnologia e inspeção de alimentos**. v.1 Ed. [S. l.]: Editora In Vivo, 2020.
- ANDRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. **Biomolecules**, v. 4, n.1, p.117-139, 16 jan. 2014.DOI:10.3390/biom4010117. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4030981/pdf/biomolecules-04-00117.pdf>. Acesso em: 08 out. 2021.
- BRENDA, (a) 2021. **Bancos de dados**. Disponível em: <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.1.1.3>. Acesso em: 04 dez. 2021.
- BRENDA, (b) 2021. **Bancos de dados**. Disponível em: <https://www.brenda-enzymes.org/structure.php?show=reaction&id=363890&type=S&displayType=marvin>. Acesso em: 04 dez. 2021.
- BUFFO, Mariane Molina. **Influência da morfologia e do cisalhamento na produção de enzimas celulolíticas por aspergillus niger**. 2020.166 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, São Carlos, 2020. Disponível em: [https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/12802/Tese\\_Mariane\\_Molina\\_Buffo\\_PP\\_GEQ-Ufscar.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/12802/Tese_Mariane_Molina_Buffo_PP_GEQ-Ufscar.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Acesso em: 25 mai. 2022.
- BUSSAMARA, R. *et al.* Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. **Bioresource Technology**, Porto Alegre, v. 101, n. 1, p.268-275, jan. 2010. Disponível em: <Http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.10.063>. Acesso em: 5 out. 2021.
- BUSINESS COMMUNICATIONS COMPANY RESEARCH. **Global Markets for Enzymes in Industrial Applications**.2021 Disponível em: <https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/global-markets-for-enzymes-in-industrial-applications.html>. Acesso em: 03 dez. 2021.

CASAS-GODOY, L. *et al.* Lipases: An Overview. *In:* SANDOVAL, G. (edit.) **Lipases and Phospholipases. Methods in Molecular Biology**. 2. Ed. New York: Humana Press, 2018. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9_1).

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, v.91, n.2, p. 553-556, 1999.  
CAVALCANTE, F. T. T. *et al.* Opportunities for improving biodiesel production via lipase catalysis. **Fuel** v. 288, out. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119577>.

CHANDRA, P. *et al.* Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microbial Cell Factories**. v.19, n.169,2020. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>

CHANG, A. *et al.* BRENDA, the ELIXIR core data resource in 2021: new developments and updates, **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. 1, p. 498-508, 8 jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1025>.

CHOO, D.W.; KURIHARA, T.; SUZUKI, T.; SODA, K.; ESAKI, N. A cold-adapted lipase of an Alaskan psychrotroph, *Pseudomonas* sp. strain B11-1: gene cloning and enzyme purification and characterization. **Appl Environ Microbiol** 1998; 64(2):486–91.

COHEN, E. R. *et al.* **Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry**. INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY Physical and Biophysical Chemistry Division. RSCPublishing; 2007. Disponível em: <https://iupac.org/wp-content/uploads/2019/05/IUPAC-GB3-2012-2ndPrinting-PDFsearchable.pdf>. Acesso em: 03 dez. 2021.

COX, M. M. *et al.* **Biologia Molecular: Princípios e Técnicas**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

CREMONESI, A. S. **Bases da Bioquímica Molecular: estruturas e processos metabólicos**. Curitiba: Intersaberes, 2020.

DE VERO, L. *et al.* **Preservation, Characterization and Exploitation of Microbial Biodiversity: The Perspective of the Italian Network of Culture Collections**. *Microorganisms* vol. 7,12 685. 12 Dec. 2019, doi:10.3390/microorganisms7120685

DIVAKAR, S.; MANOHAR, B. Use of lipases in the industrial production of esters. *In:* POLAINA, J.; MACCABE, A. P. (edit.) **Industrial Enzymes Structure, Function and Applications**. Spain: Springer, 2007.

DYBKAER, R. "Unit "katal" for catalytic activity (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 6, p. 927 -931, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1351/pac200173060927>. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1351/pac200173060927/html>. Acesso em: 03 dez. 2021.

FRANCO - DUARTE, R. *et al.* Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms-From Past to Present. **Microorganisms** v. 7, n. 5, p.130-162, 13 may.

2019.DOI:doi:10.3390/microorganisms7050130. Disponível em:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6560418/pdf/microorganisms-07-00130.pdf>.  
 Acesso em: 01 dez. 2021

GLASS, L. N.; DONALSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.4, p.1323-1330,1995

GHERBAWY, Y., et al. Molecular Barcoding of Microscopic Fungi with Emphasis on the Mucoralean Genera *Mucor* and *Rhizopus*. In: GHERBAWY, Y.; VOIGT, K. (eds) **Molecular Identification of Fungi**. Berlin: Springer, 2010. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-05042-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-642-05042-8_11)

GUEDES, Deborah Carbonera; RIES, Lúcia Allebrandt da Silva (Orient.); RODRIGUES, Roberta Bussamara (Co-orient.). **Produção de biomassa de rhizopus oryzae com potencial catalítico para a transesterificação de óleos vegetais na síntese de biodiesel**. Novo Hamburgo, RS, 2014. 74 f. Monografia (Graduação) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2014.

HONG, S. B.; GO, S. J. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. **Mycologia**, v.97, n.6, p. 1316–1329, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832738>

KHAMBHATY, Y. Applications of enzymes in leather processing. **Environ Chem Lett** v.18, p.747–769, fev. 2020. DOI:<https://doi.org/10.1007/s10311-020-00971-5>.

KOUKER, G.; JAEGER, K.E.; Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**. Alemanha, v.53, n.1, p. 211-213, jan. 1987.

LACAZ, C. S. *et al.* **Guia para identificação: Fungos, Actinomicetos, Algas de interesse médico**. São Paulo: Savier, 1998.

LEITE, C. L. Taxonomia dos fungos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **FUNGOS: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: educs, 2010.

LODISH, H. *et al.* **Biologia Celular e Molecular**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

LÓPEZ-LÓPEZ, O.; CERDÁN, M. E.; SISO, M.I.G. New extremophilic Lipases and esterases from metagenomics. **Current Protein and Peptide Science**, v. 15, p. 445-455, 2014. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4093774/pdf/CPPS-15-445.pdf>

LOTTI, M.; ALBERGHINA, L. Lipases: Molecular Structure and Function. In: POLAINA, J.; MACCABE, A. P. (edit.) **Industrial Enzymes Structure, Function and Applications**. Spain: Springer, 2007.

LÜBECK, M.; LÜBECK, P.S. Fungal Cell Factories for Efficient and Sustainable Production of Proteins and Peptides. **Microorganisms**, v.10, n.753, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040753>

LÜCKING, R. *et al.* “Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding?.” **IMA fungus** v. 11, p.14-10, jul. 2020. doi:10.1186/s43008-020-00033-z. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7353689/pdf/43008\\_2020\\_Article\\_33.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7353689/pdf/43008_2020_Article_33.pdf). Acesso em: 5 out. 2020.

LUZ, B. S. *et al.* Lipase production by microorganisms isolated from the Serra de Ouro Branco State Park. São Paulo: **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. 1, 31 Mar. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120190672>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aabc/a/FyRtfzLw5s5jZkj5qktPqFr/?lang=en#>. Acesso em: 03 out. 2021.

MALMSTROM, J.; CHRISTOPHERSENA, C.; FRISVADB, J. C. Secondary metabolites characteristic of *Penicillium citrinum*, *Penicillium steckii* and related species. **Phytochemistry**, v. 54, n.3, p. 301-309, 2000. DOI: 10.1016/s0031-9422(00)00106-0

MAROTTI, B. S. *et al.* Screening of species from the genus *Penicillium* producing cell bound lipases to be applied in the vegetable oil hydrolysis. **Química Nova**, vol. 40, no. 4, São Paulo, 2017. Doi: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170033>

MENDES, D. B. *et al.* Lipolytic Enzymes with Hydrolytic and Esterification Activities Produced by Filamentous Fungi Isolated from Decomposition Leaves in an Aquatic Environment. **Enzyme Research**, p. 1-13, 2 jun. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/8182425>. Disponível em: <https://repositorio.inpa.gov.br/bitstream/1/15552/1/artigo-inpa.pdf>. Acesso em: 8 out. 2021.

MIGUEL, A.; ORTIZ, N.; GABALDON, T. Fungal evolution: major ecological adaptations and evolutionary transitions. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 94, n.4, p. 1443-1476, 2019. DOI:10.1111/brv.12510. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6850671/pdf/BRV-94-1443.pdf>. Acesso em: 5 out. 2021.

MOLINA, G. *et al.* **Bioprocessing for biomolecules production**. Hoboken: Wiley, 2020. Disponível em: <https://br1lib.org/book/5289818/a7fb65>. Acesso em: 26 nov. 2021.

MUGGIA, L. *et al.* An Overview of Genomics, Phylogenomics and Proteomics Approaches in Ascomycota. **Life**, v.10, v.12, p.356, dez. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/life10120356>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2075-1729/10/12/356>. Acesso em: 05 out. 2021.

NARANJO-ORTIZ, M. A.; GABALDÓN, T. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society** v. 94, n. 6, p. 2101-2137, 2019. DOI:10.1111/brv.12550. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6899921/pdf/BRV-94-2101.pdf>. Acesso em: 5 out. 2021.

NCBI: Programa online em cima da estrutura da enzima cristalizada lipase do *Penicillium expansum*. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/icn3d/full.html?&mmdbid=80239&bu=1&showanno=1&source=full-feature>. Acesso em: 4 dez. 2021.

- OLIVEIRA, N. M. L. *et al.* Lipases microbianas: Bioprocessos e aplicações industriais. In: ANDRADE, D. F. (edit.) **Processos Químicos e Biotecnológicos**. Belo Horizonte: Poisson, 2020. DOI: 10.36229/978-65-86127-43-0. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Ananias-Junior/publication/341939650\\_Prospeccao\\_fitoquimica\\_das\\_folhas\\_de\\_Parica\\_Schizolobium\\_Amazonicum\\_Huber\\_Ex\\_Ducke/links/5f1f95f992851cd5fa4e2184/Prospeccao-fitoquimica-das-folhas-de-Parica-Schizolobium-Amazonicum-Huber-Ex-Ducke.pdf#page=32](https://www.researchgate.net/profile/Ananias-Junior/publication/341939650_Prospeccao_fitoquimica_das_folhas_de_Parica_Schizolobium_Amazonicum_Huber_Ex_Ducke/links/5f1f95f992851cd5fa4e2184/Prospeccao-fitoquimica-das-folhas-de-Parica-Schizolobium-Amazonicum-Huber-Ex-Ducke.pdf#page=32)
- ORTELLADO, L. E. *et al.* Exploring novel *Penicillium* lipolytic activity from the Paranaense rainforest. **Environmental Technology**. v.42, p. 4372-4379, mai, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1759697>
- OVERMANN, JÖRG. Significance and future role of microbial resource centers. Germany: **Systematic and Applied Microbiology**. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2015.02.008>
- PACHECO, T. F.; MENDES, T. D. Guia prático para caracterização de enzimas. Brasília: **Embrapa Agroenergia**, p.58, n.35. 2021 Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/222428/1/Guia-pra769tico-para-a-caracterizac807a771o-de-enzimas.pdf>. Acesso em: 03 dez. 2021.
- PALUZAR, H. I. *et al.* Production and characterization of lipase from *Penicillium aurantiogriseum* under solid-state fermentation using sunflower Pulp. **Biocatalysis and biotransformation**. v.39, n.4, mar, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/10242422.2021.1901888>
- PAPADAKI, E. *et al.* 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**, [s. l.], v. 309, p. 123-317, 2020. DOI:10.1016/j.biortech.2020.123317.
- PINHO, D. B.; MACHADO, A. R.; FIRMINO, A. L. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2016.
- RABHA, J.; JHA, D.K., Metabolic Diversity of *Penicillium*. In: GUPTA, V. K.; RODRIGUEZ-COUTO, S. (edit.(s)). **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. Elsevier, p. 217-234, ISBN 9780444635013, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00012-0>.
- RAVEENDRAN, S. *et al.* Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. **Food Technol. Biotechnol**, Croatia, v. 56, n. 1, p. 16-30, jan. 2018. DOI: 10.17113/ftb.56.01.18.5491 Disponível em: [https://www.ftb.com.hr/images/pdfarticles/2018/January-March/FTB-56\\_016.pdf](https://www.ftb.com.hr/images/pdfarticles/2018/January-March/FTB-56_016.pdf). Acesso em: 30 nov. 2021.
- REHNER, S. A.; BUCKLEY, E. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. **Mycologia**, v.97, n.1, p. 84-89, 2005.
- REINEHR, C. O. *et al.* Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso



em reações de esterificação e alcoólise. **Química nova**: órgão de divulgação da Sociedade Brasileira de Química, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 454-460, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140077>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/3jP8GFzjdt86TXQfx4jVMNM/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 29 nov. 2021.

RIGO, D. et al. Produção Microbiológica de enzimas: Uma revisão/MICROBIOLOGICAL PRODUCTION OF ENZYMES: A REVIEW. **Brazilian Journal of Development**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 9232–9254, 2021. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/download/23661/19022>.

SALIS, A.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Use of lipases for the production of biodiesel. In: POLAINA, J.; MACCABE, A. P. (edit.) **Industrial Enzymes Structure, Function and Applications**. Spain: Springer, 2007.

SAMBROOK, J. *et al.* **Molecular Cloning** – a laboratory manual. 2. Ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.1886, 1989.

SAMSON, R. A. *et al.* Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*: **Studies in mycology**, v. 78, p. 141–173, Jun. 2014.

SANTANA, I. **Mistura de enzimas mostrou alto desempenho para gerar etanol a partir de bagaço de cana**. 2021 Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/52639673/mistura-de-enzimas-mostrou-alto-desempenho-para-gerar-etanol-a-partir-de-bagaco-de-cana>. Acesso em: 07 nov. 2021.

SEMIONATO, S. **Avaliação da atividade lipolítica de bactérias isoladas dos dispositivos de remoção de gordura da ETE-UFES**. 2006. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo, 2006.)

SINGH, K. A.; MUKHOPADHYAY, M., Overview of Fungal Lipase: A Review. 2012; **Appl Biochem Biotechnol**, n.166, p.486-520, 11 nov. 2012. DOI: 10.1007/s12010-011-9444-3

SOUZA, O. C. **Produção de lipases por culturas de trichosporon da micoteca urm: seleção, produção, purificação e aplicação enzimática**. Tese (Doutorado) – Curso de biologia de fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/26600/1/TESE%20Odacy%20Camilo%20de%20Souza.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2021.

TRIGIANO, Robert N.; WINDHAM, Mark T.; WINDHAM, Alan S. **Fitopatologia-conceito e exercícios de laboratório**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, p.184.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL. **Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia (Bacharelado)** 2021. Disponível em: <https://www.uergs.edu.br/engenharia-de-bioprocessos-e-biotecnologia-bacharelado>. Acesso em: 04 dez. 2021.

VARGAS, M. *et al.* Lipases as biocatalyst for biodiesel production. In: SANDOVAL, G.(edit.) **Lipase and Phospholipases. Methods in Molecular Biology**. New York: Humana Press, 2018. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9_21).

VARRELA, S. *et al.* Diversity, Ecological Role and Biotechnological Potential of Antarctic Marine Fungi. **Journal of fungi**, v. 7, n. 5, p. 391 – 415, 17 may 2021.

DOI:10.3390/jof7050391. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8157204/pdf/jof-07-00391.pdf>. Acesso em: 01 dez. 2021.

VERMA, *et al.* Recent trends in microbial flavour Compounds: A review on Chemistry, synthesis mechanism and their applications in food. **Saudi Journal of Biological Sciences**, p.1-12, nov. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.11.010>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X21009670>. Acesso em: 05 dez. 2021.

VISAGIE, C. M. *et al.* Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*.

**Studies in Mycology**, v. 78, p. 343-371, 2014. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166061614000074>. Acesso em: 01 dez. 2021.

WHITE, T. J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego CA: Academic Press, p.315-322,1990.

YIN, GUOHUA *et al.* Characterization of Blue Mold *Penicillium* Species Isolated from Stored Fruits Using Multiple Highly Conserved Loci. **J. Fungi**, n.3, v.12, 2017.

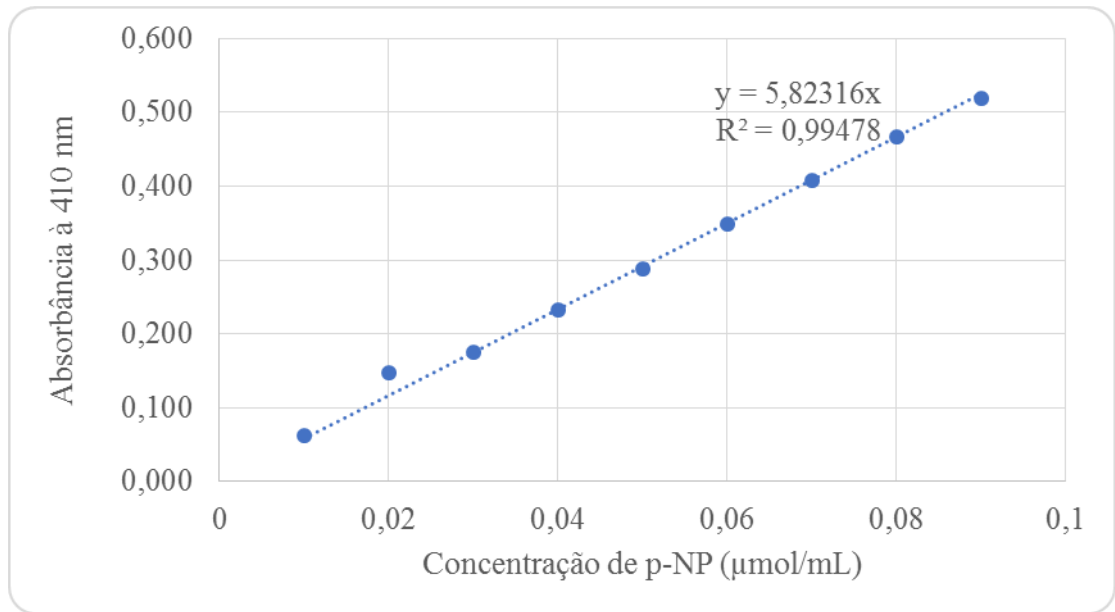
Doi:10.3390/jof3010012

ZIMMER, K.R. *et al.* Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. Novo Hamburgo: **Revista Liberato**, v. 10, n. 14, p. 123-137, 2009. Disponível em:

<http://revista.liberato.com.br/index.php/revista/article/view/140/130>. Acesso em: 29 nov. 2021.

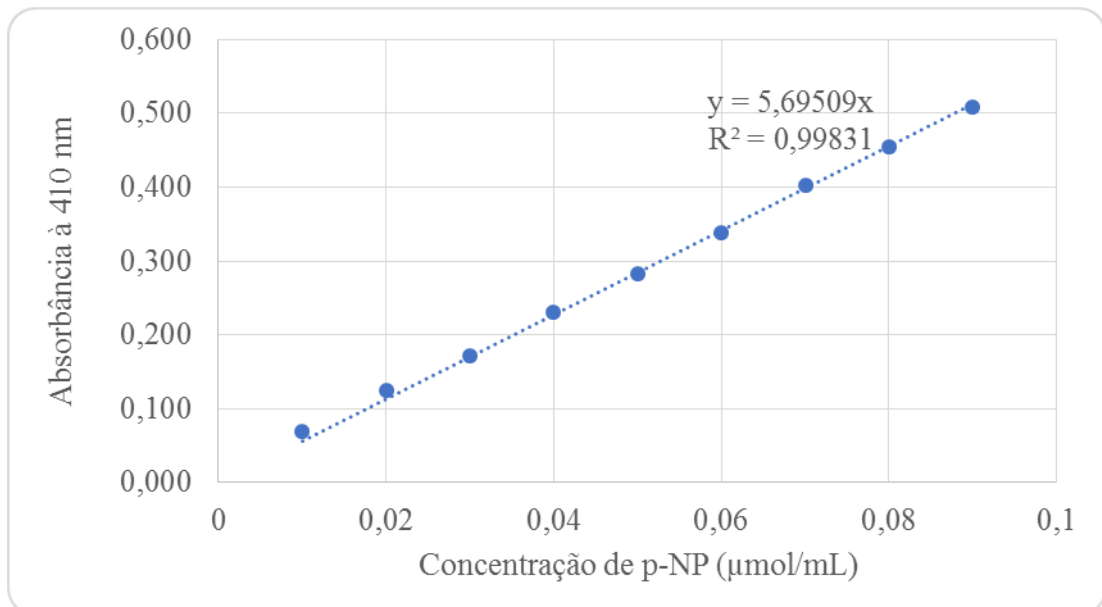
## APÊNDICE A - Curvas padrão de p-NP

### Gráfico A.1 - Curva padrão de p-NP n° 1- pH 8



Fonte: Autora, (2021).

### Gráfico A.2 - Curva padrão de p-NP n° 2- pH 8



Fonte: Autora, (2021).



Figura A.1.1 - AMOSTRA 2ITS1\_F10 continuação

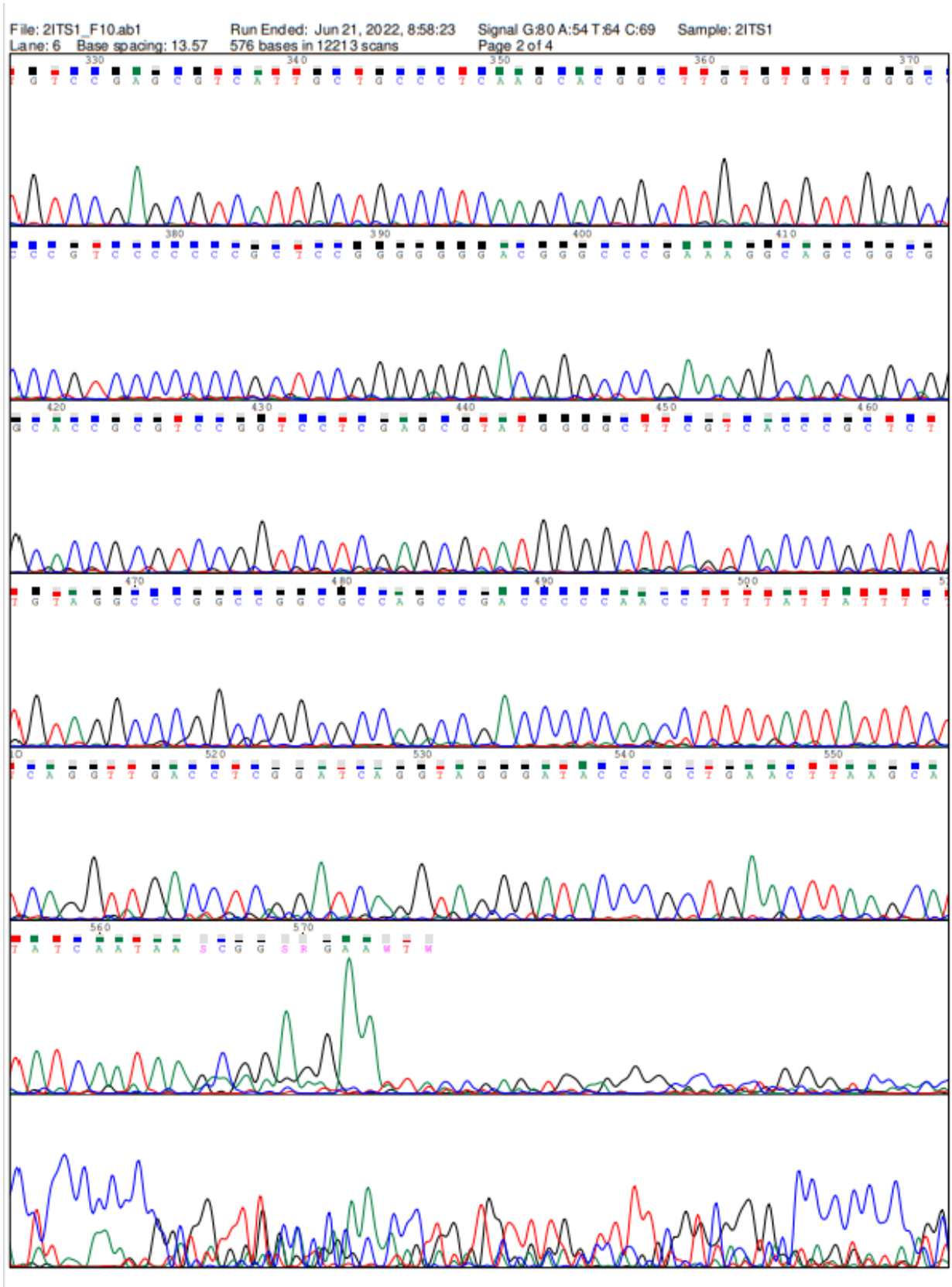


Figura A.2 - AMOSTRA 2ITS4\_G10

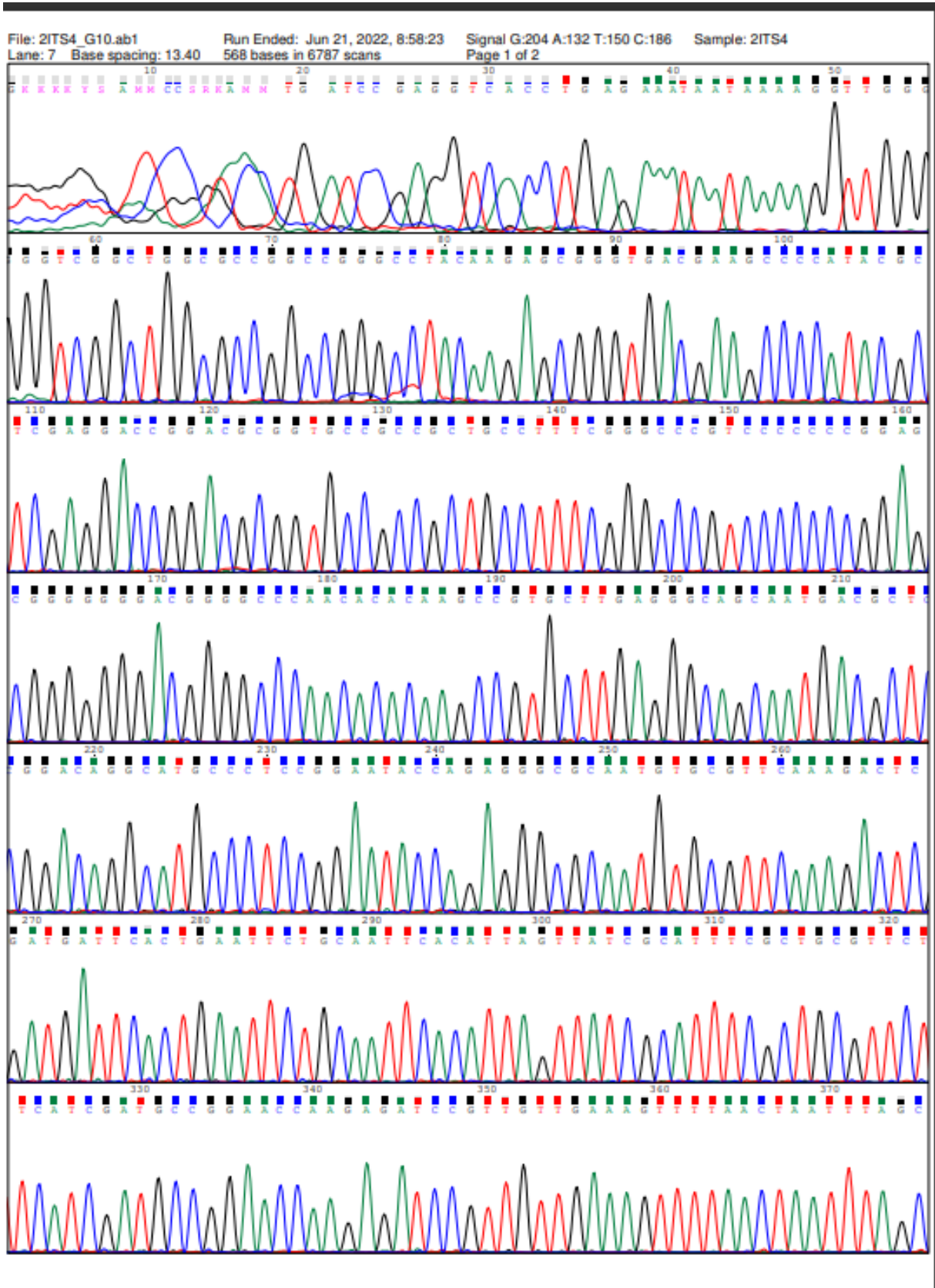
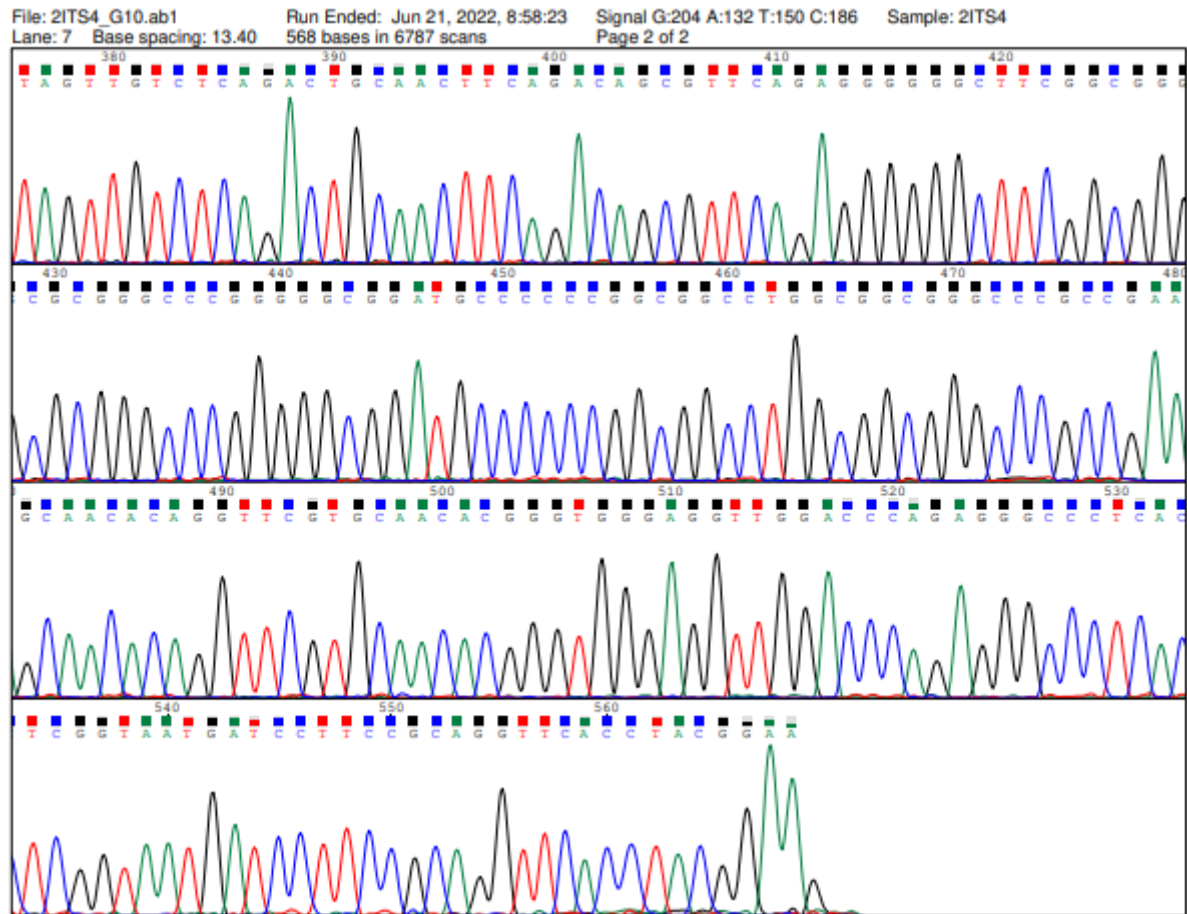


Figura A.2.1 - AMOSTRA 2ITS4\_G10 Continuação









### ANEXO B – Sequências depuradas.

Sequências provenientes da amplificação da região ITS com o Mix 1 e programa 1:

ITS1\_F10

TGAAAGSCATCTGGGTCCACCTCCCACCCGTGTTGCACGAACCTGTGTTGCTTCGG  
CGGGCCCGCCGCCAGGCCGCGGGGGGCATCCGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCG  
AAGCCCCCTCTGAACGCTGTCTGAAGTTGCAGTCTGAGACAACCTAGCTAAATTA  
GTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCG  
AAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAAC  
GCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTG  
CCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCCCGCTCCGGGGGGGACGG  
GCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTC  
ACCCGCTCTTGTAGGCCCGGCCGCGCCAGCCGACCCCAACCTTTTATTATTCT  
CAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAS  
CGGSRGAA.

2ITS4\_G10

TGATCCGAGGTCACCTGAGAAATAATAAAAGGTTGGGGGTCGGCTGGCGCCGGC  
CGGGCCTACAAGAGCGGGTGACGAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGT  
GCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCCGTCCCCCGGAGCGGGGGGGACGGGGCCCAA  
CACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCTCCGG  
AATACCAGAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATCACTGAATTCTGCA  
ATTCACATTAGTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGA  
TCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTAATTTAGCTAGTTGTCTCAGACTGCAACTTCAGA  
CAGCGTTCAGAGGGGGGCTTCGGCGGGCGCGGGCCCCGGGGGCGGATGCCCCCCG  
GCGGCCTGGCGGCGGGCCCCGCCGAAGCAACACAGGTTTCGTGCAACACGGGTGGG  
AGGTTGGACCCAGAGGGCCCTCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTAC  
GGAA

Sequência proveniente da amplificação da região ITS com o Mix 2 e programa 2:

TGGGTCCACCTCCCACCCGTGTTGCACGAACCTGTGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCC  
GCCAGGCCGCGGGGGGCATCCGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGCCCCCT  
CTGAACGCTGTCTGAAGTTGCAGTCTGAGACAACCTAGCTAAATTAGTTAAACTT  
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA  
ACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCG

CCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCA  
CGGCTTGTGTGTTGGGCCCGTCCCGGCCGCTCCGGGGGGGACGG.

## ANEXO C – Alinhamentos de seqüências no BLASTn

Figura C.1 - 2ITS1\_F10

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 10

select all 10 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium steckii strain DUCC5750 internal transcribed spacer 1, partial s...	Penicillium...	998	998	97%	0.0	99.63%	1151	MT582790.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fungal sp. strain P129B internal transcribed spacer 1, partial sequence 5...	fungal sp.	998	998	97%	0.0	99.63%	741	KU837722.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium steckii strain 3.2.2.2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence...	Penicillium...	998	998	97%	0.0	99.63%	856	KX674639.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium steckii isolate 118 internal transcribed spacer 1, partial sequenc...	Penicillium...	998	998	97%	0.0	99.63%	601	KU847878.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fungal endophyte strain HM-8-B clone L164 internal transcribed spacer 1,...	fungal end...	998	998	97%	0.0	99.63%	758	KT291052.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium sp. isolate A17 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequ...	Penicillium...	998	998	97%	0.0	99.63%	622	MW555217.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium steckii strain A2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence int...	Penicillium...	998	998	97%	0.0	99.63%	594	KJ145419.1

Figura C.2 - 2ITS4\_G10

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium citrinum strain 39KS2 18S ribosomal RNA gene, partial se...	Penicillium...	1016	1016	100%	0.0	100.00%	1071	KX610136.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium steckii strain JB-NW-2-1 18S ribosomal RNA gene, partial...	Penicillium...	1011	1011	100%	0.0	99.82%	593	MJ554368.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium steckii strain 3.2.2.2 18S ribosomal RNA gene, partial seq...	Penicillium...	1011	1011	100%	0.0	99.82%	856	KX674639.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium steckii isolate 108YD142 18S ribosomal RNA gene, partial...	Penicillium...	1011	1011	100%	0.0	99.82%	593	KU316936.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium sp. isolate A17 small subunit ribosomal RNA gene, partial...	Penicillium...	1011	1011	100%	0.0	99.82%	622	MW555217.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium steckii isolate FP-15-4 small subunit ribosomal RNA gene...	Penicillium...	1011	1011	100%	0.0	99.82%	601	MZ568311.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium steckii isolate B-33-3 small subunit ribosomal RNA gene...	Penicillium...	1011	1011	100%	0.0	99.82%	590	MZ568303.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium steckii isolate B-31-2 small subunit ribosomal RNA gene...	Penicillium...	1011	1011	100%	0.0	99.82%	590	MZ568301.1

Figura C.3 - Mix 2 e programa 2

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium steckii isolate D22 internal transcribed spacer 1, partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene and i...	Penicillium steckii	680	680	100%	0.0	99.47%	578	KX302053.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium steckii strain AD20 internal transcribed spacer 1, partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene, com...	Penicillium steckii	680	680	100%	0.0	99.47%	500	KX215128.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fungal sp. ZH D1-1 internal transcribed spacer 1, partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene and internal tra...	fungal sp. ZH D1-1	680	680	100%	0.0	99.47%	546	GQ220363.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium steckii strain DUCC5750 internal transcribed spacer 1, partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene...	Penicillium steckii	675	675	100%	0.0	99.20%	1151	MT582790.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium steckii strain TBS312 internal transcribed spacer 1, partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene an...	Penicillium steckii	675	675	100%	0.0	99.20%	543	MK805469.1
<input checked="" type="checkbox"/> Digitaria exilis annotation	Digitaria exilis	675	2601	100%	0.0	99.20%	60747861	LR792838.1
<input checked="" type="checkbox"/> Digitaria exilis genome assembly chromosome: UA	Digitaria exilis	675	2601	100%	0.0	99.20%	60747861	LR761623.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium steckii isolate AMF25 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spa...	Penicillium steckii	675	675	100%	0.0	99.20%	553	MN794447.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium steckii isolate KUASN12 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed ...	Penicillium steckii	675	675	100%	0.0	99.20%	592	MK187973.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium steckii isolate KUASN7 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed s...	Penicillium steckii	675	675	100%	0.0	99.20%	592	MN186882.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium steckii isolate Ladakh isolate 1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transc...	Penicillium steckii	675	675	100%	0.0	99.20%	605	

## ANEXO D – Alinhamentos de seqüências no MycoCosm

Figura D.1 - 2ITS1\_F10

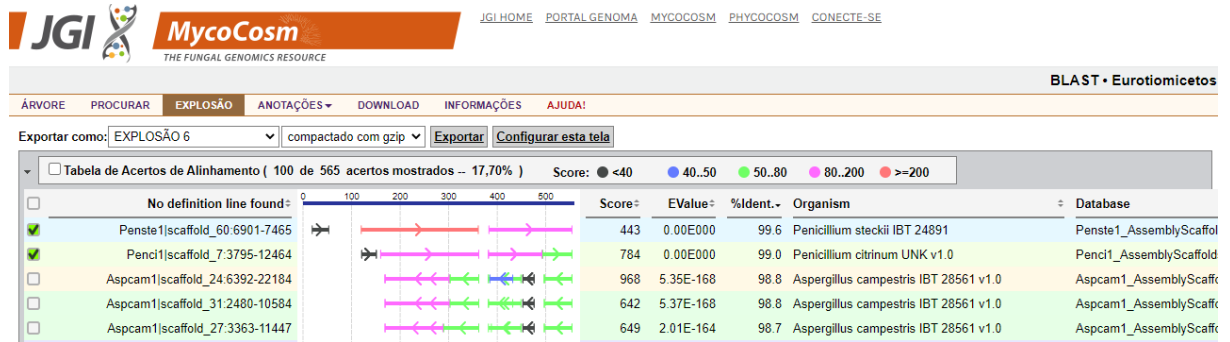


Figura D.2 - 2ITS4\_G10

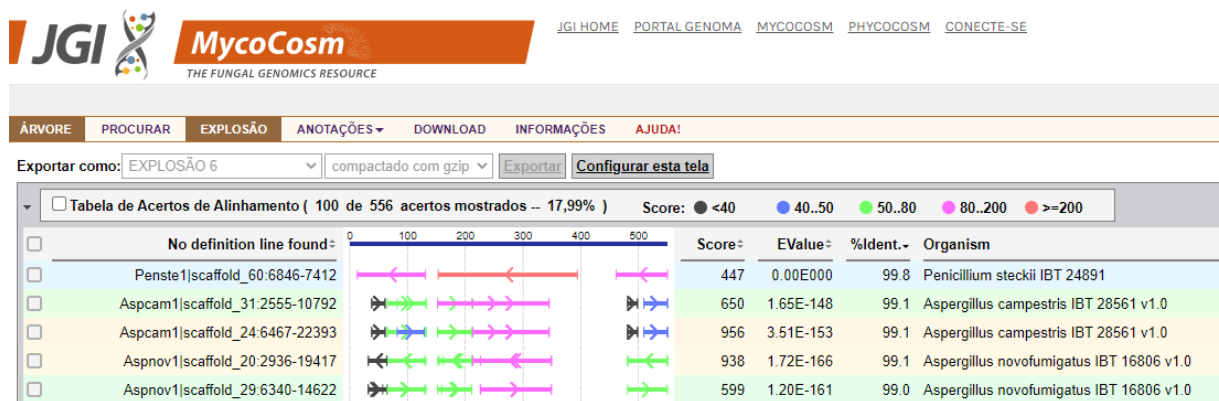


Figura D.3 - Mix 2 e programa 2

