

## ANÁLISE QUANTITATIVA DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE *CLADOSPORIUM CUCUMERINUM*

Maria Larysse Yasmin Lira Pereira<sup>1</sup>  
Eliana Santos Lyra da Paz<sup>2</sup>  
Lindeberg Rocha Freitas<sup>3</sup>  
Francisco Braga da Paz Júnior<sup>4</sup>

### RESUMO

Enzimas são catalisadores protéicos muito importantes por agir diminuindo o tempo de reações químicas, podendo ser aplicadas na produção de medicamentos cicatrizantes e na biorremediação ambiental. Dentre as principais fontes enzimáticas estão os fungos – graças à simplicidade em cultivar esses seres e extrair deles as enzimas produzidas. Esse trabalho teve o objetivo de analisar a produção de protease do *Cladosporium cucumerinum* (AMB 11) isolado da micota aerófila do ambulatório do IFPE – campus Recife. O isolado fúngico foi identificado como pertencente à espécie *C. cucumerinum* baseando-se em suas características macroscópicas e microscópicas. Essas amostras fúngicas foram cultivadas em meio Sabouraud-Dextrose-Agar (SDA) para renovação da colônia, e posteriormente inoculadas em meio ágar-leite para análise proteolítica. Durante 6 dias consecutivos, mediu-se com o auxílio de uma régua milimetrada os respectivos valores de diâmetro do halo de degradação e do crescimento da colônia fúngica, que foram posteriormente inseridos na fórmula de Índice de Relação Enzimática (IRE). A detecção de halo de degradação no meio confirmou a produção de protease pelo fungo. O isolado de *C. cucumerinum* atingiu índice enzimático máximo de 2,4 no período de 48 horas, denotando alta produção enzimática em curto período de tempo, e apresentou índice enzimático final igual a 2,0, o que o caracterizou como excelente produtor dessa enzima, sugerindo sua possível aplicabilidade em processos biotecnológicos.

**Palavras-chave:** Fungos anemófilos; Enzima; *Cladosporium*; Biotecnologia.

### INTRODUÇÃO

O Reino dos fungos abrange uma vasta diversidade de seres que detêm de grande importância ecológica, atuando de forma parasita – causando doenças em humanos, animais e plantas – ou de forma simbiótica, facilitando a absorção de minerais pelas plantas ao se associar às suas raízes, formando as chamadas micorrizas. Denominados cosmopolitas por estarem presentes nos mais diversificados ambientes, grande parte desses seres utilizam o ar

---

<sup>1</sup>Pesquisador bolsista do Instituto Federal de Pernambuco (IFPE – campus Recife), [larysse.mat@gmail.com](mailto:larysse.mat@gmail.com);

<sup>2</sup>Professora co-orientadora, Faculdade de Odontologia de Pernambuco (FOP/UPE) [eslyra2005@yahoo.com.br](mailto:eslyra2005@yahoo.com.br);

<sup>3</sup>Professor co-orientador, Instituto Federal de Pernambuco (IFPE – campus Pesqueira), [lindebergrocha@pesqueira.edu.br](mailto:lindebergrocha@pesqueira.edu.br);

<sup>4</sup>Professor Orientador, Doutor, Instituto Federal de Pernambuco (IFPE – campus Recife), [franciscobraga@recife.ifpe.edu.br](mailto:franciscobraga@recife.ifpe.edu.br)

como via mais eficaz para dispersão de suas estruturas reprodutivas, os esporos, o que os classifica como anemófilos (ALEXOPOULOS et al., 1960).

Dentre os organismos integrantes desse grupo, o gênero *Cladosporium* é um dos mais frequentes em ambientes fechados e climatizados, principalmente em climas temperados. Sua prevalência anemófila ocorre devido ao pequeno tamanho de seus esporos, que se destacam facilmente das hifas e são adaptados a se espalharem por largas distâncias (ZOPPAS; VALENCIA-BARRERA; FERNANDÉZ-GONZÁLES, 2011; DE VRIES, 1952).

O *Cladosporium sp* é frequentemente retratado na literatura como contaminante agrícola (ZITTER; HOPKINS; THOMAS, 1996), além de figurar como aproveitador em organismos imunodeprimidos (CUÉLLAR; DE LEÓN, 2013; ESPINEL-INGROFF et al., 1996) e atuar na biorremediação de hidrocarbonetos no ambiente (MEGIOLARO et al., 2016). Geralmente, as enzimas são compostos integrantes fundamentais na dinâmica dos eventos citados. Portanto, sendo o *Cladosporium sp* agente ativo nesses processos, é preconceituado seu alto potencial de produção enzimático.

Enzimas são catalisadores naturais, agindo na degradação de substratos e em transformações químicas – quando em seu estado endógeno – e, em menor porcentagem, estão presentes de forma exógena, sendo secretadas para fora da membrana plasmática (PELCZAR et al., 1996; ZANOTTO, 2003). As enzimas microbianas recebem maior interesse comercial graças à capacidade de manipulação genética desses seres e o baixo custo de produção enzimática, que ocorre em larga escala e em curto período de tempo. As enzimas proteases são muito úteis à indústria farmacêutica – principalmente na elaboração de produtos cicatrizantes –, à alimentícia, e como via mais ecologicamente viável no tratamento do couro e na composição de detergentes (RAO et al., 1998).

A fim de possibilitar o aproveitamento comercial da produção enzimática de seres microbiológicos, faz-se necessária a coleta, isolamento, identificação e experimentação científica desses seres conquanto à avaliação de sua potencialidade na produção da enzima desejada; selecionando, portanto, os organismos que apresentem os melhores resultados (ZANOTTO, 2003).

## **METODOLOGIA**

### **Local de realização da pesquisa**

A pesquisa foi realizada no Ambulatório e no Laboratório de Biologia do IFPE – campus Recife.

### **Isolamento e Identificação das amostras fúngicas**

O fungo foi coletado por sedimentação de esporos presentes no ambiente aéreo do Ambulatório do IFPE – *campus* Recife, em placas de petri com meio de cultura Sabouraud-Dextrose-Agar (SDA), e armazenado no Laboratório de Biologia do *campus*. As amostras foram identificadas ao nível de espécie de acordo com a análise das características macroscópicas (visualização a olho nu) e microscópicas (microscopia ótica) da colônia. Para possibilitar a análise microscópica mais detalhada, realizou-se a técnica de microcultivo. As características observadas foram comparadas com as expostas na literatura de (DE VRIES, 1952

### **Atividade Proteolítica**

Foram inoculados diâmetros de colônias jovens, medindo aproximadamente cinco milímetros, em placas de Petri contendo meio proteolítico composto por 500 mL de leite desnatado, 500 mL de água destilada e 10 g de ágar-ágar; segundo SARATH et al. (1989) em cinco repetições, para respectiva análise da protease. Durante o preparo do meio, o leite desnatado não passou por processo de autoclavagem a fim de evitar a desnaturação da caseína em situação de alta pressão e temperatura. As leituras das placas foram realizadas a cada 24 horas durante seis dias e o diâmetro de crescimento do fungo e do halo foram mensurados com o auxílio de uma régua milimetrada

Para determinação da atividade enzimática, os dados contabilizados foram inseridos no Índice de Relação Enzimática ( $IRE = D/d$ ), em que D corresponde à soma do diâmetro total da colônia com o diâmetro do halo de degradação e d equivale ao diâmetro da colônia sem o halo.

### **DESENVOLVIMENTO**

O gênero *Cladosporium* está inserido na categoria de fungos dematiáceos ou melanizados, denominados assim pela presença de pigmento melanina em suas membranas plasmáticas protegendo-os da irradiação solar e lhes conferindo maior resistência a ambientes com situações inóspitas. Além da alta capacidade de digestão de proteínas epidérmicas que essa característica os confere, causando lesões e facilitando a atuação desse fungo filamentosos como infectante em indivíduos imunodeprimidos (CUÉLLAR; DE LEÓN, 2013; ESPINEL-INGROFF et al, 1996)

Foi reconhecido o potencial dos fungos melanizados na biorremediação de hidrocarbonetos no ambiente, graças à sua alta resistência aos mais variados tipos de ecossistemas. No estudo de Megiolaro et al. (2016), *Cladosporium sp* apresentou uma das maiores taxa de degradação desses compostos orgânicos.

O gênero *Cladosporium* é comumente retratado como parasita agrícola, causando desastres significativos, como a grave destruição causada pela sarna de curcubitáceas causada pelo *Cladosporium cucumerinum* em lavouras da Finlândia, como foi reportado por Linnasalmi (1947). Descreve-se nesse acontecimento a rapidez com que ocorreu a contaminação de uma grande quantidade de plantações. A sarna causada por *Cladosporium cucumerinum* acomete abóboras, melão, melancia e curcubitáceas, principalmente em situação de alta umidade e clima ameno; atualmente não há medidas existentes de eliminação do problema em culturas afetadas, apenas medidas profiláticas que previnam a contaminação inicial (VIANA et al., 2001).

Há uma vasta investigação sobre a relação da protease e outras enzimas no fator de virulência fúngica. Algumas pesquisas constataam uma relação direta entre esses fatores, tal como a de Ball (1981), que reporta a eliminação da virulência de fungos *Phytophthora brassicae* de mutação induzida que causa a interrupção da produção de protease; entretanto, ao terem a capacidade enzimática restaurada, esses organismos voltam a ser patógenos potenciais.

Todavia, Robertsen (1984) demonstrou que a enzima protease não interfere na taxa de virulência do *C. cucumerinum* ao não constatar diferença entre uma variedade mutante desse fungo, que não possui atividade proteolítica, em relação a sua forma não mutante, produtor de protease, no critério de patogenicidade em curcubitáceas.

Mesmo não atuando no poder de contaminação do *Cladosporium cucumerinum*, a protease produzida por esse fungo pode ser extraída para o aproveitamento industrial, sendo importante no desenvolvimento de fármacos cicatrizantes, em etapas fermentativas da indústria alimentícia e na composição de detergentes (RAO et al, 1998).

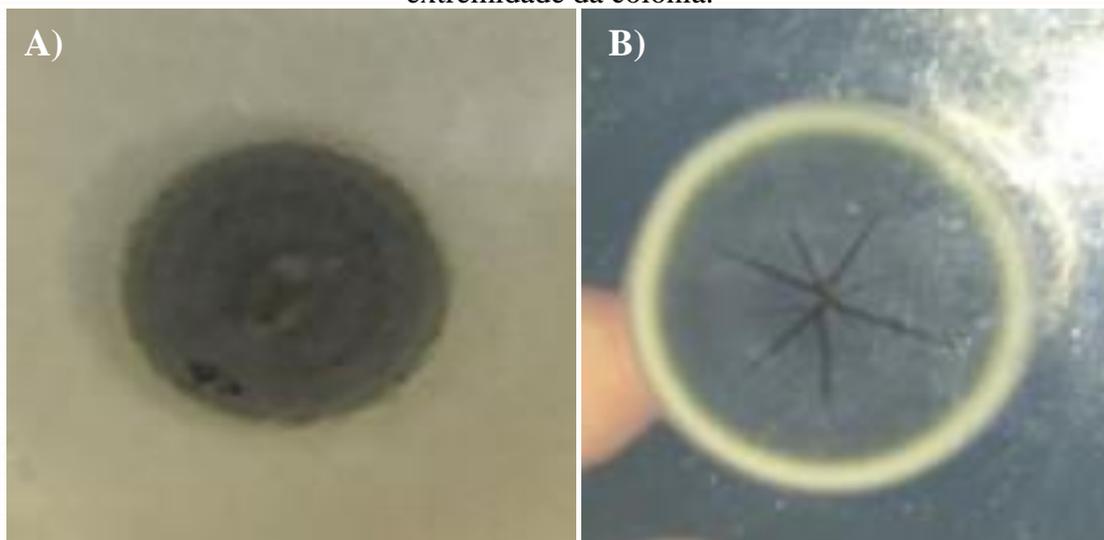
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Identificação

Atráves da observação das características macroscópicas e microscópicas, o isolado AMB 11 foi identificado com *Cladosporium cucumerinum* por apresentar colônia de coloração

verde pálida, que é pulverosa no início do crescimento, reverso verde escuro, muito próximo a preto, envolto por circunferência de coloração branca (Figura 1).

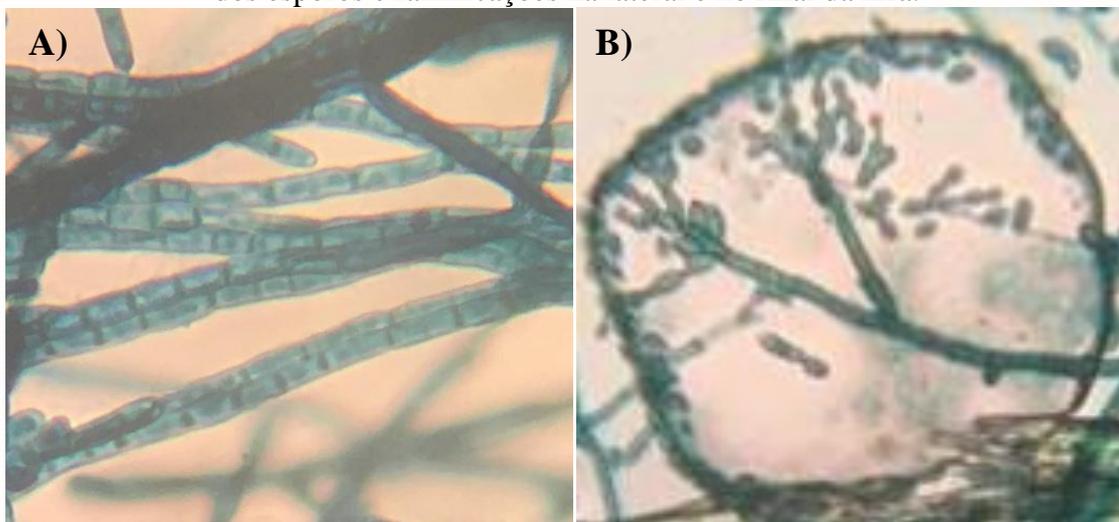
**Figura 1:** Macromorfologia da colônia de *Cladosporium cucumerinum* com 4 dias de crescimento em SDA a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ : a) reverso; b) verso com circunferência branca na extremidade da colônia.



Fonte: autor

Microscopicamente, o fungo apresentou hifas septadas regularmente e com ramificações laterais e localizadas na ponta final da hifa principal; seus esporos são limoniformes (possuem formato de limão) e destacam-se facilmente das hifas, sendo assim, só são passíveis à análise microscópica a partir da realização da técnica de microcultivo (Figura 2).

**Figura 2:** Micromorfologia de *C. cucumerinum*: a) hifas septadas; b) formato limoniforme dos esporos e ramificações na lateral e no final da hifa.



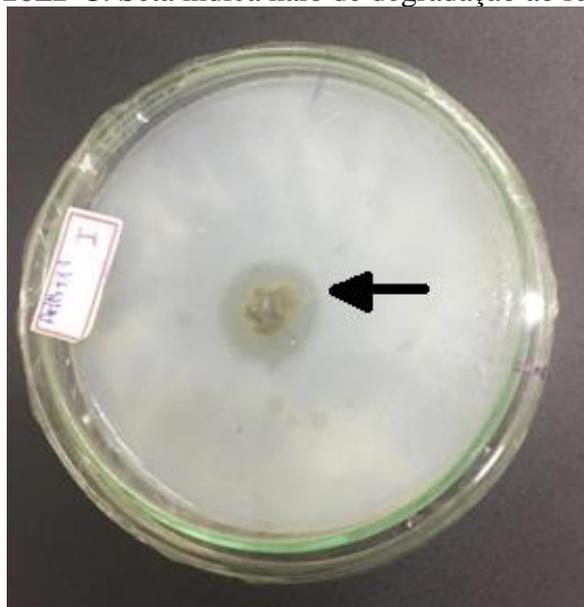
Fonte: autor

As características citadas, quando comparadas com as expostas por De Vries (1952), são muito semelhantes entre as espécies *Cladosporium cladosporioides* e *C. cucumerinum*, entretanto foi possível diferenciá-los em relação ao tempo de crescimento, que é mais lento no *C. cucumerinum* em relação ao *C. cladosporioides*.

### Atividade Protelítica

A atividade enzimática foi considerada positiva através da observação de halo translúcido ao redor da colônia fúngica inoculada no meio proteolítico (figura 3), indicando que, naquela área, houve degradação da caseína láctea – que confere a coloração esbranquiçada do meio – pela protease produzida pelo fungo estudado.

**Figura 3:** Colônia de *Cladosporium cucumerinum* em meio ágar leite com 2 dias de crescimento a  $28\pm 2^\circ\text{C}$ . Seta indica halo de degradação ao redor da colônia.



Fonte: autor

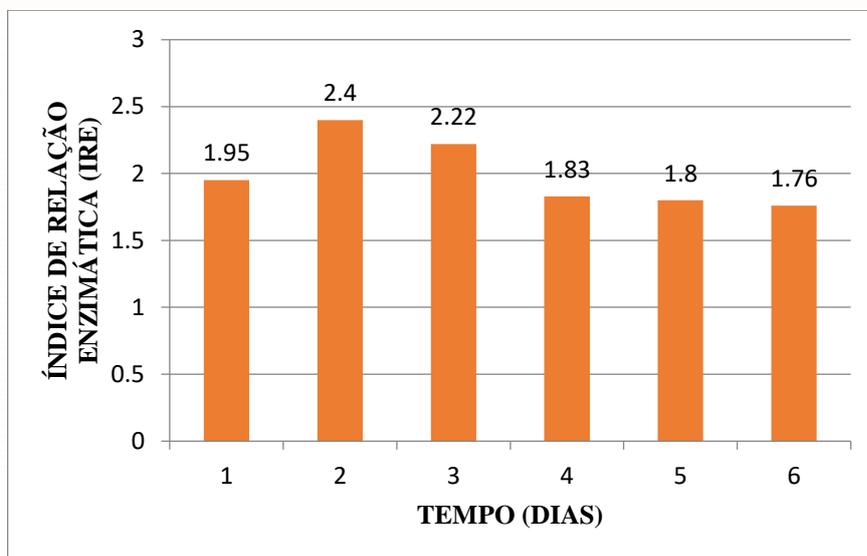
Quanto à análise da atividade proteolítica, O índice de relação enzimático (IRE) do isolado analisado atingiu o valor de 2,4 já no segundo dia de crescimento (Gráfico 1), o que evidencia-se a capacidade de produção de altas quantidades de protease em um curto período de tempo pelo *Cladosporium cucumerinum*. De acordo com Lealem e Gash (1994), nosso isolado fúngico pode ser classificado como um excelente produtor enzimático. Os dados de índice enzimáticos apresentados em nossos estudos são superiores aos obtidos por Silva et al. (2011) ao avaliar a atividade proteolítica de diversas espécies de *Cladosporium* coletados do solo agroflorestal. Esses autores encontraram para *Cladosporium cladosporioides* valor de IRE=1,33 e, portanto, inferior ao valor do *C. cucumerinum* que consta no presente trabalho.

(83) 3322.3222

contato@conapesc.com.br

www.conapesc.com.br

**Gráfico 1:** Média dos valores diários de IRE do *Cladosporium cucumerinum*.

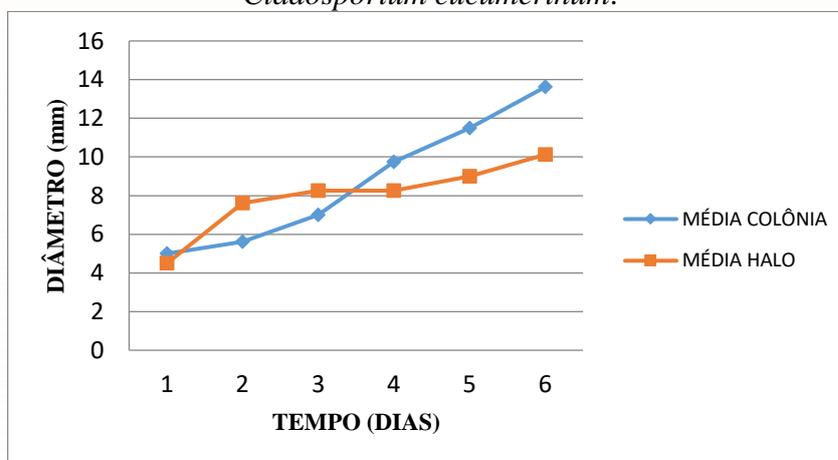


Fonte: autor

Comparando-se os valores de IRE, o potencial proteolítico do *C. cucumerinum* avaliado no presente trabalho é superior ao do *C. cladosporioides* isolado de amendoim, e menor em relação ao *C. cladosporioides* isolado do ambiente de maturação de queijos, ambos potenciais obtidos por Fernandes (2009) ao caracterizar quantitativamente a atividade enzimática de fungos provenientes de fontes diversas. Percebe-se, pela obtenção de índices de relação enzimática diferentes para uma mesma espécie, que o ambiente de permanência do fungo está relacionado com sua potencialidade de produção enzimática.

Segundo Chellappan et al. (2006), há diversas variáveis que interferem na taxa de produção enzimática fúngica. Considerando-se o valor de temperatura constante, uma das hipóteses para a diminuição da taxa de crescimento do halo, que pode ser observada a partir do terceiro dia no gráfico 2, é a alteração do pH do meio utilizado. Robertsen (1984) avalia a protease excretada pelo *C. cucumerinum* como alcalina, apresentando maior produção em meio líquido pectinase e gelatinase de pH 8,9. Em escala industrial, o problema pode ser contornado com o uso de tampões químicos que impeçam alterações bruscas do pH do meio utilizado.

**Gráfico 2:** Médias diárias dos valores de diâmetro do halo e diâmetro das colônias de *Cladosporium cucumerinum*.



Fonte: autor

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, a amostra fúngica AMB 11 coletada do ambiente aéreo do ambulatório localizado no IFPE – *campus* Recife foi analisada de acordo com suas características macroscópicas e microscópicas, sendo identificada como pertencente à espécie *Cladosporium cucumerinum*. O cultivo desse microorganismo em meio sólido protéico constituído de ágar leite à temperatura de  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  sob regime de alternância luminosa foi bem sucedido, havendo ocorrência de halo de degradação ao redor da colônia fúngica.

O potencial enzimático do isolado testado determinado pelo IRE foi equivalente a 2.0, caracterizando a alta produção de protease pela espécie *C. cucumerinum* em curto período de tempo, uma vez que  $\text{IRE} > 2$  foi observado já no segundo dia de cultivo. O *Cladosporium cucumerinum*, portanto, pode ser plenamente aproveitado para a produção enzimática com fins industriais e biotecnológicos.

## REFERÊNCIAS

ALEXOPOULOS, C.J., MIMS, C.W. & BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. (4th ed.) John Wiley, Nova York 1996.

BALL, A. M.; ASHBY, A. M.; DANIELS, M. J.; INGRAM, D. S.; JOHNSTONE, K. Evidence for the requirement of extracellular protease in the pathogenic interaction of *Pyrenopeziza brassicae* with oilseed rape. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 38, n. 2, p. 147-161, fevereiro, 1991.

CHELLAPPAN, S.; JASMIN, C; BASHEER, S.; ELYAS, K.K.; BHAT, Sarita; MUTHUSAMY, C. Production, purification and partial characterization of a novel protease

from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 4, p. 956–961, abril, 2006.

CUÉLLAR, L. E.; DE LEÓN, P. Infecciones en huéspedes inmunocomprometidos Infections in immunocompromised hosts. **Rev Med Hered. Rev Med Hered**, v. 24, n. 24, p. 156–161, 2013.

DE VRIES, G.A. **Contribution to the knowledge of the genus *Cladosporium* Link** ex Fr. Baarn: Uitgeverij & Drukkerij, 1952.

ESPINEL-INGROFF, A.; SHADOMY, S.; DIXON, D.; GOLDSON, P. Exoantigen test for *Cladosporium bantianum*, *Fonsecaea pedrosoi* and *Phialophora verrucosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 305-310, 1986.

FERNANDES, A.P. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

LINNASALMI, A.. On the control of cucumber scab (*Cladosporium cucumerinum* Ell. & Arth.). **Maataloustieteellinen aikakauskirja**, v. 19, n.1, p. 124-128, 1947.

LEALEM, F.; GASHE, B.A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef. (*Eraglostis tef.*). **J. Appl. Bacteriol**, v. 77, n. 1, p.348-352, 1994.

MEGIOLARO, F. **Potencial biotecnológico de fungos melanizados na degradação e assimilação de hidrocarbonetos**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência e Biotecnologia), Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus Videira.

PELCZAR JR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. Tradução de Sueli Yamada, Tania Ueda Nakamura, Benedito Prado Dias Filho. Revisão técnica de Celso Vataru Nakamura. São Paulo: Makron Books, v. 1, n.2, 1996.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**, v. 62, n. 3, p. 597–635, 1 set. 1998.

ROBERTSEN, B. An alkaline extracellular protease produced by *Cladosporium cucumerinum* and its possible importance in the development of scab disease of cucumber seedlings. **Physiological Plant Pathology**, v. 24, n. 1, p. 83-92, 1984

ROLSTON, K.V.; RUBENSTEIN, E.B., editors. **Textbook of febrile neutropenia**. Martin Dunitz Ltd, Londres. 2001.

SARATH, G.; DE LA MOTTE, R.S.; WAGNER, F.W. **Protease assay methods**. In: BEYNON, R.J.; BOND, J.S. (eds). Proteolytic enzymes: a practical approach. University Press, Oxford.1989, p. 25-54.

SILVA, D. C. V. DA; TIAGO, P. V.; MATTOS, J. L. S. DE; PAIVA, L. M.; SOUZA-MOTTA, C. M. DE. Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas

agrofloretais do Município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 34, n. 4, p. 607-610, out – dez 2011

VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A . DOS; FREIRE, F. DAS C. O.; CARDOSO, J. E.; VIDAL, J. C. **Recomendações para o controle das principais doenças que afetam a cultura do melão na região Nordeste. Fortaleza.** Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. (Embrapa Agroindústria Tropical. Circular Técnica, 12)

ZANOTTO, S. P. **Utilização de enzimas e microrganismos para a obtenção de compostos oticamente ativos.** 2003. Tese (Doutorado em Engenharia química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ZITTER, T.A.; HOPKINS, D.L.; THOMAS, C.E. Compendium of cucurbit diseases. Saint Paul MN. **American Phytopathological Society**, 1996.

ZOPPAS, B.C.A.; VALENCIA-BARRERA, R.M.; FERNANDÉZ-GONZÁLES, D. Distribuição de esporos de *Cladosporium spp* no ar atmosférico de Caxias do Sul, RS, Brasil, durante dois anos de estudo. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 34, n. 2, p. 55-58, 2011.