



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE TECNOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

JUCILENE PEREIRA DE SOUSA

**PROSPECÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL (CELULASE E
AMILASE) A PARTIR DE FUNGOS ISOLADOS DA CAATINGA, SEMIÁRIDO
PARAIBANO**

SUMÉ-PB

2014

JUCILENE PEREIRA DE SOUSA

**PROSPECÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL (CELULASE E
AMILASE) A PARTIR DE FUNGOS ISOLADOS DA CAATINGA, SEMIARIDO
PARAIBANO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Glauciane Danusa Coelho

SUM-PB

2014

S725p

Sousa, Jucilene Pereira de.

Prospecção de enzimas de interesse industrial (celulase e amilase) a partir de fungos isolados da caatinga, Semiárido Paraibano. / Jucilene Pereira de Sousa. - Sumé - PB: [s.n], 2014.

50 f.

Orientadora: Professora Dra. Glauciane Danuza Coelho.

Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Biotecnologia. 2. Atividade enzimática. 3. Identificação de fungos. 4. Microorganismos. I. Título.

CDU: 60(043.3)

JUCILENE PEREIRA DE SOUSA

PROSPECÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL (CELULASE E
AMILASE) A PARTIR DE FUNGOS ISOLADOS DA CAATINGA, SEMIÁRIDO
PARAIBANO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal De Campina Grande, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

BANCA EXAMINADORA

Glauciane D. Coelho Nota (10,0)

Orientadora

Prof. Dr^a Glauciane Danusa Coelho

Jean César F. Queiroz Nota (10,0)

Examinador 01

Prof. Dr^a Jean César Farias de Queiroz

Simone Aparecida da S. Lins Nota (10,0)

Examinador 02

M. Sc. Simone Aparecida da Silva Lins

Nota final (média)

Nota (10,0)

Aprovado em 29 de agosto de 2014.

*Aos meus queridíssimos pais, **Juscelino**, este que me passou ensinamentos para tornar-me uma pessoa de moral e de boa conduta com sua seriedade e jeito reservado, e a **Gorete**, a mulher da minha vida, que sempre me mostra o caminho certo que devo seguir e com seus conselhos e “colo de mãe” que tanto me conforta. O que eu sou agradeço a vocês e minhas conquistas vos concedo.*

“O amor que recebo de vocês é como energia”.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, fé e sabedoria para a concretização desse trabalho.

Aos meus amadíssimos pais, Juscelino e Gorete, por sempre terem acreditado em mim, apoiado em todos os momentos e por todo esforço que sempre tiveram pra que eu pudesse estudar. São seres enviados por Deus, os amo infinitamente.

Ao meu amado Marcos Levi, por todo amor a mim dedicado, pelo companheirismo, amizade, “patrocínio”, paciência e por ter dividido comigo cada momento de alegria e de dificuldade. Amo você.

Ao meu irmão Janailson, este que me ajudou imensamente durante esses cinco anos de curso, tanto financeiramente quanto como “motorista”, sempre com muito carinho e sem estresses. E, também, ao meu outro irmão Jucedy pelas ajudas financeiras sempre que recorri a ele e pelo amor fraterno.

As minhas irmãs Janaína, minha dor se torna dor pra ela também, e Jucedilma, por todo o carinho e conselhos a mim dedicados. O amor que tenho por vocês é infinitamente belo. Ter irmã é um presente de Deus, pois é ter amigas dentro de casa, só quem tem sabe o valor.

Ao meu pequeno Gabriel pelos momentos de descontração, o amor é grande demais.

A minha tia Verônica “Quinha”, por se fazer muito presente na minha vida, muitas vezes me ajudando, e ser motivo de muitas risadas. Quero muito bem.

Aos meus queridos avós maternos Vovô Nivaldo e Vóiza (Luiza) e meus avós paternos Vovô Paulino (*in memorian*) e Vómira (Zumira – *in memorian*). Penso em vocês, vejo o amor.

A família Simões que sempre me acolheram com muito amor, quer seja no estágio ou em outras ocasiões.

A todos meus familiares pelo apoio incondicional, estes que sofrem e comemoram junto.

A minha família de Três, como ficou conhecida nossa relação, Leandro e Rayza. Estes foram mais do que amigos nesses cinco anos de curso, pois só nós sabemos o que compartilhamos durante esse tempo, mas é como a gente sempre diz: “*Ainda bem que a gente tem a gente*”.

As minhas engenheiras gatas Bruna, Dayse, Raíssa, Rhyanne, Mila, Renally e Rayza pelos conselhos, risadas, viagens e pela boa companhia. Vocês jamais serão esquecidas, é como eu sempre digo “*vou morrer de saudades*”.

Aos meus companheiros de projeto Bruna e Marreiro pela ciência compartilhada. Foi bastante proveitoso trabalhar com vocês, não é à toa que o nosso trabalho gerou tantos frutos.

Ao meu G11, “*Biotec Pioneira*”, Bruna, Dayse, Felipe, Marreiro, Mila, Leandro, Raíssa, Rayza, Renally e Rhayanne, vocês fizeram à diferença no meu curso. Amo vocês.

Ao Seu Baú e Dona Eliane, Dona Sônia e Luciano, pelo carinho e pelas caronas.

A Dona Damiana pelo carinho.

A Deivid e Isabela, que apesar de terem migrado para outros cursos, foram meus primeiros amigos na universidade e tenho um enorme carinho.

A Azenate, Cleidinha, Mariana e Rodrigo amigos que dividimos a mesma casa e que passamos por muita coisa juntos. Vocês jamais serão esquecidos.

Aos técnicos do laboratório, Adriano e Paloma, pelo apoio e carisma na realização das atividades no laboratório e Cristiano, porteiro do laboratório, pela paciência e carisma.

A Simone Lins por todo o conhecimento adquirido, pela paciência e pelo carinho. Uma pessoa incrível.

A Jean Queiroz, pois foi mais do que um professor, um amigo.

A todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica.

A minha querida coordenadora de TCC Glauciane Danusa pela orientação e por nunca deixar me abater, sempre com palavras de otimismo e me ensinando a adquirir “Inteligência Emocional”. És muito especial.

A coordenadora de curso Fabiana Pimentel, a qual também já coordenou projeto de pesquisa que participei. Agradeço por todo aprendizado e conselhos, foi mais que uma coordenadora. O carinho que tenho é incondicional.

A Universidade Federal de Campina Grande, ao Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido e à Central de Laboratórios que permitiram a realização deste trabalho.

A cidade de Sumé-PB pela acolhida durante os cinco anos de curso, cidade esta que acabei amando e criando fortes laços. É como diz a música: “*Só deixo o meu Cariri no último pau-de-arara*”.

É magnífico passar por essa jornada e ter tanto a agradecer e querer a tantos homenagear...

*Sou um pouco de todos que conheci,
um pouco dos lugares que fui,
um pouco das saudades que deixei,
sou muito das coisas que gostei.
Entre umas e outras errei,
entre muitas e outras conquistei.*

Ramon Hasman

RESUMO

O trabalho teve como objetivo realizar a prospecção das enzimas celulase e amilase a partir de fungos isolados no Semiárido Paraibano e depositados na Coleção de Fungos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido/Universidade Federal de Campina Grande (CDSA/UFCG), por este ser um ambiente extremo, representando uma estratégia para se conhecer a diversidade enzimática de organismos que correm o risco de extinção devido ao intenso processo de desertificação. As análises foram realizadas a partir de 50 isolados da referida coleção, dos quais 23 não apresentaram crescimento e 27 apresentaram crescimento em meio BDA. Estes 27 foram submetidos à análise da produção enzimática de amilase e celulase total (FPase), em que 10 (37,04 %) apresentaram atividade amilolítica e 14 (51,85 %) atividade FPase. A partir da otimização da produção enzimática sob dois meios distintos, Meio I (composto de ¼ da quantidade de batata para o meio BDA) e Meio II (composto apenas de Agar e a fonte de carbono indutora), verificou-se que os melhores resultados foram obtidos em Meio II tanto para amilase quanto para FPase. Os maiores valores de Índice Enzimático (IE) para amilase, em Meio II, foram dos isolados CDSA 09 com IE de 3,60 e CDSA 18 com IE de 3,67. Na atividade de FPase, foi verificado um elevado potencial em que todos os isolados em Meio II tiveram $IE \geq 2$, destacando-se os isolados CDSA 06, CDSA 12, CDSA 20 e CDSA 69, todos com IE acima de 6. Em Meio I apenas o CDSA 24 apresentou IE de 2 para atividade FPase, os outros isolados exibiram valores inferiores tanto pra FPase quanto amilase. Em relação à velocidade de crescimento o destaque foi dos isolados CDSA 23, CDSA 54 e CDSA 12, que tomaram toda placa de *Petri* no período de 144 horas (6 dias). Com a técnica de microcultivo foi possível a identificação de 88,89 % dos isolados, com 83,33 % pertencentes ao gênero *Aspergillus* e 5,56 % ao gênero *Penicillium*, sendo estes considerados como bons produtores das enzimas em estudo. A prospecção de enzimas a partir de microorganismos isolados da Caatinga, Cariri Paraibano, é de extrema valia para que seja revelada a biodiversidade microbiana desta região que ainda é pouco explorada.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade enzimática. Biotecnologia. Identificação de fungos. Microorganismos.

ABSTRACT

The production of amylases and cellulases by fungi was studied. The fungi were isolated on the Paraíba's Semiarid and it were deposited in Coleção de Fungos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido/Universidade Federal de Campina Grande (CDSA/UFCG). The Paraíba's Semiarid is an extreme environment and this study represents a strategy to know the enzymatic diversity of organisms at risk of extinction due to the intense desertification process. Analyses were performed from 50 isolates of the collection, in which 23 showed no growth and 27 showed growth on PDA, these last fungi were used for verification of enzymatic activities. Ten fungi (37.04 %) showed amylolytic enzymatic activity and fourteen fungi (51.85 %) showed FPase enzymatic activity. Two medium culture based on BDA medium culture was utilized to optimization of production of amylases and whole cellulase after of verification of enzymatic activities. The second medium culture constituted only of agar and the carbon source (Meio II) showed good results of enzymatic index (IE) to the amylolytic enzymatic activity, in which CDSA 09 showed IE of 3.60 and CDSA 18 of 3.67. All fungi showed $IE > 2$ for FPase in Medium II, highlighting the CDSA 06, 12 CDSA, CDSA 20, and CDSA 69 with $IE > 6$. The CDSA 24 was the only fungus $IE \geq 2$ for FPase in medium composed of $\frac{1}{4}$ potatoes and other components of the PDA medium culture (Meio I). The other fungi evaluated Meio I showed $IE < 2$ for amylase and FPase. The microculture technique allowed the identification of 88.89 % of the isolates, with 83.33 % belonging to the genus *Aspergillus* and to *Penicillium* genus 5.56 %, which are considered good producers of studied enzymes. Prospecting for enzymes of microorganisms isolated from the Caatinga, Paraíba's Cariri, is extremely important to know the microbial biodiversity of this region that still underexplored.

KEYWORDS: Biotechnology. Enzyme activity. Identification of fungi. Microorganisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Constituição do Semiárido Brasileiro	16
Figura 2 – Complexo Lignocelulósico da parede celular vegetal	21
Figura 3 – Representação da (A) amilose e (B) amilopectina	24
Figura 4 – Localização de Sumé-PB	27
Figura 5 – Metodologia Castellani	28
Figura 6 – Técnica de Microcultivo para análise de fungos filamentosos	30
Figura 7 – Representação do CDSA 09 e CDSA 18 com atividade amilolítica	35
Figura 8 – Representação do halo de degradação de FPase pelo CDSA 24 em Meio I ...	37
Figura 9 – Representação do CDSA 07 e CDSA 20 com atividade FPase	38
Figura 10 – Estrutura macroscópica e microscópica do CDSA 01, CDSA 09 e CDSA 69	41
Figura 11 – Estrutura macroscópica e microscópica do CDSA 06, CDSA 07, CDSA 17, CDSA 18, CDSA 20, CDSA 21, CDSA 22, CDSA 66.....	42
Figura 12 – Estrutura macroscópica e microscópica do CDSA 23, CDSA 24, CDSA 56 e CDSA 65	43
Figura 13 – Representação do CDSA 12 exibindo suas estruturas (a) microscópicas no período de 48 horas e (b) macroscópicas	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fungos com potencial para produção de amilase	26
Tabela 2 – Composição do meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) utilizado na manutenção das culturas	28
Tabela 3 – Fonte de carbono que substitui a dextrose para a determinação das atividades enzimáticas	29
Tabela 4 – Reativação dos 50 isolados	31
Tabela 5 – Índice Enzimático (IE) para as atividades de celulase e amilase.....	32
Tabela 6 – Índice Enzimático (IE) para amilase sob dois meios de cultura distintos	34
Tabela 7 – Índice Enzimático (IE) para FPase sob dois meios de cultura distintos	36
Tabela 8 – Crescimento Fúngico (cm) em meio BDA.....	39
Tabela 9 – Valor do crescimento diário dos isolados	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA	Batata Dextrose Ágar
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CDSA	Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido
IE	Índice Enzimático
Meio I	meio de cultura composto de ¼ da quantidade de batata para o meio BDA
Meio II	meio de cultura composto apenas de Agar e a fonte de carbono indutora
T	tempo
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
V	Velocidade instantânea de crescimento fúngico

LISTA DE SÍMBOLOS

\varnothing_c	Diâmetro médio da colônia
\varnothing_f	Diâmetro da colônia
\varnothing_h	Diâmetro médio do halo de degradação
*	Isolados que apresentarem melhores resultados

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3.1 REGIÃO SEMIÁRIDA.....	16
3.2 BIOPROSPECÇÃO ENZIMÁTICA A PARTIR DE FUNGOS	17
3.3 INDÚSTRIA DE ENZIMAS	18
3.4 PANORAMA DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA NO BRASIL.....	19
3.5 ENZIMAS CELULOLÍTICAS	20
3.5.1 Material lignocelulósico	20
3.5.2 Aplicação Industrial das Enzimas celulolíticas	22
3.6 ENZIMAS AMIOLÍTICAS	23
4 METODOLOGIA	27
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	27
4.1.1 Manutenção dos Isolados	27
4.1.2 Reativação das Culturas	27
4.2 PROSPECÇÃO ENZIMÁTICA DE CELULASE TOTAL (FPase) E AMILASE	28
4.3 ÍNDICE ENZIMÁTICO.....	29
4.4 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA	29
4.5 VELOCIDADE DE CRESCIMENTO DOS ISOLADOS	29
4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS	30
4.6.1 Técnica de Microcultivo	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 REATIVAÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS	31
5.2 DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS.....	32
5.3 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA EM MEIO SÓLIDO	33
5.3.1 Atividade Amilolítica	33
5.3.2 Atividade de Fpase (Celulase Total)	35
5.4 VELOCIDADE DE CRESCIMENTO DOS ISOLADOS	38
5.5 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS	40
6 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país favorecido devido à enorme quantidade e variedade de matérias-primas renováveis passíveis de serem transformadas, apresentando a maior biodiversidade do planeta de fonte de biocatalisadores. O semiárido que faz parte do bioma brasileiro Caatinga, tem uma enorme diversidade em microorganismo, porém com suas espécies pouco conhecidas. A Caatinga apresenta um acentuado processo de desertificação, ocasionado, principalmente, pelo desmatamento e uso inadequado dos recursos naturais, o qual resulta na redução de produção vegetal e mudanças nas interações que ocorrem no solo, com a consequente e muitas vezes irreversível perda da biodiversidade (SKUJINŠ; ALLEN, 1986).

O conhecimento da biodiversidade e bioprospecção de novos microorganismos tornaram-se um dos focos principais da era biotecnológica, visto que a utilização destes organismos na busca de soluções nas áreas de alimento, saúde, meio ambiente e indústria vêm crescendo de forma acelerada no atual cenário mundial.

Frente a isso, a produção de enzimas é um vasto campo de estudo quando se trata de processos biotecnológicos. Esses biocatalisadores possuem características particulares pela sua alta eficiência em condições fisiológicas e alta especificidade. Este potencial catalítico é utilizado industrialmente, não só nos clássicos processos fermentativos, mas também em processos de biotransformações microbianas para a catálise de reações químicas de difícil ocorrência e de grande importância industrial (PEREIRA JÚNIOR; BON; FERRARA, 2008).

As enzimas podem ser derivadas de diversas fontes, incluindo plantas, animais e microorganismos, porém as enzimas microbianas geralmente atendem com maior eficácia às demandas industriais, constituindo-se como uma alternativa barata para sua produção, visto que requerem condições mínimas de nutrição e manutenção, além de secretarem as enzimas para o meio extracelular (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Devido às características tão peculiares do Semiárido Paraibano, a prospecção de organismos, assim como de enzimas de interesse industrial se faz necessário e representa um setor bastante promissor, visto que é importante estudar e conhecer novas espécies de microorganismos produtores de enzimas com potencial biotecnológico, disponibilizando maior variedade e conhecimento para a produção de enzimas que vão de encontro às necessidades da indústria.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a prospecção de enzimas de interesse industrial a partir de fungos, isolados no Semiárido Paraibano e depositados na Coleção de Fungos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido/Universidade Federal de Campina Grande (CDSA/UFCG).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a capacidade dos fungos depositados na Coleção de Fungos do CDSA/UFCG de produzirem amilase e celulase;
- Calcular o índice de produção enzimática;
- Verificar a velocidade de crescimento dos isolados que apresentarem reação positiva para a amilase e celulase;
- Identificar os fungos produtores das enzimas estudadas.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 REGIÃO SEMIÁRIDA

As regiões áridas e semiáridas, que constituem cerca de 30 % da superfície da Terra, caracterizam-se por apresentar baixa precipitação e alta taxa de evaporação, que limitam a produtividade das culturas. O regime de chuvas, na região semiárida, concentrado num período de 3 a 4 meses por ano, é marcado por forte irregularidade interanual. As temperaturas médias variam de 23°C a 27°C e a insolação anual que chega aproximadamente 2.800 horas. Isto determina altas taxas de evapotranspiração, configurando déficit hídrico em quase toda a região (MATALLO JÚNIOR, 2000).

O Semiárido Brasileiro, Figura 1, abrange uma área de 969.589,4 km² e compreende 1.133 municípios de nove estados do Brasil: Alagoas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe. O Semiárido tem a maior parte do seu território coberto pela Caatinga, o qual é o único bioma exclusivamente brasileiro, rico em espécies endêmicas, isto é, que não habitam nenhum outro lugar do mundo. A composição florística da Caatinga não é uniforme e apresenta grande variedade de paisagens, de espécies animal e vegetal, nativas e adaptadas, com alto potencial e que garantem a sobrevivência das famílias agricultoras da região (ARTICULAÇÃO NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO, 2014).

Figura 1 – Constituição do Semiárido Brasileiro



Fonte: ARTICULAÇÃO NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO, 2014.

Apesar do vasto potencial em espécies, esse ambiente ainda é pouco estudado, devido, principalmente, ao desmatamento e uso inadequado dos recursos naturais. Essa região tem sofrido acentuado processo de desertificação, o qual acarreta na redução da produção vegetal, além de mudanças nas interações que ocorrem no solo, com a consequente, muitas vezes irreversível, perda da biodiversidade (SKUJIŇŠ; ALLEN, 1986).

Devido às características tão peculiares do semiárido paraibano, a prospecção de organismos, assim como de enzimas de interesse industrial se faz necessário e representa um setor bastante promissor, visto que é importante estudar e conhecer novas espécies de microorganismos produtores de enzimas com potencial biotecnológico.

3.2 BIOPROSPECÇÃO ENZIMÁTICA A PARTIR DE FUNGOS

A procura pelo desenvolvimento sustentável representa um dos maiores desafios para a humanidade. O modelo de desenvolvimento no país tem evoluído do extrativismo e da agricultura de subsistência para uma exploração agroindustrial intensa, até porque com a aplicação de tecnologias modernas e utilização desordenada dos recursos do ambiente, a biodiversidade tem sido colocada em risco (LOPES; NASS; MELO, 2005).

A conservação dos recursos genéticos do planeta, bem como sua exploração sustentável é de uma importância extrema. Em vários países do mundo estão sendo criados programas de bioprospecção, integrando universidades, institutos de pesquisas, indústrias, entre outros, para descobrimento e desenvolvimento de novos produtos (PALMA; YAMANE; CAMARGO, 2001). Quando se trata de “conservação ambiental” remete logo a biotecnologia e bioprospecção. Nisso, a bioprospecção tem sido entendida como pesquisas de recursos biológicos ou produtos derivados com finalidades de exploração comercial para diversos usos industriais, como química, farmacêutica e alimentar (AZEVEDO, 2003).

Os fungos representam recursos genéticos para utilização em diversos produtos e processos biotecnológicos (MELLO; REIS; SILVA, 2011), podendo ser utilizados para prospecção de enzimas. São seres heterotróficos e nutrem-se por absorção, reproduzindo-se sexuada ou assexuadamente, com diversas aplicações de interesse econômico como produção de enzimas, antibióticos, vitaminas, aminoácidos e esteroides (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996). Os fungos são seres eucarióticos altamente eficientes na degradação de uma ampla gama de substratos, podendo apresentar-se sob a forma leveduriforme, formar um pseudomicélio ou constituir hifas, que podem agrupar-se ou justapor-se, porém nunca formando um tecido verdadeiro. Constituem um grupo muito grande e heterogêneo encontrado virtualmente em qualquer nicho ecológico. Estima-se que existam cerca de 1,5

milhões de espécies de fungos, sendo que destas apenas foram descritas cerca de 70 mil espécies (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

De acordo com Hawksworth (2004), os fungos desempenham diversas funções ecológicas e apresentam uma ampla gama de comportamentos e interações, podendo ser decompositores ou saprófitos, parasitas, predadores, simbioses, mutualistas e comensais. Silva, P. (2007) relata que os saprófitos alimentam-se, geralmente, de matéria morta ou em decomposição, como folhas e outros detritos que se acumulam no solo, promovendo a clivagem biogeoquímica dos nutrientes que se tornam disponíveis para outros organismos. Os parasitas se alimentam de organismos e são responsáveis por doenças em plantas e animais como a ferrugem do milho e as micoses dentre outras. Outros fungos vivem como líquens, uma relação simbiótica muito estreita entre um fungo e um organismo fotossintético, ou como as micorrizas.

3.3 INDÚSTRIA DE ENZIMAS

Enzimas são proteínas produzidas pelos organismos vivos e atuam como catalisadores, isto é, tem a função de acelerar as reações bioquímicas vitais. Devem ser produzidas em grande número, em pouco tempo e com características específicas e desejadas para que possam ser utilizadas em um processo industrial (LOURENZONI *et al.*, 2012; TRIBST, 2013).

As enzimas são encontradas em abundância no corpo humano, em microorganismos, animais e vegetais, são usadas direta ou indiretamente pela humanidade há milhares de anos, porém com sua importância consolidada apenas em meados do século 19. No século 20, aumentou rapidamente o conhecimento sobre essa substância, sendo determinado seu mecanismo de ação e estrutura. A partir de então, tem aumentado o emprego de enzimas em diferentes processos industriais, abrangendo as áreas médica, alimentícia, têxtil, química, de papel e celulose, entre outras. Seu uso é positivo por serem substâncias naturais, não tóxicas, específicas para determinadas ações e por reduzirem a poluição ambiental (MUSSATTO; FERNANDES; MILAGRES, 2007).

Os nomes das enzimas em geral terminam em *ase*. Todas as enzimas podem ser agrupadas, com base no tipo de reação química que elas catalisam, em seis classes: *Oxidoreductase*: catalisam reações de transferência de elétrons, isto é, oxidação-redução em que oxigênio e hidrogênio são ganhos ou perdidos. *Transferase*: catalisam reações de transferência de grupos funcionais, como um grupo amino, grupo acetil ou grupo fosfato. *Hidrolase*: catalisam reações de hidrólise (adição de água). *Liase*: catalisam a quebra de

ligações covalentes e a remoção de moléculas de água. *Isomerase*: rearranjo de átomos dentro de uma molécula. *Ligase*: catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas já existentes, utilizando a energia geralmente derivada da quebra do ATP (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

As celulasas são enzimas do grupo das hidrolases, sendo capazes de hidrolisar a celulose em açúcares solúveis, tais como a glicose (LAMBERT *et al.*, 2003), sendo produzidas por um espectro de bactérias e fungos, aeróbios e anaeróbios, termófilos e mesófilos (BHAT; BHAT, 1997). A modificação enzimática desse biopolímero, extremamente abundante e renovável na Terra, é um desafio em todas as aplicações que utilizam fibras de celulose devido aos seus benefícios potenciais (CAO; TAN, 2002).

As amilases, também, são enzimas do grupo das hidrolases e possuem ação sobre o amido, transformando-o em moléculas menores (AGOSTINI, 2011; GUPTA *et al.*, 2003). Essas enzimas estão entre as mais importantes na atual biotecnologia, podendo ser derivadas de diversas fontes, incluindo plantas, animais e microorganismos, porém as microbianas geralmente atendem com maior eficácia às demandas industriais (ALMEIDA *et al.*, 2009; KUNAMNENI; PERMAUL; SINGH, 2005).

Os microorganismos são considerados boas fontes de enzimas industriais. Entre eles, os fungos por possuírem elevada importância na produção de algumas enzimas comerciais. As enzimas microbianas têm forte potencial biotecnológico, sendo empregadas em diversos setores industriais, como o têxtil (amilase, celulase, pectinase), de papel (lipase, xilanase, oxiredutases), de detergentes (celulase, lipase, protease) e alimentícia (pectinase, lipase, protease) (BON; FERRARA; CORVO, 2008; NIELSEN; OXENBOLL, 1998).

3.4 PANORAMA DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA NO BRASIL

O Brasil é um país favorecido devido à enorme quantidade e variedade de matérias-primas renováveis passíveis de serem transformadas, apresentando a maior biodiversidade do planeta de fonte de catalisadores biológicos. O país apresenta conhecimento em tecnologia enzimática por processos fermentativos e extrativos, porém exporta apenas 14 % desse bioproduto. Os fatores que dificultam a expansão dessa produção e colocação no mercado referem-se ao desenvolvimento tecnológico ainda limitado (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

As importações de enzimas em 2005 representaram US\$ 31 milhões e as exportações US\$ 3 milhões, sendo as enzimas mais importadas amilases e proteases. Nesse sentido, o

mercado nacional de enzimas manifesta um grande potencial em função da enorme geração de resíduos agroindustriais, apesar de ser pouco representativo, o que resultaria na redução do custo de produção de enzimas pela possibilidade de bioconversão desses resíduos, sendo possível um aumento do uso dessas enzimas em processos industriais (MUSSATTO; FERNANDES; MILAGRES, 2007).

A grande distância existente entre as empresas e os centros de pesquisa também dificulta a produção de enzimas industriais. No Brasil, essa situação tende a diminuir, uma vez que o Governo Federal estabeleceu a produção e desenvolvimento de enzimas como área estratégica de desenvolvimento, devido a um aumento mundial no consumo de enzimas. O Brasil caracteriza-se por ser um país essencialmente importador de enzimas e, também, apresenta ainda reduzido número de enzimas utilizadas em processos industriais quando comparado com outros países. Este é um ponto negativo, visto que as enzimas são moléculas capazes de acelerar os processos químicos com grandes vantagens frente aos catalisadores químicos e se distinguem por serem ecologicamente mais viáveis (MONTEIRO; SILVA, 2009).

A necessidade da substituição de catálise por biocatálise tem proporcionado um aumento significativo no consumo de enzimas. A implementação dessa tecnologia resulta em produtos de maior qualidade através do menor gasto energético e menor impacto ambiental, porém possuem limitações em relação a fatores econômicos e de biossegurança (ALVES, 2010).

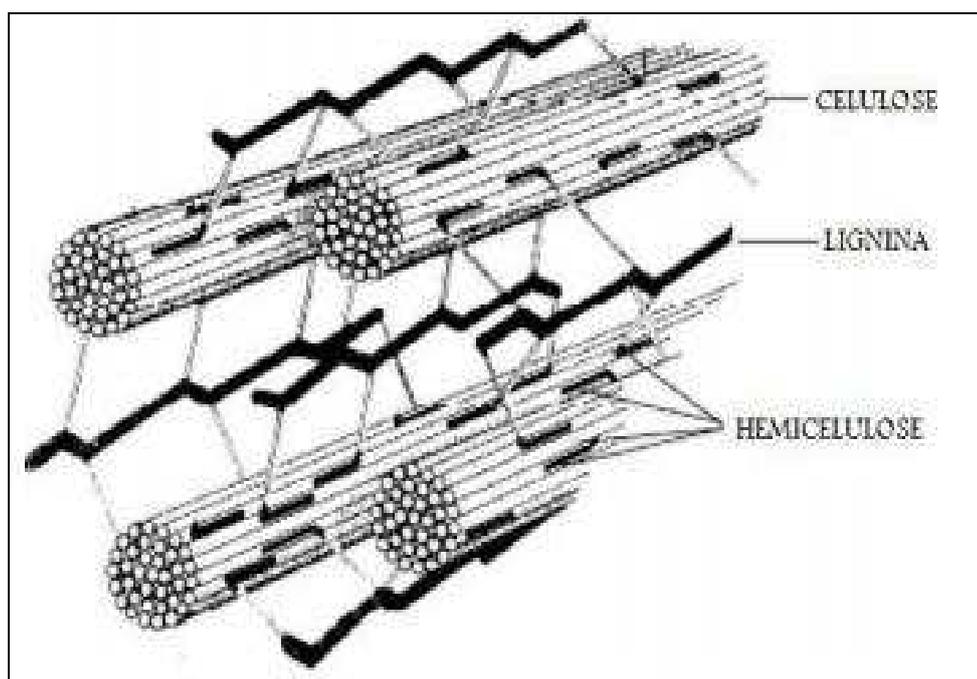
Uma alternativa biotecnológica para adquirir enzimas de interesse econômico e de alto valor agregado é através da biotransformação de matéria-prima utilizando fungos (SILVA *et al.*, 2012) e o Brasil possui uma grande diversidade de microorganismos que poderiam ser explorados para a produção das mais diversas enzimas com utilização em diferentes áreas industriais (ORLANDELLI *et al.*, 2012).

3.5 ENZIMAS CELULOLÍTICAS

3.5.1 Material ligninocelulósico

Diversas pesquisas estão focadas no desenvolvimento de produtos de interesse comercial a partir da biomassa vegetal. A parede celular desses vegetais é constituída por uma mistura de polissacarídeos, proteínas, compostos fenólicos e sais minerais (FARINAS, 2008). O material ligninocelulósico compreende resíduos florestais, resíduos agrícolas e madeira, representando a biomassa mais abundante no planeta (AFONSO, 2012), consistindo de 50 % de celulose, 25 % de hemicelulose e 25 % de lignina (PANDEY *et al.*, 2000a), Figura 2.

Figura 2 - Complexo Lignocelulósico da parede celular vegetal



Fonte: AFONSO, 2012.

A celulose é o componente mais característico da parede celular e que determina na grande maioria sua arquitetura, sendo formada por ligações glicosídicas β (1-4) (HARGREAVES, 2008; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996; ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006). As moléculas de celulose estão associadas em microfibrilas, em que a hemicelulose, moléculas não-celulósicas, encontra-se permeada (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996). A hemicelulose é um heteropolímero extremamente ramificado contendo açúcares como pentoses, hexoses e ácidos urônicos. Constitui-se ainda, como mais solúvel e sendo assim mais hidrolisada que a celulose (AFONSO, 2012). A lignina, depois da celulose, é o polímero mais abundante nas plantas. Ligada a celulose e hemicelulose, confere rigidez e resistência à parede (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996).

A degradação da celulose pode ser realizada através de tratamentos físico-químicos ou de enzimas celulolíticas (HARGREAVES, 2008). As celulasas têm o papel fundamental de estabelecer um elo entre o desenvolvimento do ciclo do carbono na natureza através da degradação da celulose presente na biomassa vegetal. Para isso, os microorganismos celulolíticos produzem uma mistura complexa dessa enzima, as quais coletivamente são para a solubilização completa da celulose existindo sinergismo na sua forma de atuar. O solo é o habitat ideal dessa microflora aeróbica celulolítica (QUÍMICA VERDE NO BRASIL, 2010).

3.5.2 Aplicação Industrial das Enzimas celulolíticas

A produção das celulasas em escala industrial teve início em meados da década de 80, sendo aplicada como aditivo para ração animal, aumentando a digestibilidade de rações por ruminantes e monogástricos. Em seguida, começaram a ser utilizadas como insumos para a indústria de alimentos, melhorando as propriedades sensoriais de massas. Também neste setor, as celulasas começaram a ser aplicadas no processamento de bebidas, promovendo a clarificação de sucos de frutas e vinhos. Anos mais tarde, passaram a ser utilizadas em indústria têxtil e de polpa e papel (CASTRO; PEREIRA JÚNIOR, 2010).

As enzimas celulolíticas têm alcançado o sucesso em todo o mundo na indústria têxtil e de lavanderia devido à sua capacidade para modificar as fibras de celulose de uma maneira controlada e desejada, assim como para melhorar a qualidade dos tecidos. Uma de suas funções é o bio-apedrejamento, o qual consiste na remoção do excesso de corante dos tecidos de *jeans*, amolecimento dos tecidos de algodão, sem danificar a fibra (BHAT, 2000). Segundo Bon, Ferrara e Corvo (2008), podem ser utilizadas em substituição da pedra-pomes para dar aparência envelhecida ao *jeans*, são empregadas ainda para deixar os tecidos mais lisos e macios, através da remoção das fibras superficiais.

Na indústria alimentícia, podem ser utilizadas na extração e clarificação de sucos de frutas para aumentar seus rendimentos, na remoção da camada protetora da soja na produção de alimentos fermentados como o shoyu, molho de soja, e da pasta de soja para sopas missô, bem como na gelatinização de algas e extração de ágar (HARGREAVES, 2008). Tem uso potencial na produção de xaropes de glicose de materiais celulósicos que competirão com amido e sacarose na produção de adoçantes alternativos para utilização em bebidas e alimentos industriais. Poderão ser usados, hidrolisados de celulose, como nutrientes em fermentações de vários produtos químicos tais como os ácidos acético e cítrico, e aminoácidos (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

Presentes na composição de detergentes, celulasas alcalinas podem passar através dos espaços interfibrilares facilmente e ajudar na remoção eficaz de manchas de panos, além de transmitir o brilho da cor e suavidade para os panos de lavagem, mesmo depois de repetidas lavagens. A combinação de enzimas como lípases, proteases e celulasas, também, facilita a remoção de manchas. Detergentes com enzimas podem substituir produtos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos que agredem o ambiente e desgastam instrumentos e materiais (MUSSATTO; FERNANDES; MILAGRES, 2007; JUTURU; WU, 2014).

As celulasas podem ser empregadas ainda em biorrefinarias, o qual consiste na quebra das longas moléculas de celulose, gerando moléculas menores de açúcares que são fermentadas e transformadas em etanol de segunda geração. Para que possam ser utilizadas para esse fim, deve haver uma redução significativa no seu custo (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006; MUSSATTO; FERNANDES; MILAGRES, 2007).

As enzimas podem ser constitutivas ou indutivas. As enzimas constitutivas são sintetizadas continuamente e encontradas invariavelmente na célula e sempre, mais ou menos, na mesma concentração, independente das condições de cultivo e de seu substrato estar ou não presente. Por outro lado, as enzimas indutivas necessitam de um estímulo, substrato, para desempenhar sua função (BAUMER; DIEGO, 2008; VERÍSSIMO; MORAIS, 2006).

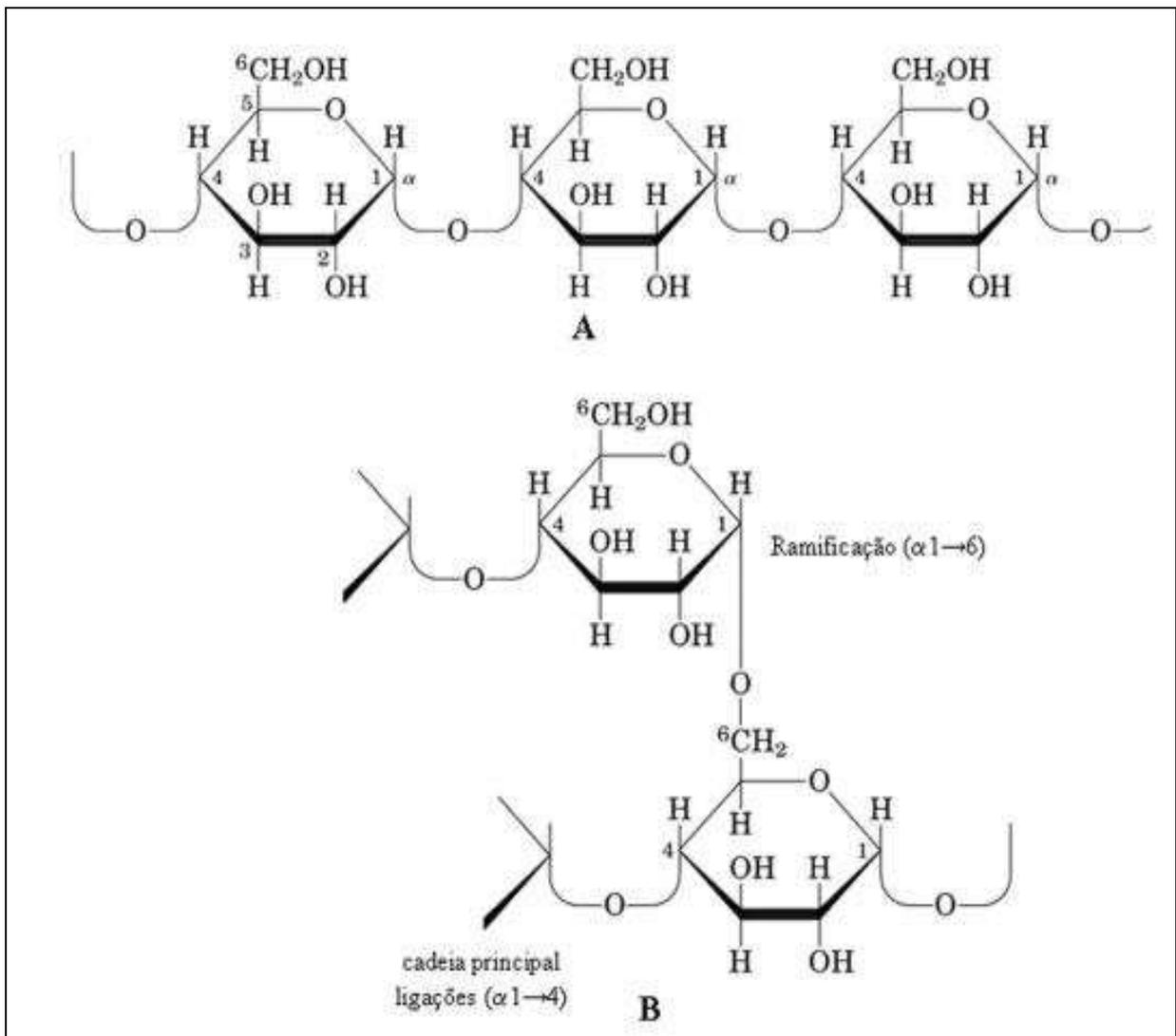
A síntese enzimática pode ser inibida quando a célula estiver num meio em que uma fonte de carbono como a glicose esteja facilmente assimilável. Este fenômeno é denominado de repressão catabólica e garante que o organismo utilizará inicialmente as fontes mais facilmente catabolizáveis de carbono e energia. Quando estas fontes são consumidas a repressão catabólica deixa de exercer o seu papel (BRITES, 2006).

Os fungos são os mais importantes microorganismos utilizados pela indústria na produção de enzimas, dentre eles os filamentosos revelam um alto potencial em vários gêneros, em especial *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium*, em que se destacam algumas espécies promissoras, como *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizomucormeihei* e *Trichoderma viride* para produção de celulasas (PAZZINI; SILVA; ARAÚJO, 2011). Além desses fungos filamentosos, algumas bactérias têm exibido potencial em sua produção, como as *Cellulomonas* e *Thermobifida* (LYND *et al.*, 2002).

3.6 ENZIMAS AMILOLÍTICAS

Um carboidrato encontrado em grande abundância na natureza é o amido, competindo apenas, em termos de quantidade, com a celulose. Possui forma de grânulos com formato e tamanho dependentes da sua fonte botânica (ROCHA; DEMIATE; FRANCO, 2008). O amido é constituído por dois polímeros: a amilose e amilopectina, representados na Figura 3. A amilose, formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α (1-4), originando uma cadeia linear, e a amilopectina, formada por unidades de glicose unidas em α (1-4) e α (1-6), formando uma estrutura ramificada (WALTER; SILVA; EMANUELLI, 2005). Este carboidrato é comumente encontrado tanto nos órgãos de reserva das plantas quanto em grãos de cereais como milho, arroz, trigo e em tubérculos e raízes como batata e mandioca (LEONEL; CEREDA, 2002).

Figura 3 - Representação da (A) amilose e (B) amilopectina



Fonte: FRANCISCO JUNIOR, 2008.

De acordo com Gupta (2003), as amilases são divididas em dois grupos, as endoamilases e exoamilases. As endoamilases catalisam hidrólises de forma aleatória no interior da molécula do amido, causando a formação de ramos lineares de oligossacarídeos de cadeias de vários comprimentos e dessa forma quebram as ligações glicosídicas α -1,4 das cadeias de amilose ou amilopectina. As exoamilases hidrolisam exclusivamente ligações glicosídicas α -1, 4, como a β -amilase ou ambas as ligações α (1-4) e α (1-6), como amiloglicosidase. A alfa-amilase, principal representante do grupo das exoamilases, é responsável por fornecer uma mistura de substâncias chamadas de dextrinas e a beta-amilase que hidrolisa o amido até a formação de maltose (AGOSTINI, 2011).

As amilases são comercialmente importantes pelo fato de representarem cerca de 30% do mercado mundial de enzimas, possuindo grande importância biotecnológica com

diversas aplicações em indústrias têxteis, papel, detergentes, bebidas, alimentos, indústria química e farmacêutica, entre outras (GUPTA, 2003; KUNAMNENI; PERMAUL; SINGH, 2005).

Na indústria alimentícia, o amido é convertido por ação enzimática em diversos produtos, como *dextrinas*, que são utilizadas em formulações clínicas, como material para sacarificação enzimática; como *maltose*, com utilização em confeitarias, cervejas e sorvetes; como *glicose*, utilizada em panificação e como subsídio para produção de etanol; e como *frutose*, com utilização em geleias, iogurtes e refrigerantes (SILVA, 2009). Na indústria de panificação, proporcionam melhor coloração, volume e textura do miolo de pães, podendo ainda retardar o processo de envelhecimento, mantendo o pão fresco por mais tempo (NOVOZYMES, 2005).

Nas indústrias de papel, utilizam-se amilases para proteção do papel contra danos mecânicos e melhoria do acabamento final. Na produção de glicose e frutose, as amilases são usadas para hidrolisar as moléculas de amido (SANTANA, 2012), sendo o amido transformado em xarope de milho de frutose. Essas enzimas apresentam propriedade edulcorante, podendo ser utilizadas em grandes quantidades na indústria de bebidas como edulcorantes para refrigerantes. O processo requer o uso de uma alfa-amilase altamente termoestável para liquefação de amido (PANDEY *et al.*, 2000b). Os edulcorantes são substitutos do açúcar, isto é, são utilizados em composição alimentícia que utilizem açúcar (TEIXEIRA; GONÇALVES; VIEIRA, 2011).

As amilases são produzidas pela maioria dos organismos procariotos e eucariotos, sendo responsáveis pela obtenção de energia para as funções metabólicas, a partir do amido como fonte de carbono. Nos eucariotos, as amilases atuam em tecidos específicos, fato este que inviabiliza sua extração e purificação para uso industrial. Logo, os microorganismos surgem como alternativa barata na produção de enzimas, visto que requerem condições mínimas de nutrição e manutenção, além de secretarem as enzimas para o meio extracelular (RABALHO, 2002). Existe uma diversidade de fungos filamentosos conhecida e uma grande maioria desencadeia potencial para síntese amilolítica, como pode ser observado a partir da Tabela 1.

Tabela 1 – Fungos com potencial para produção de amilase.

MICROORGANISMO	OBTENÇÃO DO ISOLADO	AUTORES
<i>Aspergillus Níger</i>	Centro de Biotecnologia da Universidade de Oriente (Santiago de Cuba, Cuba).	Hernández <i>et al.</i> , 2006.
<i>Aspergillus Níger</i>	Não indicado.	Cruz <i>et al.</i> , 2011.
<i>Aspergillus oryzae</i>	Molho de soja doce.	Sahnoun <i>et al.</i> , 2012.
<i>Macrophomina</i> <i>Phaseolina</i>	Coleção do Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Goiás (DCIF/ICB).	Fernandes <i>et al.</i> , 2007.
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Ar da cidade de Edirne-Turquia.	Balkan; Ertan, 2007

Fonte: FERNANDES *et al.*, 2007; HERNÁNDEZ *et al.*, 2006; SAHNOUN *et al.*, 2012; CRUZ *et al.*, 2011, BALKAN; ERTAN, 2007.

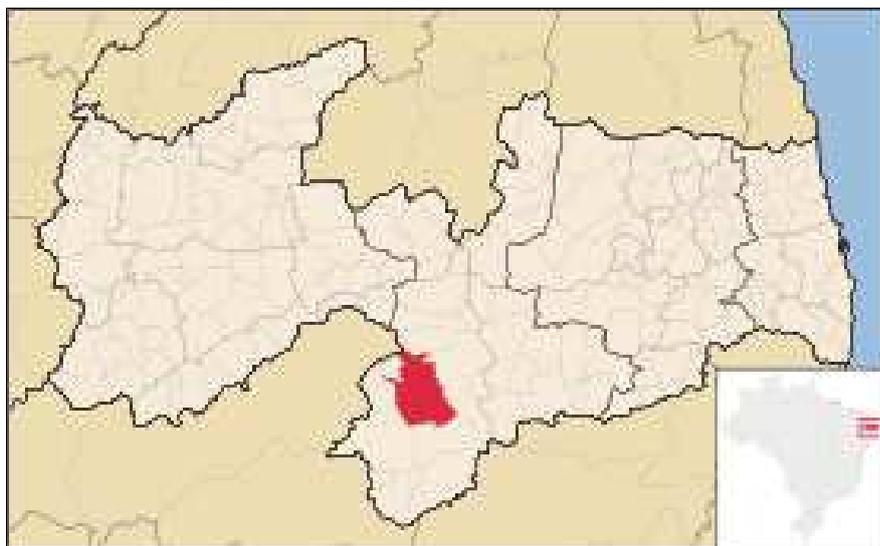
4 METODOLOGIA

Os experimentos efetuados para a realização deste trabalho foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido/Universidade Federal de Campina Grande (CDSA/UFCG).

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para a realização das atividades, foram utilizados os fungos isolados de folhas de plantas e do solo no semiárido paraibano, os quais estão depositados na Coleção de Fungos, (CDSA/UFCG), na cidade de Sumé-PB, Figura 4. Atualmente, a referida coleção de cultura conta com 117 isolados, dos quais 50 foram avaliados.

Figura 4 – Localização de Sumé-PB



Fonte: (a) ABREU, 2006.

4.1.1 Manutenção dos Isolados

Os isolados da Coleção de Fungos do CDSA/UFCG são mantidos em frascos âmbar em meio de cultura composto por batata, sacarose e ágar, nas proporções 10%, 2% e 0,5% respectivamente, em geladeira.

4.1.2 Reativação das Culturas

Os isolados da Coleção de Fungos do CDSA/UFCG foram mantidos em placas de *Petri* contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) à temperatura de 28°C. A composição do meio de cultura BDA utilizado para a manutenção das culturas está apresentada na Tabela 2. Para a preparação deste meio de cultura, cortaram-se as batatas em

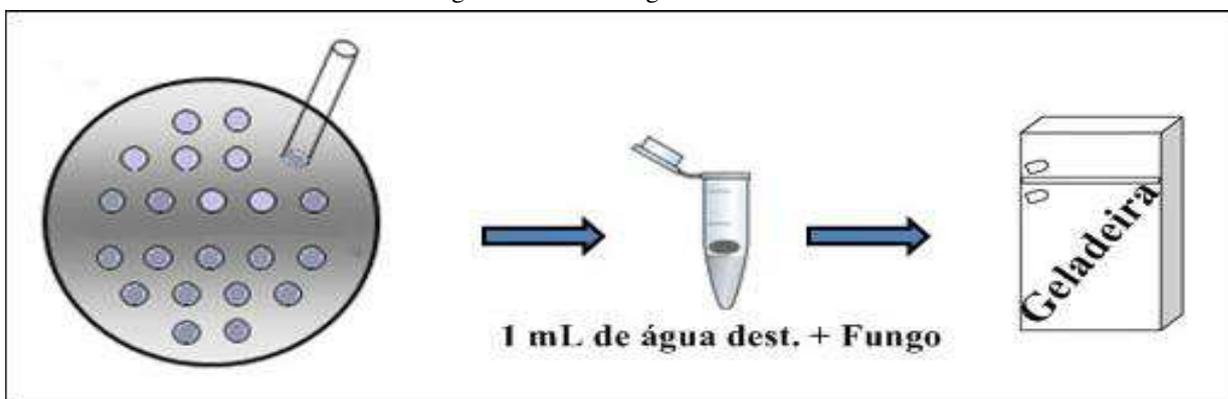
pequenos pedaços, que foram fervidos em água destilada durante 10 minutos contados a partir do início da ebulição. O material foi coado e acrescido de dextrose e Agar. O volume foi ajustado para 1 L e esterilizado em autoclave por 20 min, a 121°C.

Tabela 2 – Composição do meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) utilizado na manutenção das culturas

COMPONENTE	QUANTIDADE
Batata	200 g
Dextrose	20 g
Ágar	20 g
Água destilada	q.s.p. 1 L

Após a reativação os isolados que apresentaram crescimento em meio BDA e que foram utilizados para verificar as atividades enzimáticas foram armazenados de acordo com o método castellani (CASTELLANI, 1939), que consistiu na transferência discos de micélio contendo o fungo, crescido em meio BDA, para tubos cônicos tipo *ependorf* contendo 1 mL de água destilada esterilizada e mantidos em geladeira, Figura 5.

Figura 5 - Metodologia Castellani



4.2 PROSPECÇÃO ENZIMÁTICA DE CELULASE TOTAL (FPase) E AMILASE

A prospecção enzimática dos fungos da coleção do CDSA foi realizada por meio de cultivo dos isolados em meio BDA, substituindo-se a dextrose pela fonte de carbono adequada para a verificação da produção da enzima de interesse. A fonte de carbono que substitui a dextrose para a determinação das atividades enzimáticas está disposta na Tabela 3.

A produção das enzimas no meio de cultura foi verificada através de método de difusão em gel de ágar, em placas de *Petri*, contendo a fonte de carbono citada na Tabela 3, incubadas a 28°C. De acordo com Ghose (1987) o papel de filtro é um substrato utilizado para

determinação de celulases totais. A cada placa de *Petri* acrescentou-se 1 mL de lugol, aguardou-se 1 minuto para a visualização do halo.

Tabela 3 – Fonte de carbono que substitui a dextrose para a determinação das atividades enzimáticas

Enzima de interesse	Fonte de carbono (1%)
Amilase	Amido
Celulase	Papel de filtro

4.3 ÍNDICE ENZIMÁTICO

As atividades enzimáticas foram caracterizadas por meio da formação de halos de degradação do substrato, em que o diâmetro do halo foi medido com auxílio de uma régua. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os isolados que apresentaram halo em torno da colônia tiveram a atividade avaliada pelo índice enzimático (IE), Equação (1) conforme Hankin e Anagnostakis (1975). Os isolados que exibirem os maiores IE nos meios de crescimento, correspondem aos os que possuem maior atividade enzimática.

$$IE = \frac{\varnothing_h}{\varnothing_c} \quad (1)$$

Em que:

IE = Índice Enzimático;

\varnothing_h = Diâmetro médio do halo de degradação, cm;

\varnothing_c = Diâmetro médio da colônia, cm.

4.4 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

Os isolados que apresentaram atividade enzimática em meio BDA com a fonte de carbono específica apresentada na Tabela 3, foram submetidos a duas análises distintas. Uma das análises consistiu no inóculo em meio de cultura contendo $\frac{1}{4}$ da quantidade de batata recomendada para o meio BDA, item 4.1.2, e foi denominado Meio I, e o outro inóculo foi realizado apenas em meio de cultura composto apenas de Agar e da fonte de carbono indutora, Tabela 3, sendo denominado Meio II. O material foi incubado em BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) à 34°C por 72 horas.

4.5 VELOCIDADE DE CRESCIMENTO DOS ISOLADOS

Os isolados que apresentaram atividade positiva para produção de amilase e celulase foram inoculados em meio de cultura, descrito no item 4.2, por um período de 144 horas em BOD, em temperatura de 28°C. Os experimentos foram realizados em duplicata e o

crescimento micelial foi verificado a cada 24 horas, através de medições do diâmetro das colônias, em dois eixos perpendiculares entre si. A velocidade de crescimento foi expressa em centímetros por dia (cm/dia), conforme Equação (2).

$$V = \frac{\varnothing_f}{t} \quad (2)$$

Em que:

V = Velocidade instantânea de crescimento fúngico, cm/dia;

\varnothing_f = Diâmetro da colônia, cm;

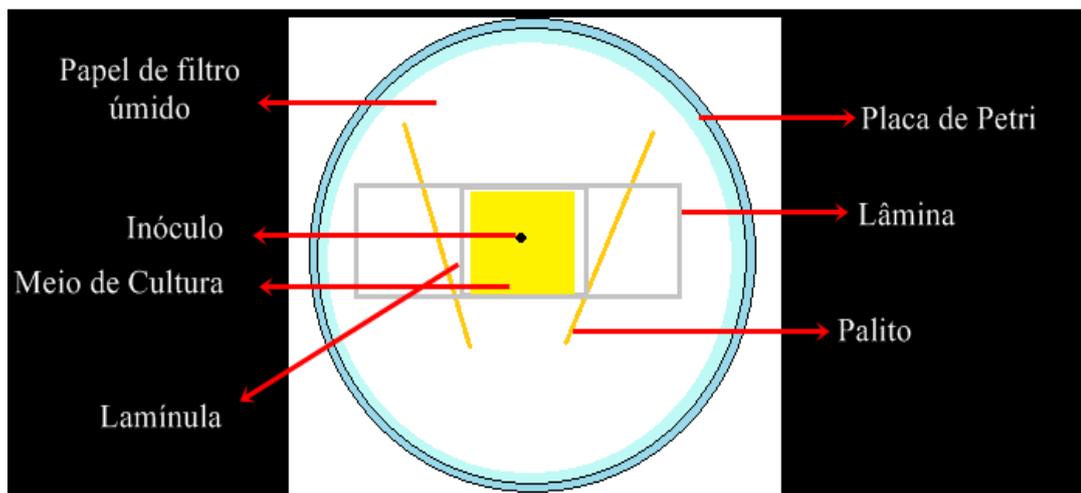
T = tempo, dia.

4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

4.6.1 Técnica de Microcultivo

A técnica de microcultivo, baseada na Agência de Vigilância Sanitária (2004), foi utilizada para identificação dos isolados que apresentaram atividade enzimática de celulase (FPase e amilase). Em uma lâmina para microscopia esterilizada, foi adicionado aproximadamente 1 mL de meio BDA, no qual foi inoculado o fungo de interesse, e em seguida coberto por uma lamínula também esterilizada. Três (3) lados da lamínula foram selados com base para as unhas. Este conjunto foi inserido em uma placa de *Petri* contendo papel de filtro umedecido com água destilada esterilizada e dois palitos de madeira esterilizados, como suporte (Figura 6). Em seguida, o material foi incubado a 34°C (\pm °C), com acompanhamento do crescimento por 96 horas em microscópio óptico e comparação das imagens obtidas com literatura especializada.

Figura 6 – Técnica de Microcultivo para análise de fungos filamentosos



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 REATIVAÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS

No presente trabalho, fez-se inicialmente a reativação de 50 isolados da Coleção de Fungos do CDSA. Como podemos observar na Tabela 4, dos 50 isolados 23 não apresentaram crescimento no meio de cultura BDA. A não reativação das culturas pode ter ocorrido devido à dificuldades de armazenamento e conservação dos isolados fúngicos da referida coleção.

A dificuldade de alguns fungos crescerem após longos períodos podem ser devido ao período de crescimento escolhido ou por inóculos constituídos de células inviáveis (RODRIGUES; LÍRIO; LACAZ, 1992).

Tabela 4 – Reativação dos 50 isolados

NÚMERO DO ISOLADO AVALIADO	CRESCIMENTO EM MEIO BDA
CDSA 01, CDSA 02, CDSA 06, CDSA 07, CDSA 09 CDSA 10, CDSA 12, CDSA 17, CDSA 18, CDSA 20, CDSA 21, CDSA 22, CDSA 23, CDSA 24, CDSA 49, CDSA 54, CDSA 56, CDSA 59, CDSA 60, CDSA 65, CDSA 66, CDSA 69, CDSA 70, CDSA 71, CDSA 72, CDSA 78 e CDSA 106.	+
CDSA 03, CDSA 04, CDSA 11, CDSA 13, CDSA 14, CDSA 15, CDSA 16, CDSA 19, CDSA 25, CDSA 26, CDSA 27, CDSA 33, CDSA 34, CDSA 40, CDSA 52, CDSA 53, CDSA 55, CDSA 58, 64, CDSA 73, CDSA 74, CDSA 115 E CDSA 117.	-

Nota: Símbolos convencionais utilizados:

+: houve crescimento microbiano

-: não houve crescimento microbiano

Segundo Mello, Reis e Silva (2011), quatro métodos de preservação de microorganismos são usualmente utilizados. Estes métodos são conhecidos como *criopreservação*, preservação à -180°C , *preservação com óleo mineral*, isto é, adição desse óleo às culturas estabelecidas em meio de cultivo em temperatura ambiente, *liofilização*, desidratação em que se reduz o conteúdo de água da célula, e o *método de castellani*, preservação em água esterilizada tamponada que promove a manutenção das características morfológicas e fisiológicas.

Considerando a dificuldade de reativação dos isolados, conforme se observa na Tabela 4, aqueles que apresentaram crescimento em meio BDA foram armazenados por meio do método Castellani (1939), visto que este é um método de um baixo custo e evita o

pleomorfismo das amostras. Segundo relatos da literatura é um método extremamente eficaz (APARECIDO; CAMILO, 2013; RODRIGUES; LÍRIO; LACAZ, 1992). De acordo com Neufeld e Oliveira (2008), após 11 anos de conservação de fungos dermatófitos, 93% apresentaram-se viáveis e sem alterações morfológicas.

5.2 DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos para a detecção das atividades FPase e amilase em cultivo em Meio BDA, contendo o substrato apropriado conforme indicado no item 4.2, por meio da técnica de difusão em gel de ágar. Pode-se detectar que entre os 27 isolados que apresentaram crescimento, apenas 18 (66,67 %) produziram alguma das enzimas avaliadas, nas condições que foram impostas.

Tabela 5 – Índice Enzimático (IE) para as atividades de celulase e amilase

	ISOLADOS	IE FPASE	IE AMILASE
1	CDSA 01	1,40	-
2	CDSA 02	1,10	-
3	CDSA 06	1,18	1,14
4	CDSA 07	1,17	-
5	CDSA 09	1,13	1,10
6	CDSA 10	-	-
7	CDSA 12	1,60	-
8	CDSA 17	1,10	1,07
9	CDSA 18	1,15	1,17
10	CDSA 20	1,14	-
11	CDSA 21	1,15	-
12	CDSA 22	1,18	-
13	CDSA 23	-	1,05
14	CDSA 24	1,40	1,14
15	CDSA 49	-	-
16	CDSA 54	-	1,09
17	CDSA 56	-	1,05
18	CDSA 59	-	-
19	CDSA 60	-	-
20	CDSA 65	1,14	-
21	CDSA 66	-	1,09
22	CDSA 69	1,08	1,09
23	CDSA 70	-	-
24	CDSA 71	-	-
25	CDSA 72	-	-
26	CDSA 78	-	-
27	CDSA 106	-	-

Nota: Abreviação e símbolos convencionais utilizados:

-: ausência de produção enzimática

IE: medida do halo de degradação do substrato/halo de crescimento fúngico

Dentre os 27 isolados que apresentaram crescimento no meio de cultura explicitado anteriormente e inoculados em meio específico para verificar a atividade amilolítica, 10

(37,04%) tiveram formação de halo de degradação (Tabela 5). Os demais isolados não apresentaram atividade amilolítica. De acordo com os resultados obtidos, podemos observar que os isolados CDSA 06, CDSA 18 e CDSA 24 apresentaram maior potencial para síntese amilolítica, com IE de 1,14; 1,17 e 1,14, respectivamente. Para a atividade da enzima FPase verificou-se que 14 isolados (51,85%) apresentaram atividade celulolítica. O isolado CDSA 12 foi o que se destacou com um IE de 1,6, seguido do isolado CDSA 01 e CDSA 24, ambos com IE de 1,4, conforme Tabela 5.

Confrontando com o trabalho de Oliveira *et al.* (2006), em que foi avaliada a capacidade de bactérias do tipo rizóbia em produzir amilase verificou-se que 32,8 % dos isolados avaliados foram capazes de sintetizar esta enzima, apresentando IEs entre 1,1 e 3,1. A atividade de carboximetilcelulase correspondeu a 9,0%, com os IES variando entre 1,5 e 2,0. O maior potencial foi com relação a produção de amilase, este fato pode está relacionado com o local, nódulos de feijão caupi, em que as bactérias foram isoladas.

Pode ser observado, ainda, que dentre os isolados que apresentaram atividade enzimática, seis demonstraram atividade simultânea para as duas enzimas avaliadas. Os baixos IE observados podem ser devido à dificuldade das enzimas se difundirem no meio de cultura. Dessa forma, o processo de produção das enzimas em questão deve ser otimizado e os parâmetros, como meio de cultura, temperatura e pH, que comprometem a atividade enzimática, investigados.

5.3 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA EM MEIO SÓLIDO

Com a finalidade de otimizar a produção das enzimas amilase e FPase, os isolados que apresentaram atividade enzimática FPase e amilase foram analisados em: 1) meio de cultura contendo $\frac{1}{4}$ da quantidade de batata recomendada para o meio BDA- Meio I e em 2) meio de cultura composto apenas Agar e a fonte de carbono indutora - Meio II.

5.3.1 Atividade Amilolítica

Os dez isolados que apresentaram atividade amilolítica em Meio BDA (Tabela 5), foram avaliados para otimização da produção de amilase, dessa forma, foram inoculados em Meio I e Meio II e os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Os resultados mostram que o Meio I promoveu um ligeiro aumento nos IEs. No entanto, quando os isolados foram cultivados em Meio II observou-se um relevante aumento nos valores de IE, principalmente para os isolados CDSA 09, 18, 23, 24 54. Esses resultados indicam que a retirada da fonte de carbono facilmente assimilável (batata) promoveu um

aumento na produção das enzimas amilolíticas. Souza, Oliveira e Andrade (2008) realizaram testes para verificar a atividade amilolítica de diversos basidiomicetos em três substratos: o amido de milho, farelo de trigo e maltose. Os fungos proporcionaram maior preferência pelo amido de milho e farelo de trigo, até porque um dos isolados em meio com amido de milho e três isolados em meio contendo farelo de trigo apresentou IE maior que 2, e todos em meio contendo maltose apresentaram IE inferior a 2.

Tabela 6 – Índice enzimático (IE) para amilase sob dois meios de cultura distintos

ISOLADOS	MEIO I			MEIO II		
	\varnothing_c	\varnothing_h	IE	\varnothing_c	\varnothing_h	IE
CDSA 06	2,20	2,80	1,27	1,40	2,00	1,43
CDSA 09*	2,30	2,80	1,22	0,30	1,10	3,67
CDSA 17	3,80	4,30	1,13	0,20	0,40	2,00
CDSA 18*	2,50	3,20	1,28	0,50	1,80	3,60
CDSA 23*	3,50	4,10	1,17	0,60	2,00	3,33
CDSA 24*	2,90	3,40	1,17	0,30	1,00	3,33
CDSA 54	3,40	3,80	1,12	0,30	1,00	3,33
CDSA 56*	3,20	4,20	1,31	0,20	0,50	2,50
CDSA 66	2,10	2,40	1,14	0,50	1,30	2,60
CDSA 69	2,40	2,70	1,13	2,00	2,50	1,25

Nota: Abreviação e símbolos convencionais utilizados:

*: isolados que apresentarem melhores resultados

IE – Índice Enzimático ($IE = \varnothing_h / \varnothing_c$)

\varnothing_c – Diâmetro médio da colônia

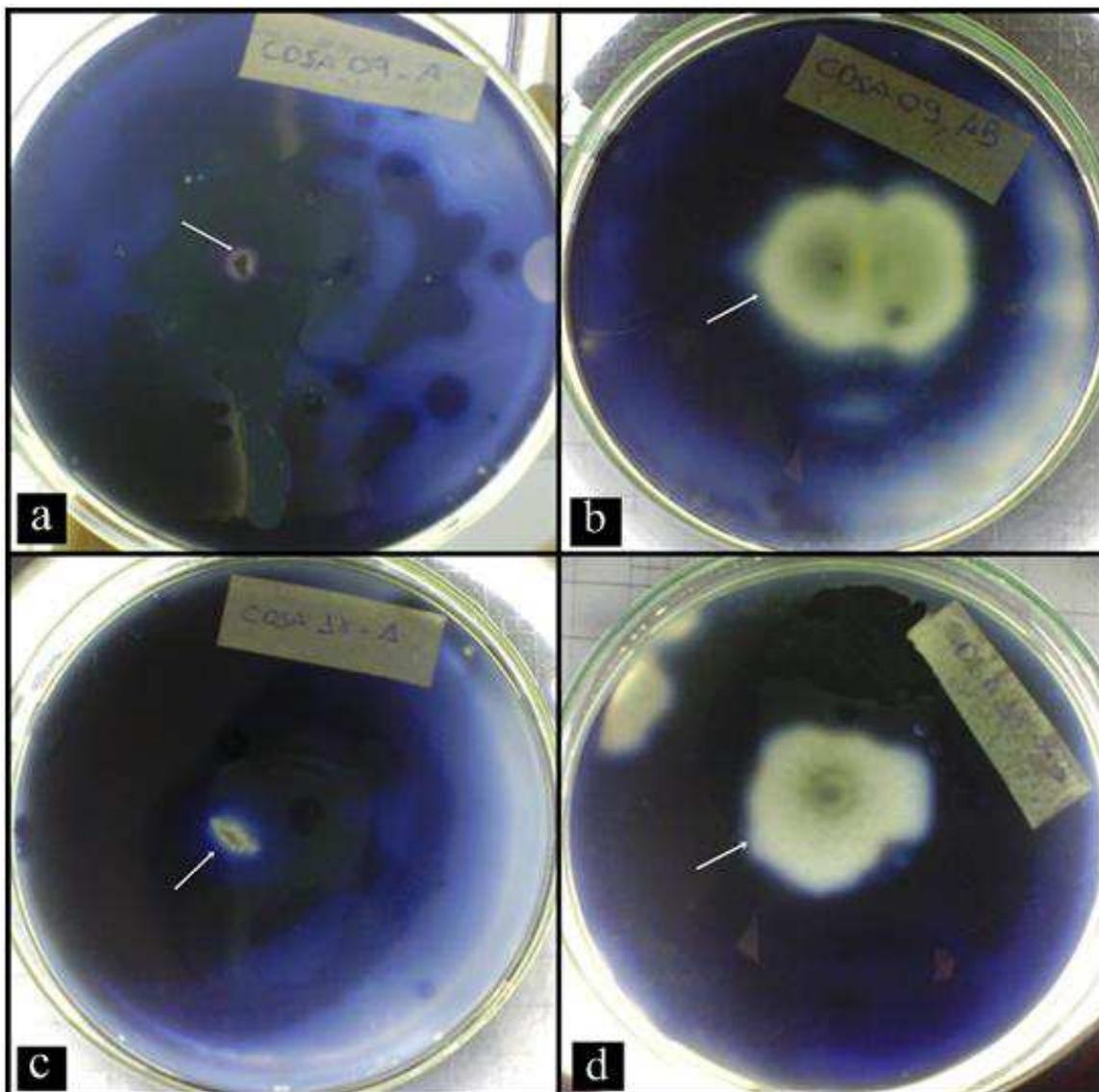
\varnothing_h – Diâmetro médio do halo de degradação

Em Meio II, os isolados que demonstraram maior potencial para síntese amilolítica foram o CDSA 09, CDSA 17, CDSA 18, CDSA 23, CDSA 24, CDSA 54, CDSA 56, CDSA 66 e CDSA 69, visto que apresentaram $IE > 2$. De acordo com Lealem e Gashe (1994) para que um microorganismo seja considerado como bom produtor de enzimas em meio sólido devem apresentar um $IE \geq 2,0$. Destes isolados o CDSA 09 e CDSA 18 tiveram maior destaque, com um valor de IE de 3,67 e 3,60, respectivamente. Estes resultados se assemelham aos obtidos no trabalho de Baratto *et al* (2011), em estudo utilizando leveduras e bactérias, em que em um período de 72 horas os isolados apresentaram IE entre 1,00 e 3,85.

A Figura 7 mostra o halo de degradação para atividade amilolítica dos isolados CDSA 09 e CDSA 18 em Meio I e Meio II. Observa-se que ao retirar a batata da composição do meio de cultura, Figuras 7a e 7c, o fungo cresce pouco (\varnothing de 0,3 cm e \varnothing 0,5 cm, respectivamente) em comparação com o meio suplementado com batata, Figuras 7b e 7d (\varnothing

de 2,3 cm e Ø 2,5 cm, respectivamente). Entretanto, apesar do pequeno crescimento fúngico em Meio II os isolados apresentaram maior halo de degradação.

Figura 7 – Representação do CDSA 09 e CDSA 18 com atividade amilolítica. CDSA 09 em (a) Meio II e em (b) Meio I; CDSA 18 em (c) meio II e em (d) Meio I



5.3.2 Atividade de Fpase (Celulase Total)

A partir da comparação dos resultados do inóculo dos isolados nos meios BDA, Meio I e Meio II, podemos observar, Tabela 5 e Tabela 7, que todos os isolados apresentaram aumento no valor do IE no Meio I e II em relação ao Meio BDA, com exceção do CDSA 01 e CDSA 12 que em Meio BDA, apresentaram IE de 1,4 e 1,6, respectivamente, enquanto em Meio I, apresentaram IE de 1,15 e 1,05, e em Meio II demonstraram um excelente potencial com IE de 5,60 e 6,75.

Na avaliação da atividade da FPase, conforme Tabela 7, observamos que o IE dos isolados avaliados é relevantemente maior quando submetidos ao cultivo em Meio II quando comparado com o Meio I. Essa divergência no halo de degradação pode ser devido a composição do meio de cultura, pois o Meio I, em que observa-se um valor do IE relativamente baixo possui em sua composição batata. Como já foi discutido anteriormente, a batata é uma fonte de amido.

Tabela 7 – Índice enzimático (IE) para FPase sob dois meios de cultura distintos

ISOLADOS	MEIO I			MEIO II		
	\varnothing_c	\varnothing_h	IE	\varnothing_c	\varnothing_h	IE
CDSA 01	4,00	4,60	1,15	0,50	2,80	5,60
CDSA 02	3,30	4,00	1,21	0,60	2,50	4,17
CDSA 06*	2,90	3,60	1,24	0,40	2,60	6,50
CDSA 07	3,20	3,90	1,22	0,50	2,80	5,60
CDSA 09	2,50	2,80	1,12	0,30	0,90	3,00
CDSA 17	3,30	4,00	1,21	0,60	3,00	5,00
CDSA 18	3,20	4,00	1,25	0,80	2,80	3,50
CDSA 12*	4,10	4,30	1,05	0,40	2,70	6,75
CDSA 20*	3,00	4,20	1,40	0,40	2,40	6,00
CDSA 21	3,00	4,30	1,43	1,00	3,30	3,30
CDSA 22	3,00	4,50	1,50	0,50	2,60	5,20
CDSA 24	1,40	2,80	2,00	0,70	3,20	4,57
CDSA 65	1,30	1,80	1,38	0,40	0,80	2,00
CDSA 69*	3,40	3,70	1,09	0,50	3,00	6,00

Nota: Abreviação e símbolos convencionais utilizados:

*: isolados que apresentarem melhores resultados

IE – Índice Enzimático ($IE = \varnothing_h / \varnothing_c$)

\varnothing_c – Diâmetro médio da colônia

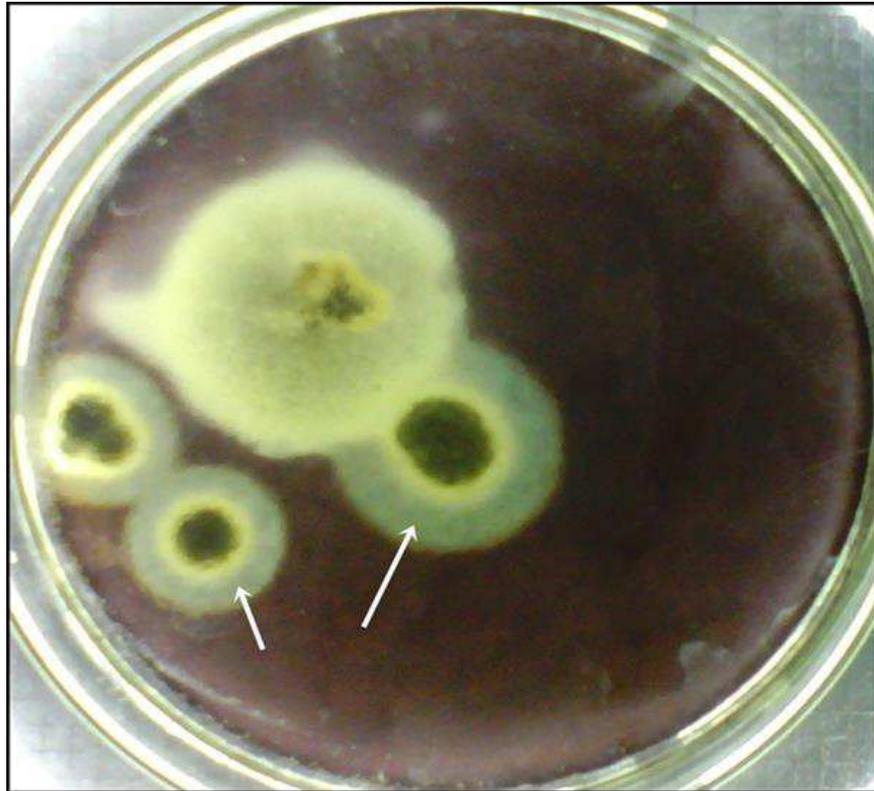
\varnothing_h – Diâmetro médio do halo de degradação

Os isolados que mais se destacaram quanto a produção de FPase no Meio II foram o CDSA 06, CDSA 12, CDSA 20 e CDSA 69, todos com IE igual ou maior que 6. Os valores encontrados foram superiores aos descritos por Monteiro (2012), em que cinco cepas de *Aspergillus sulphureus*, isolados no solo de Arcos, Luminárias e Passos de Minas Gerais, apresentaram IE em torno de 3 para celulase, com meio de cultura constituído, também, apenas por ágar e carboximetilcelulose (CMC).

O isolado que merece destaque em relação ao Meio I é o CDSA 24, Figura 8, pois dentre os 14 isolados avaliados foi o único que apresentou um IE com valor igual a 2, todos os outros tiveram seus valores inferiores. Pazzini, Silva e Araújo (2011) verificaram que cinco linhagens de fungos entre 13 avaliadas mostraram-se promissoras na degradação da celulose

em meio sintético com CMC e extrato de levedura. Dessas linhagens, duas apresentaram colônias com pouco desenvolvimento, porém obtiveram altos valores de IE com 2,1 e 2,7 cm.

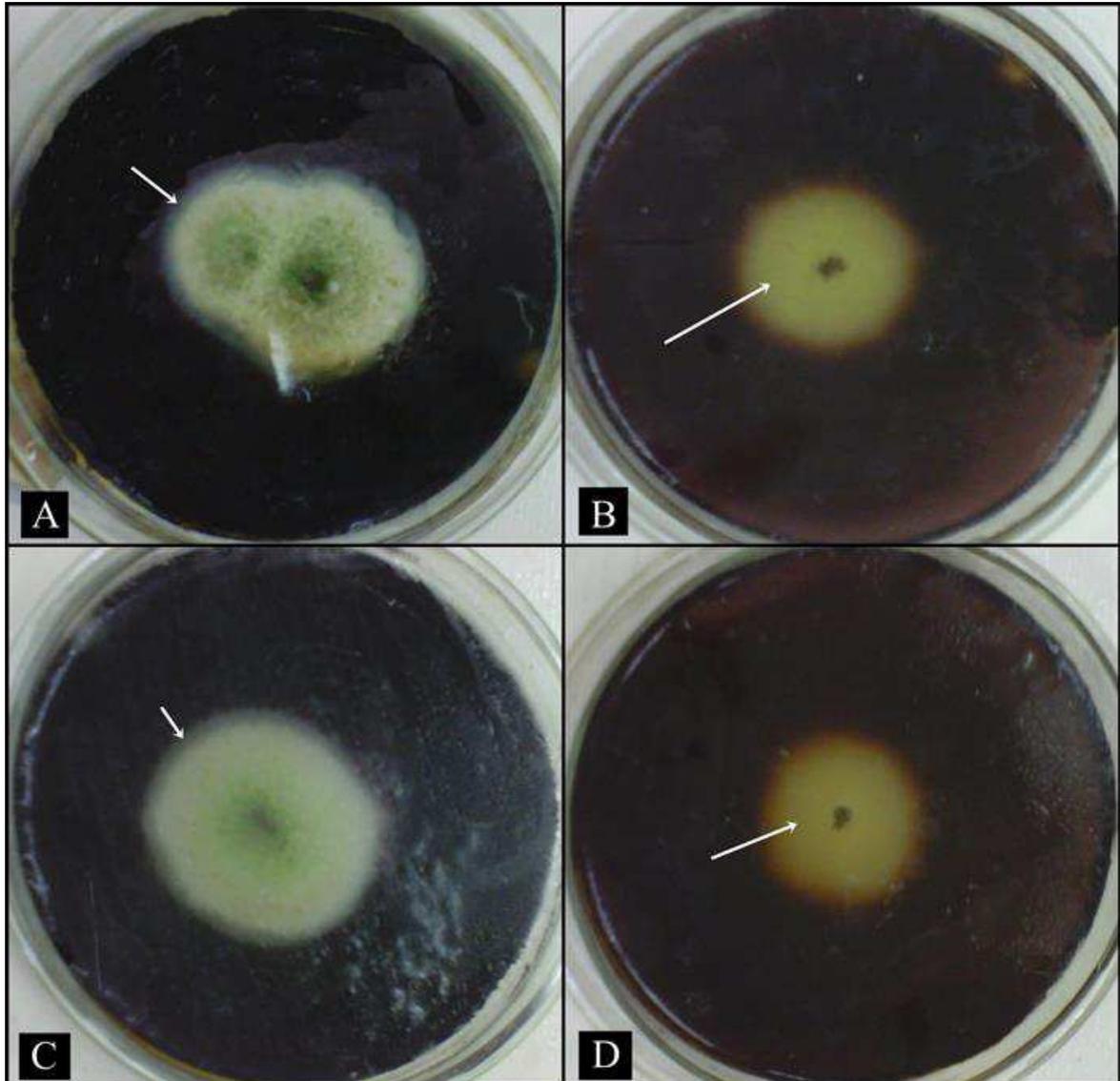
Figura 8 – Representação do halo de degradação de FPase pelo CDSA 24 em Meio I



Na figura 9 estão representados os isolados CDSA 07 e CDSA 20, na qual visualizamos o halo de degradação a partir da área mais clara ao redor da colônia, indicada pelas setas. Vale salientar, também, que quando submetidos ao Meio II há um menor crescimento fúngico e maior halo de degradação. Resultado semelhante foi verificado em um trabalho de Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004), em que foi verificado que algumas colônias, entre as 36 linhagens (45%) que apresentaram halo de degradação da CMC, tiveram pouco crescimento e apresentaram altos IEs como o *Penicillium verruculosum* II com diâmetro de colônia de 1 mm e índice de 5.

Nos testes realizados, o maior potencial dos isolados foi quanto a produção de celulases, este fato pode ser devido ao local em que estes foram coletados, como plantas e solo, visto que necessitam das celulases para que possam absorver a matéria contida nos substratos celulósicos dispostos no seu habitat em questão.

Figura 9 – Representação do CDSA 07 e CDSA 20 com atividade FPase. CDSA 07 em (a) Meio I e (b) Meio II; CDSA 20 em (c) Meio I e (d) Meio II



5.4 VELOCIDADE DE CRESCIMENTO DOS ISOLADOS

Para a análise da velocidade de crescimento dos 18 isolados em estudo, foram realizadas medições em dois eixos perpendiculares, em duplicata, a cada 24 horas até o tempo de 144 horas, em que podemos observar os referidos dados na Tabela 8.

A partir destes dados, podemos verificar que os isolados CDSA 12, CDSA 23 e CDSA 54 destacaram-se em relação aos demais por apresentarem um crescimento de 1,49, 1,54, e 1,50 (cm/dia), respectivamente, preenchendo completamente a placa de Petri durante as 144 horas. No trabalho desenvolvido por Santos *et al* (2013) para verificar o crescimento

de *Aspergillus terreus* isolado em solos de Caatinga apresentou um crescimento de 8 cm no décimo dia a uma temperatura de 28°C.

Tabela 8 – Crescimento fúngico (cm) em meio BDA. Todos os testes foram realizados em duplicata

	ISOLADO	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
1	CDSA 01	0,00	0,30	0,68	1,10	1,45	1,80
2	CDSA 02	1,03	2,33	3,98	5,55	6,93	8,08
3	CDSA 06	1,15	2,50	3,88	5,15	6,13	6,73
4	CDSA 07	1,13	2,53	4,03	5,50	6,35	7,08
5	CDSA 09	0,80	2,33	3,25	4,08	4,60	5,35
6	CDSA 12*	0,78	2,45	4,20	6,05	7,73	8,93
7	CDSA 17	0,60	1,58	2,28	2,88	3,38	3,83
8	CDSA 18	1,15	2,68	3,15	5,80	6,83	8,18
9	CDSA 20	1,03	2,60	4,00	5,65	6,88	8,13
10	CDSA 21	1,00	2,50	4,00	5,55	6,58	7,73
11	CDSA 22	1,30	2,80	4,25	5,45	6,25	6,68
12	CDSA 23*	1,00	2,63	4,25	6,15	7,35	9,23
13	CDSA 24	0,58	1,30	1,98	2,70	3,38	3,75
14	CDSA 54*	0,65	2,35	4,13	5,95	7,53	9,00
15	CDSA 56	0,70	2,45	3,98	5,80	7,03	8,35
16	CDSA 65	0,48	2,15	3,10	4,20	5,03	5,50
17	CDSA 66	0,58	2,33	4,18	5,95	7,25	8,85
18	CDSA 69	1,20	3,20	4,90	5,90	7,25	7,90

Nota: Símbolo convencional utilizado:

*: isolados que apresentarem melhores resultados

Os isolados CDSA 01, CDSA 17 e CDSA 24 foram os que apresentaram crescimento mais lento, tendo o CDSA 01 no período de 144 h crescido apenas 1,80 cm e o CDSA 17 3,83 cm e o CDSA 24 3,75 cm, respectivamente.

Na Tabela 9 está contido o valor do crescimento que os isolados apresentaram a cada 24 horas. Pode ser enfatizado que, em média, os isolados tiveram maior crescimento em placa entre 48 horas e 120 horas, sendo considerado como ápice de crescimento. O CDSA 18 apresentou um elevado crescimento no período de 96 h, pois cresceu 2,65 cm. Em média, os isolados CDSA 54 e CDSA 12 apresentaram os maiores crescimentos de 1,50 e 1,49 cm/dia.

Pode ser observado que o CDSA 07 no período de 144 h apresenta um estado de latência, ocorrendo um declínio no seu crescimento micelial, enquanto que o isolado CDSA 01 apresenta-se em crescimento exponencial nesse período, apesar de seu crescimento apresentar oscilações.

Tabela 9 – Valor do crescimento diário dos isolados

	ISOLADO	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	cm/dia (Média)
1	CDSA 01	0,00	0,30	0,38	0,43	0,35	0,35	0,30
2	CDSA 02	1,03	1,30	1,65	1,58	1,38	1,15	1,35
3	CDSA 06	1,15	1,35	1,38	1,28	0,98	0,60	1,12
4	CDSA 07	1,13	1,40	1,50	1,48	0,85	0,73	1,18
5	CDSA 09	0,80	1,53	0,93	0,83	0,52	0,75	0,89
6	CDSA 12*	0,78	1,68	1,75	1,85	1,68	1,20	1,49
7	CDSA 17	0,60	0,98	0,70	0,60	0,50	0,45	0,64
8	CDSA 18	1,15	1,53	0,48	2,65	1,03	1,35	1,36
9	CDSA 20	1,03	1,58	1,40	1,65	1,23	1,25	1,36
10	CDSA 21	1,00	1,50	1,50	1,55	1,03	1,15	1,29
11	CDSA 22	1,30	1,50	1,45	1,20	0,80	0,43	1,11
12	CDSA 23*	1,00	1,63	1,63	1,90	1,20	1,88	1,54
13	CDSA 24	0,58	0,73	0,68	0,73	0,68	0,38	0,63
14	CDSA 54*	0,65	1,70	1,78	1,83	1,58	1,48	1,50
15	CDSA 56	0,70	1,75	1,53	1,83	1,23	1,33	1,39
16	CDSA 65	0,48	1,68	0,95	1,10	0,83	0,48	0,92
17	CDSA 66	0,58	1,75	1,85	1,78	1,30	1,60	1,48
18	CDSA 69	1,20	2,00	1,70	1,00	1,35	0,65	1,32

Nota: Símbolo convencional utilizado:

*: isolados que apresentarem melhores resultados

Pode ser abordado, também, que os isolados CDSA 12, CDSA 23 e CDSA 54, os que apresentaram maior velocidade de crescimento, mostraram um bom potencial para produção de amilase, CDSA 23 e CDSA 54, e de FPase, CDSA 12, enfatizando ainda mais o potencial desses fungos isolados do Semiárido Paraibano. Logo, se enquadraram entre os microorganismos que apresentaram maior atividade enzimática das enzimas em estudo.

5.5 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

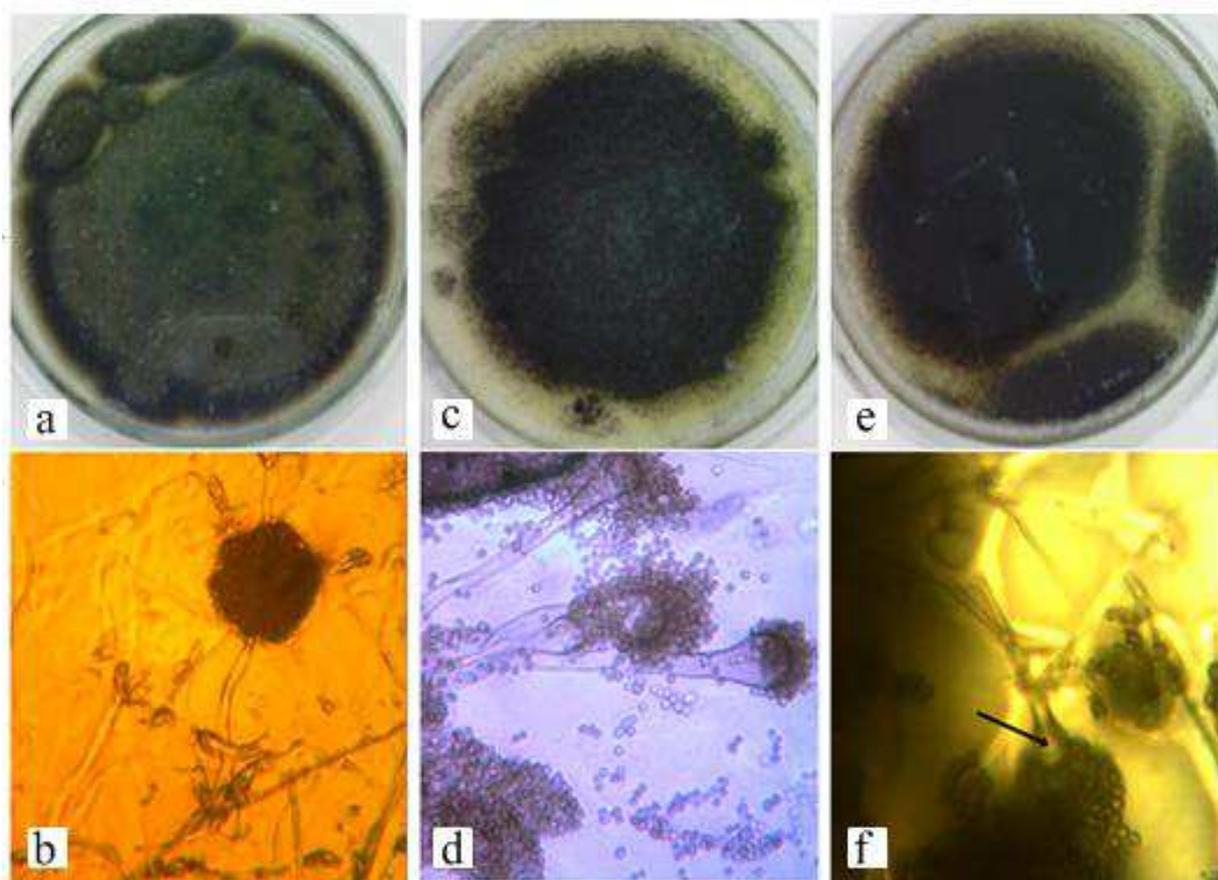
Após a detecção da produção de enzimas, os 18 isolados que apresentaram atividade, seja para amilase seja para FPase, foram submetidos a identificação. As características morfológicas microscópicas dos 18 isolados foram consideradas para sua identificação. A partir das imagens dos isolados cultivados em lâmina em meio BDA, obtidas por meio de microscopia óptica, foi possível realizar a identificação, comparando-as com imagens encontradas na literatura. Diante dos resultados obtidos, foi possível determinar a existência de apenas dois gêneros, destes, quinze foram identificados como sendo do gênero *Aspergillus*

e apenas um isolado identificado do gênero *Penicillium*. Não foi possível a identificação do CDSA 02 e CDSA 54, devido a ausência de crescimento em meio BDA em lâmina.

O gênero *Aspergillus* caracteriza-se por apresentar conidióforos retos, terminando em uma globosa vesícula, tendo fiálides no ápice sobreposta por conídios (BARNETT; HUNTER, 1998). De acordo com essas características, determinou-se que os isolados CDSA 01, CDSA 06, CDSA 07, CDSA 09, CDSA 17, CDSA 18, CDSA 20, CDSA 21, CDSA 22, CDSA 23, CDSA 24, CDSA 56, CDSA 65, CDSA 66 e CDSA 69 assemelham-se com espécies pertencentes ao gênero em questão.

Na Figura 10 estão representados os isolados CDSA 01, CDSA 09 e CDSA 69 com suas estruturas macroscópicas e microscópicas, em que podemos observar uma semelhança de coloração desses isolados, isto é, tons escuros lembrando o preto.

Figura 10 – Estrutura macroscópica e microscópica do CDSA 01, CDSA 09 e CDSA 69. CDSA 01 (a) representação macroscópica e (b) microscópica no período de 72 horas, CDSA 09 (c) representação macroscópica e (d) microscópica no período de 24 horas, CDSA 69 (e) representação macroscópica e (f) microscópica no período de 48 horas

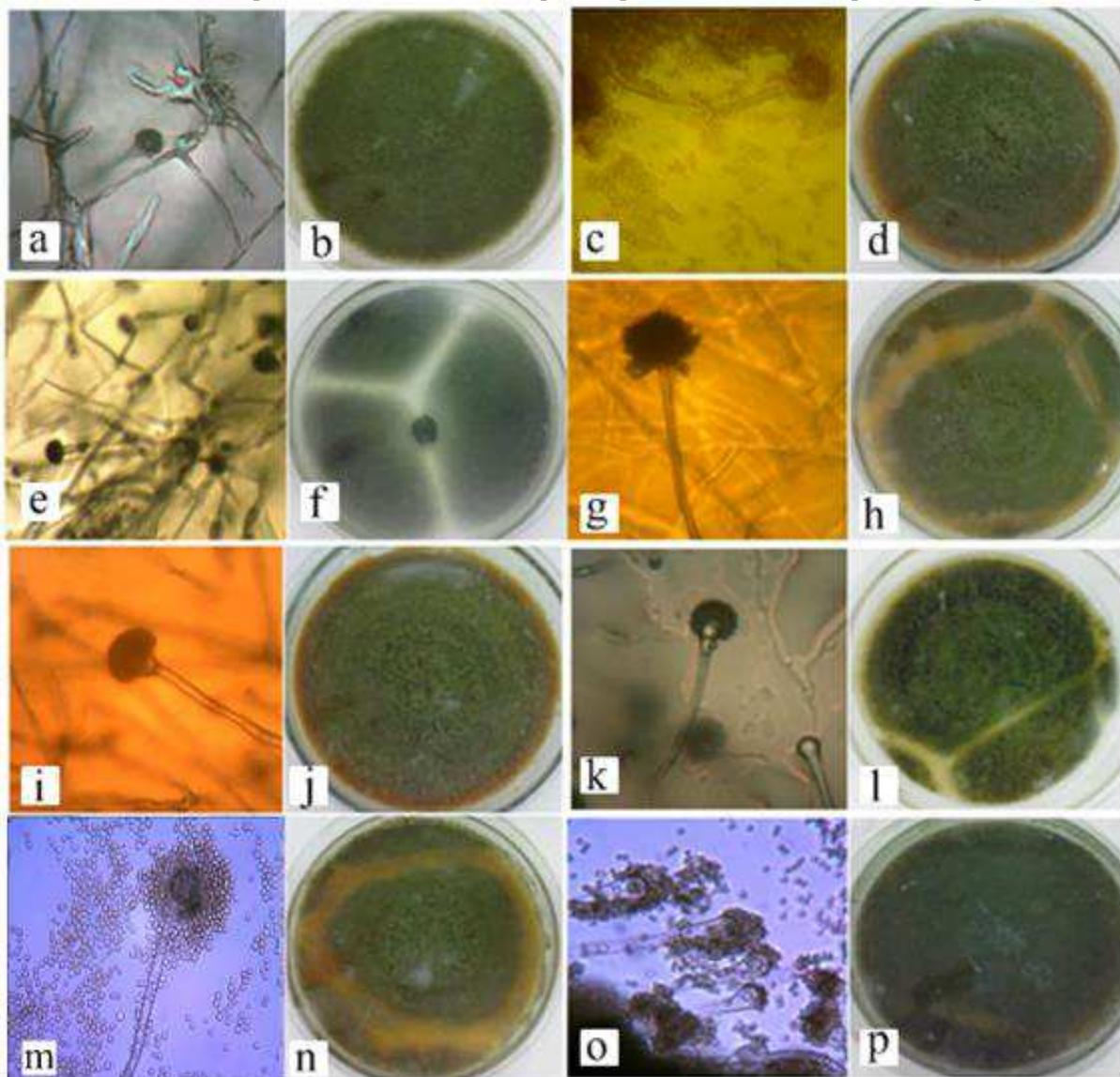


Fonte: (d) Leandro Costa.

Na Figura 11 tem-se os isolados CDSA 06, CDSA 07, CDA 17, CDSA 18, CDSA 20, CDSA 21, CDSA 22 e CDSA 66 e suas respectivas estruturas micro e macroscópicas, os

quais com o decorrer do crescimento em placa de *Petri* apresentam uma coloração esverdeada.

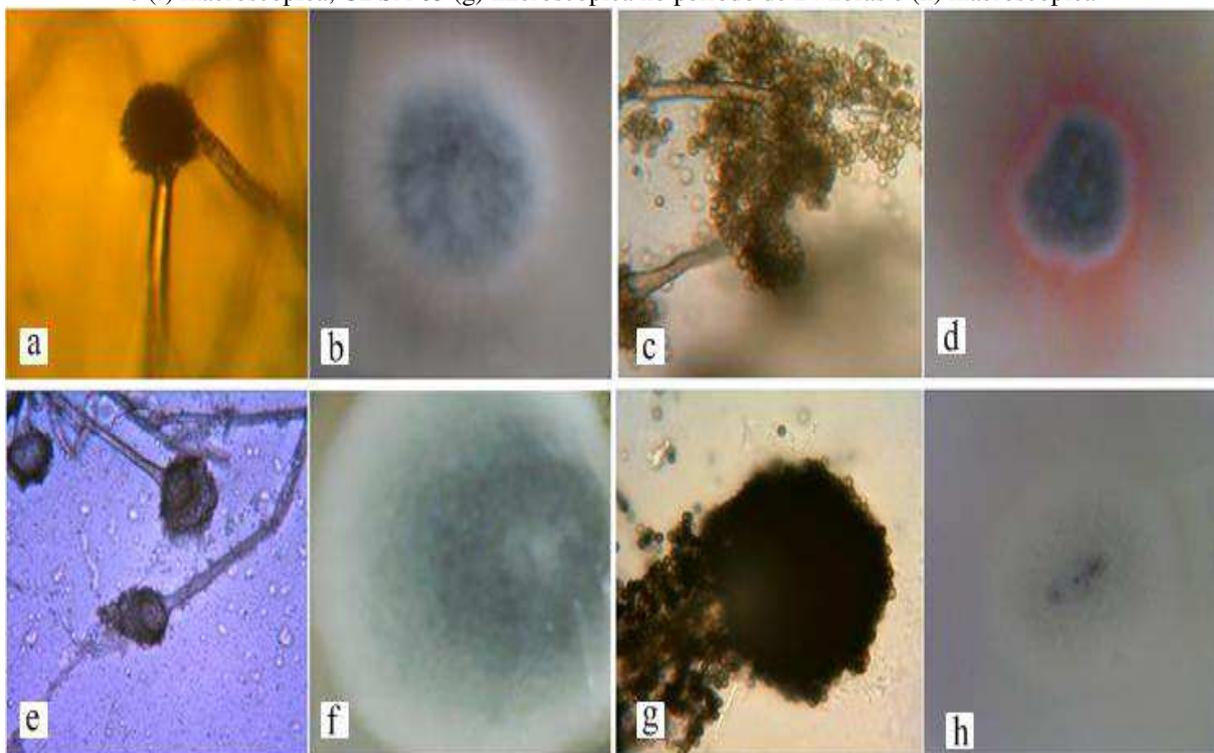
Figura 11 – Estrutura macroscópica e microscópica do CDSA 06, CDSA 07, CDSA 17, CDSA 18, CDSA 20, CDSA 21, CDSA 22, CDSA 66. Representação da estrutura do CDSA 06 (a) microscópica no período de 96 horas e (b) macroscópica, CDSA 07 (c) microscópica no período de 96 horas e (d) macroscópica, CDSA 17 (e) microscópica no período de 24 horas e (f) macroscópica, CDSA 18 (g) microscópica no período de 96 horas e (h) macroscópica, CDSA 20 (i) microscópica no período de 48 horas e (j) macroscópica, CDSA 21 (k) microscópica no período de 24 horas e (l) macroscópica, CDSA 22 (m) microscópica no período de 24 horas e (n) macroscópica, CDSA 66 (o) microscópica no período de 24 horas e (p) macroscópica



Fonte: (a) (m) (o) Leandro Costa; (f) Rayza Morganna.

Na Figura 12 estão ilustrados os isolados CDSA 23, CDSA 24, CDSA 56 e CDSA 65, em que observamos um crescimento interessante, no qual assumem a cor verde com bordas brancas, com um diferencial no CDSA 24 com uma pigmentação avermelhada ao seu redor.

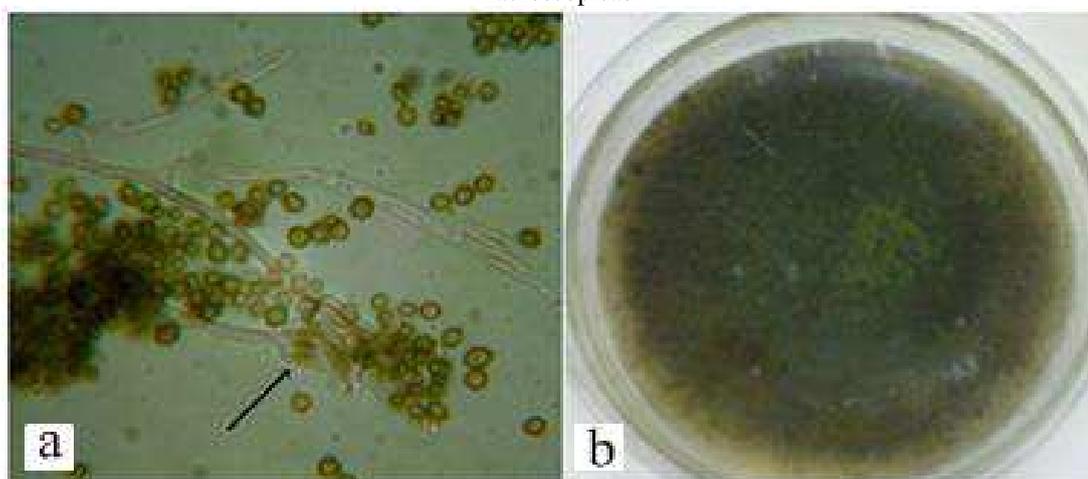
Figura 12 – Estrutura macroscópica e microscópica de CDSA 23, CDSA 24, CDSA 56 e CDSA 65. Representação da estrutura do CDSA 23 (a) microscópica no período de 96 horas e (b) macroscópica, CDSA 24 (c) microscópica no período de 24 horas e (d) macroscópica, CDSA 56 (e) microscópica no período de 24 horas e (f) macroscópica, CDSA 65 (g) microscópica no período de 24 horas e (h) macroscópica



Fonte: (b) (e) (f) (h) Leandro Costa.

O gênero *Penicillium spp.* apresenta conidióforos decorrentes do micélio, ramificado perto do vértice, terminando num grupo de fiáldes, seguido de conídios, assemelhando-se com um pincel (OLIVEIRA, J., 2013). Este gênero caracteriza-se também por apresentar hifas septadas. A partir de análises morfológicas microscópicas, sugere-se que o CDSA 12 assemelha-se com espécie do gênero *Penicillium*, Figura 13.

Figura 13 – Representação do CDSA 12 exibindo suas estruturas (a) microscópicas no período de 48 horas e (b) macroscópicas



Fonte: (a) Leandro Costa.

O gênero *Aspergillus* possui potencial para produção tanto de amilase quanto de celulase. A partir dos testes realizados este fato foi evidenciado, até por que os dez isolados que apresentaram atividade amilolítica foram sugeridos como sendo pertencentes a este gênero, porém notou-se divergência em relação a atividade enzimática visto que alguns isolados demonstraram resultados superiores. Testes de identificação mais aprofundados para detecção da espécie poderia comprovar se este fato estaria relacionado com diferentes espécies de *Aspergillus*. Em relação a atividade celulolítica, foi comprovado também um potencial deste gênero quanto a produção dessa enzima, bem como do gênero *Penicillium*. Esse resultado corrobora com Pazzini, Silva e Araújo (2011), pois estes autores relatam que esses dois gêneros apresentam-se como bons produtores de celulase.

6 CONCLUSÕES

- A prospecção de enzimas a partir de microorganismos isolados da Caatinga, Cariri Paraibano, é de extrema valia para que seja revelada a biodiversidade microbiana desta região que ainda é pouco explorada;
- A dificuldade de reativação de alguns isolados indica a necessidade de uso de métodos distintos para a conservação das culturas (como o método Castellani, por exemplo) para melhor manutenção de suas características, com posterior avaliação dos procedimentos adotados;
- Dentre os isolados avaliados 18 (dezoito) apresentaram atividade, seja para amilase seja para celulase total (FPase), com excelentes valores de IE;
- Os altos valores de IE apresentados por alguns isolados sugere-se que esses isolados podem ser empregados em bioprocessos para produção enzimática;
- Os isolados com atividade enzimática foram identificados como sendo do gênero *Aspergillus spp.* e um deles como sendo do gênero *Penicillium spp.*

REFERÊNCIAS

- ABREU, R. L. **Map locator of Paraíba's Serra Branca city**. Wikimedia Commons, 2006. Disponível em: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Paraiba_Municip_SerraBranca.svg>. Acesso em: 10 jun. 2014.
- AFONSO, L. C. **Produção de celulasas por cultivo em estado sólido e aplicação na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar**. 2012. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica**. Módulo VII, 27 p, 2004.
- AGOSTINI, G. **Desenvolvimento de metodologia para avaliação da degradação enzimática do amido de suco de maçã**. 2011. 32 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- ALMEIDA, M. C. O. *et al.* Análise da Produção de Amiloglucosidase e Alfa-Amilase por *Aspergillus Awamori* através de Fermentação Batelada em Frascos Agitados. In: **Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, 8., 2009, Uberlândia. Uberlândia: UFU, 2009.
- ALVES, F. **Modelagem e Simulação de Biorreator operando com fungos *Trametes Versicolor* para produção de enzima lacase**. 2010. 91 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Centro Universitário, Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, 2010.
- APARECIDO, C. C.; CAMILO, C. M. Comparação de métodos para a preservação de fungos do gênero *Colletotrichum* em laboratório. **Biológico**, São Paulo, v. 75, n.1, p.17-22, jan./jun., 2013.
- ARTICULAÇÃO NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO. **Semiárido**. Recife, 2014. Disponível em: <http://www.asabrazil.org.br/Portal/Informacoes.asp?COD_MENU=105>. Acesso em: 15 abr. 2014.
- AZEVEDO, C. M. A. Bioprospecção – Coleta de Material Biológico com a Finalidade de Explorar os Recursos Genéticos. **Conselho Nacional da Reserva da Biosfera**, São Paulo, 2003. 2. ed., Caderno 17.
- BALKAN, B.; ERTAN, F. Production of α -Amylase from *P. chrysogenum*. **Food Technol. Biotechnol.**, Edirne, v. 45, n. 4, p. 439-442, 2007.
- BARATTO, C. M. *et al.* Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência**, Joaçaba, v. 11, n. 2, p. 15-28, jul./dez. 2011.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 4. ed., 218 p., 1998.
- BAUMER, J. D.; DIEGO, S. M. M. **ENZIMAS**. 121 p, 2008.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, Norwich, v. 18, p. 355–383, 2000.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose Degrading Enzymes and Their Potential Industrial Applications. **Biotechnology Advances**, Reading, v. 15, p. 583-620, 1997.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, aplicações e mercado**. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. 506 p.

BRITES, S. S. O Ensino da Biotecnologia e Microbiologia no 12º ano: procedimentos experimentais. 2006. 226 f. Dissertação (Mestrado em Ensino de Geologia e Biologia) - Universidade de Aveiro, Aveiro, 2006.

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, Beijing, v. 337, p.1291-1296, 2002.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, [S.l.], v. 24, p. 270-276, 1939.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JÚNIOR, N. Produção, Propriedades e Aplicação de Celulases na Hidrólise de Resíduos Agroindustriais. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 33, p.181-188, 2010.

CRUZ, E. A. *et al.* Produção de Alfa-Amilase por *Aspergillus niger* em Resíduo de Cascas de Mandioca. **Unopar Científica Ciências Biológica e da Saúde**, Bahia, v. 13, n. 4, p. 245-9, 2011.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: Uma Introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 510 p. 2004.

FARINAS, C. S. *et al.* **Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulases por fermentação semi-sólida**. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2008. 13 p. (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, ISSN 1678-0434; 22).

FERNANDES, L. P. *et al.* Produção de Amilases pelo Fungo *Macrophomina phaseolina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, [S.l.], v. 4, n. 1, p. 43-51, 2007.

FRANCISCO JUNIOR, W. E. Carboidratos: Estrutura, Propriedades e Funções. **Química Nova na Escola**, [S.l.], n. 29, p. 8-13, ago 2008.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure Appl. Chem**, New Delhi, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GUPTA, R. *et al.* Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, New Delhi, v. 38, p. 1599-1616, 2003.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, New Haven, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

HARGREAVES, P. I. **Bioprospeção de Novas Celulases de Fungos Provenientes da Floresta Amazônica e Otimização de sua Produção sobre Celulignina de Bagaço de Cana**. 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado em tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, 2008.

- HAWKSWORTH, D. L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. **Studies In Mycology**, Madrid, v. 50, p. 9-18, 2004.
- HERNÁNDEZ, M. S. *et al.* Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. **Journal of Food Engineering**, Santiago de Cuba, v. 73, p. 93-100, 2006.
- JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Singapore, v.33, p. 188-20, 2014.
- KUNAMNENI, A., PERMAUL, K., SINGH, S. Amylase Production in Solid State Fermentation by the Thermophilic Fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Durban, v. 100, n. 2, p. 168–171, 2005.
- LAMBERT, W. D. *et al.* The effect of pH on the foam fractionation of b-glucosidase and cellulase. **Bioresource Technology**, [S.l.], v. 87, p. 247-253, 2003.
- LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). **J. Appl. Bacteriol.**, [S.l.], v. 77, n. 3, p. 348-352, 1994.
- LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 65-69, 2002.
- LOPES, M. A.; NASS, L. L.; MELO, I. S. Bioprospecção. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, ano 8, n. 34., jan./jun. 2005.
- LOURENZONI, M. R. *et al.* Brancura Total. **Revista Pesquisa FAPESP**, São Paulo, 193. ed., mar. 2012.
- LYND, L. R. *et al.* Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S.l.], v. 66, n. 3, p. 506-577. 2002.
- MATALLO JÚNIOR, H. A desertificação no Brasil. In: OLIVEIRA, T. S. *et al.* (Ed.). **Agricultura, sustentabilidade e o semi-árido**. Fortaleza: UFC, 2000. p. 89-113.
- MELLO, S. C. M.; REIS, A., SILVA, J. B. T. **Manual de Curadores de Germoplasma – Microorganismos: Fungos Filamentosos**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011. 25 p. (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 335; Documentos / Embrapa Hortaliças, 134).
- MONTEIRO, M. C. P. **Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do Cerrado. 2012. 77 f.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, Goiânia, v.3, n.5, p. 9-10 jan./jun. 2009.
- MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzima: Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.
- NEUFELD, P. M.; OLIVEIRA, P. C. Preservação de dermatófitos pela técnica da água destilada estéril. **Revista Brasileira Análises Clínicas**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 167-169, 2008.

NIELSEN, R. I.; OXENBOLL, K. Enzymes from Fungi: their Technology and Uses. **Mycologist**, Dinamarca, v. 12, p. 69-71, 1988.

NOVOZYMES. 2005. Disponível em: <<http://www.novozymes.com>>. Acesso em: 13 mai. 2014.

OLIVEIRA, A. N. *et al.* Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 853-860, out-dez 2006.

OLIVEIRA, J. C. Atlas de Micologia Médica: Lâminas. **Micologia Médica**, 101 p., 2013.

ORLANDELLI, R. C. *et al.* Enzimas de Interesse Industrial: Produção por Fungos e Aplicações. **Rev. Saúde e Biol.**, Maringá, v.7, n.3, p.97-109, set./dez. 2012. ISSN 1980-0002.

PALMA, M. S.; YAMANE, T.; CAMARGO, A. C. M. **Biodiversidade: Preservação e Bioprospeção**. 2001. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/biodiversidade/bio13.htm>>. Acesso em: 10 abr. 2014.

PANDEY, A. *et al.* Biotechnological potential of agro-industrial residues.I: sugarcane bagasse. **BioresourceTechnology**, v. 74, p. 69-80, 2000.

PANDEY, A. *et al.* Advances in microbial amylases. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 31, p. 135-52, 2000.

PAZZINI, S. S.; SILVA, C. G.; ARAÚJO, J. C. G. Avaliação da atividade de celulase de fungos isolados de solos da região de Tangará da Serra – MT. In: **Ciclo Nacional de Estudos de Biologia**, 1. 2011. ISSN 2175-6392.

PEREIRA JÚNIOR, N.; BON, P. S.; FERRARA, M. A. Séries em Biotecnologia: **Tecnologia de Bioprocessos**. 62 p. Escola de Química, UFRJ. v. 1, Rio de Janeiro, 2008.

QUÍMICA VERDE NO BRASIL. 2010 – 2030. Ed. rev. e atual. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos: Ciência, Tecnologia e Inovação**. Brasília, 2010. 436 p. ISBN 978-85-60755-31-8.

RABALHO, A. A. **Isolamento de Linhagens Microbianas Termofílicas Amilolíticas, Produção, Caracterização e Aplicação das Amilases na Hidrólise do Amido de Mandioca**. 2002. 183 f. Dissertação (Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2002.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. Fungos. In: **Biologia Vegetal**. 5 ed. Rio de Janeiro, 1996. p. 192-225.

ROCHA, T. S.; DEMIATE, I. M.; FRANCO, C. M. L. Características estruturais e físico-químicas de amidos de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v, 28, n. 3, p. 620-628, jul.-set. 2008.

RODRIGUES, E. G.; LÍRIO, V. S.; LACAZ, C. S. Preservação de Fungos e Actinomicetos de Interesse Médico em Água Destilada. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 159-165, mar./abr. 1992.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasil. Bot.**, v.27, n.2, p.205-211, abr./jun. 2004.

SAHNOUN, M. *et al.* Production, purification and characterization of two α -amylase isoforms from a newly isolated *Aspergillus Oryzae* strain S2. **Process Biochemistry**, Tunisia, v. 47, p. 18-25, 2012.

SANTANA, R. S. M. **Produção de Enzimas Amilolíticas através da Fermentação em Estado Sólido**. 2012. 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2012.

SANTOS, J. E. F. *et al.* Avaliação do crescimento de *Aspergillus terreus* isolado em solos de Caatinga. In: **Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão**, 13., Recife, 2013.

SILVA, J. J. *et al.* Produção de Lacase de Fungos Basidiomicetos por Fermentação Submersa com Cascas de Café. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v. 15, n. 2, p. 191-196, 2012.

SILVA, P. D. **Fungos Anamorfos decompositores do folheto de *Caesalpinia echinata* Lam. provenientes de exemplares estabelecidos em áreas com e sem impacto de poluição área**. 2007. 166f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria de Meio Ambiente, São Paulo, 2007.

SILVA, T. M. **Produção e Determinação das Propriedades Funcionais das amilases de *Aspergillus niveus***. 2009. 216 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

SKUJIŃŠ, J.; ALLEN, M. F. Use of mycorrhizae for land rehabilitation. **Mircen Journal**, v. 2, p. 161-176, 1986.

SOUZA, H. Q.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 28, p. 116-124, dez. 2008.

TEIXEIRA, S. I.; GONÇALVES J. I.; VIEIRA, E. Edulcorantes: uso e aplicação na alimentação, com especial incidência na dos diabéticos. **Alimentação Humana**, v. 17, n. 1/2/3, 2011.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Metabolismo Microbiano. In: _____. (Org.). **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 967 p.

TRIBST, A. A. L. Tecnologia acelera atividade de enzimas na produção de alimentos. **Jornal da UNICAMP**, Campinas, p. 9., dez. 2013.

VERISSIMO. A.; MORAIS, P. **Indução e repressão catabólica de b-galactosidase em *E. coli***. Universidade de Coimbra, 9 p, 2006.

WALTER, M.; SILVA, L. P.; EMANUELLI, T. Amido resistente: características físico-químicas, propriedades fisiológicas e metodologias de quantificação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.974-980, jul./ago. 2005.

ZHANG, Y.H.P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n.5, p. 452-481, 2006.