



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS

SUELEN CRISTINA BARBOSA BELO

**PRODUÇÃO DE AMILASE E LIPASE POR FUNGOS FILAMENTOSOS
ISOLADOS DE DIFERENTES TIPOS DE SOLO DE FLORESTA E SAVANA DE
RORAIMA**

Boa Vista, RR

2013

SUELEN CRISTINA BARBOSA BELO

**PRODUÇÃO DE AMILASE E LIPASE POR FUNGOS FILAMENTOSOS
ISOLADOS DE DIFERENTES TIPOS DE SOLO DE FLORESTA E SAVANA DE
RORAIMA**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Recursos Naturais, da Universidade
Federal de Roraima, como parte dos
requisitos para obtenção do Título de
Mestre em Recursos Naturais.

Área de concentração: Bioprospecção

Orientador: Prof. Dr. Marcos José
Salgado Vital

Boa Vista, RR

2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

B452p Belo, Suelen Cristina Barbosa.
Produção de amilase e lipase por fungos filamentosos isolados de diferentes tipos de solo floresta e savana de Roraima / Suelen Cristina Barbosa Belo - Boa Vista, 2013.
101p. : il.

Orientador: Prof. Dr. Marcos José Salgado Vital.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Roraima, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais.

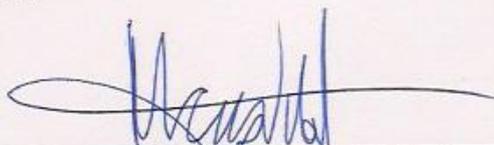
1 – Biotecnologia. 2 – Enzimas hidrolíticas. 3 – Fungos. 4 – Solos. 5 – Roraima. I – Título. II – Vital, Marcos José Salgado (orientador)

CDU – 582.28

SUELEN CRISTINA BARBOSA BELO

Produção de amilase e lipase por fungos filamentosos isolados de diferentes tipos de solo de floresta e savana de Roraima

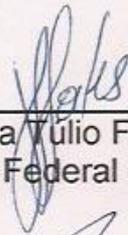
Dissertação apresentada como pré-requisito para conclusão do Curso de Mestrado em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima, defendida em 25 de março de 2013 e avaliada pela seguinte Banca Examinadora:



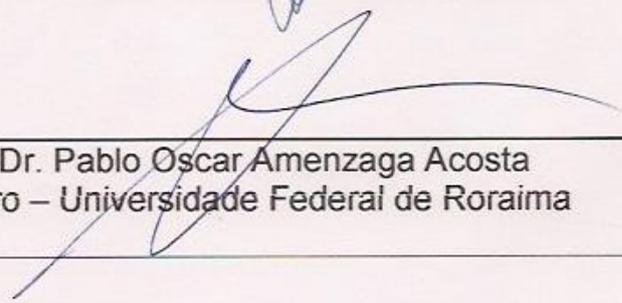
Prof. Dr. Marcos José Salgado Vital
Orientador – PRONAT

Luciana de Oliveira Franco

Profa. Dra. Luciana de Oliveira Franco
Membro – Universidade Federal Rural de Pernambuco



Profa. Dra. Silvana Tullio Fortes
Membro – Universidade Federal de Roraima



Prof. Dr. Pablo Oscar Amenzaga Acosta
Membro – Universidade Federal de Roraima

*A Deus
pela força e fé necessária,
Aos meus pais,
José Flávio Barbosa e
Maria Lúcia de Melo Barbosa,
Meus irmãos
Geovane, Willian, Fellipe e Guilherme,
Meu esposo e companheiro,
Brunno Costa Belo e
Meus tesouros Arthur e Nicolas,
pelo imenso amor e compreensão,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima por possibilitar a realização desta tão sonhada qualificação.

Ao Prof. Dr. Marcos José Salgado Vital, orientador e amigo acima de tudo, obrigada pela paciência e pela confiança creditada na execução deste projeto.

Aos Professores do Curso de Mestrado em Recursos Naturais agradeço as trocas intelectuais e de experiências, que me engrandeceram, sem as quais essa qualificação não seria possível.

A Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki, coordenadora da Rede Norte Nordeste de fungos filamentosos de solos da Caatinga e da Amazônia, pelo apoio necessário à execução deste trabalho e pelos estágios realizados no Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais – NPCIAMB, na Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP.

A Profa. Dra. Luciana de Oliveira Franco pela gentil amizade e receptividade que me dispensou nas idas à Recife, bem como pelo acompanhamento do progresso deste trabalho, mesmo à distância.

Aos bolsistas de iniciação científica, mestrandos e doutorandos do NPCIAMB/UNICAP, agradeço pelo carinho com que fui recebida e pelas amizades feitas nos períodos de estágio. Em especial as amigas Fabíola Almeida, Leonila Acioly, Lúcia Raquel Berger, Marta Cristina Freitas, Manoela Lins e Patrícia Mendes Souza e também ao querido Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva.

Agradeço imensamente a companhia das queridas Grayce Kelli Barbosa, Jaceline Negreiros de Lima e Marcela Leite (minha irmã gêmea) e ao apoio virtual que sanou minhas dúvidas na execução dos protocolos dos testes enzimáticos. Agradeço ainda ao Sr. Humberto de Almeida e Sra. Sônia Maria de Souza por me auxiliarem nas mais diversas necessidades durante o período de estágio.

Aos colegas de turma Izabelle Lopes, Lorenza Cordeiro, Priscila Azarak, Vaneza Pereira e Julian Quitiquerez (bendito fruto) e em especial às “miguxas” Érica Veras e Karulliny Maia, agradeço todos os momentos que dividimos durante essa caminhada, as muitas dificuldades que superamos com forte união, diga-se de passagem, às aulas de estatística!

Um agradecimento mais que especial e merecido a minha “Toddynha” Andréia Alencar por além de ter dividido as coletas e a “bancada” comigo, foi em

muitos momentos meus braços, mãos e pernas durante essa caminhada e provação.

Aos estagiários e bolsistas de iniciação científica dos laboratórios do CBio e do Pronat, Dina Mara Mildred, Eduardo Brito, Jafé Vieira e Rodrigo Lopes por terem me auxiliado inúmeras vezes. E em especial a Mariana Camargo (minha filha adotiva) por ter sido meu braço direito durante as atividades de laboratório.

Agradeço ainda aos meus colegas de trabalho do HEMORAIMA, Setor de Resíduos, pela compreensão e colaboração no dia-a-dia, em amenizar os problemas corriqueiros e deixar minha cabeça tranquila para escrever esta dissertação. Em especial ao colega Diego Almeida, por “segurar a barra” nas minhas ausências e pela hospitalidade da sua mãe, Sra. Rivane, por ter me recebido tão gentilmente durante o período de estágio em Recife.

Agradeço aos meus familiares e amigos sinceros que estiveram ao meu lado em todos os momentos difíceis, por não me deixarem desistir desta luta, mesmo quando o fardo pareceu insuportável.

À Capes e ao CNPq pela bolsa e fomento deste trabalho.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente me auxiliaram e dispensaram palavras de carinho e motivação durante esta caminhada.

RESUMO

Enzimas produzidas por fungos filamentosos têm demonstrado amplas aplicações biotecnológicas nos mais diversos segmentos industriais. Este trabalho teve como objetivo verificar a produção das enzimas amilase e lipase por fungos filamentosos isolados de diferentes tipos de solos do Parque Nacional do Viruá (ambientes de floresta) e do Campus Cauamé – UFRR (ambiente de savana), em Roraima. No PARNA Viruá foi obtida a maior densidade de UFC com $5,9 \times 10^6$ UFC/g de solo, dos quais se agrupou 167 morfotipos de fungos filamentosos. No Campus Cauamé obteve-se $1,1 \times 10^5$ UFC/g de solo, dos quais se agrupou 50 morfotipos. A habilidade das linhagens fúngicas em produzir amilase e lipase foi observada através da hidrólise do amido e tributirina, respectivamente. Foram avaliados 50 isolados de fungos filamentosos do PARNA Viruá, dos quais 18% apresentaram atividade positiva para ambas as enzimas. Dos 20 isolados testados do Campus Cauamé 23% apresentaram atividade positiva para amilase e lipase. Foi realizada a avaliação semiquantitativa da produção enzimática, através do Índice Enzimático (IE) obtido através da razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da zona de degradação, acrescido da área de crescimento da colônia. Na avaliação semiquantitativa da produção de amilase os isolados do PARNA Viruá: VR-SC 134.1 *Aspergillus sp.*, VR-SC 79 *Aspergillus versicolor* e VR-YM 118 tiveram o melhor IE (0.68). Para o Campus Cauamé os melhores IE obtidos foram: 0.44, 0.52 e 0.60, pelos isolados CA-YM 57, CA-YM 115 e CA-YM 33, respectivamente. Na avaliação semiquantitativa da produção de lipase os melhores IE obtidos foram: 0.43, 0.48 e 0.53 pelos isolados do Campus Cauamé CA-YM 32, CA-YM 57 e CA-YM 118, respectivamente. Já para os isolados do PARNA Viruá os melhores IE obtidos foram: 0.62, 0.66 e 0.70 por VR-SC 23, VR-SC 26 *Penicillium sp.* e VR-SC 142 *Penicillium sp.*, respectivamente. De modo geral, os isolados do Campus Cauamé apresentaram os melhores Índices Enzimáticos para ambas as enzimas testadas. Esses resultados demonstram a importância dos fungos filamentosos isolados de diferentes tipos de solo em áreas de florestas e savanas de Roraima como um importante recurso biotecnológico, em especial para produção de enzimas hidrolíticas.

Palavras-chave: Biotecnologia. Enzimas hidrolíticas. Região Amazônica. Solo.

ABSTRACT

Enzymes produced by filamentous fungi have shown broad biotechnological applications in various industrial segments. The present work, as its objective to verify the production of amylase and lipase by filamentous fungi isolated from different types of soil of Viruá National Park (forest environments) and Campus Cauamé – UFRR (savanna environment), in Roraima. In PARNA Viruá was obtained with the highest density of $5,9 \times 10^6$ CFU/g of soil, of which clumped together 167 morphotypes of filamentous fungi. In the Campus Cauamé obtained $1,1 \times 10^5$ CFU/g of soil, which clumped together 50 morphotypes. The ability of fungi strains to produce amylase and lipase were observed by hydrolysis of starch and tributyrin, respectively. We analyzed 50 strains of filamentous fungi of PARNA Viruá, of which 18% showed positive activity for both enzymes. Of the 20 strains tested of Campus Cauamé 23% showed positive activity for amylase and lipase. We performed semiquantitative evaluation of enzyme production through enzymatic indexes (IE) obtained by the ratio between the diameter of the colony and the diameter of the degradation zone, plus the area of colony growth. The semiquantitative evaluation of the production of amylase of strains from PARNA Viruá: VR-SC 134.1 *Aspergillus sp.*, VR-SC 79 *Aspergillus versicolor* and VR-YM 118 showed the best IE (0.68). For the Campus Cauamé the best IE obtained were: 0.44, 0.52 and 0.60, for the isolated CA-YM 57, CA-YM 115 and CA-YM 33, respectively. The semiquantitative evaluation of lipase production the best IE obtained were: 0.43, 0.48 and 0.53 for isolates of Campus Cauamé CA-YM 32, CA-YM 57 and CA-YM 118, respectively. As for the isolates of PARNA Viruá the best IE obtained were: 0.62, 0.66 and 0.70 for VR-SC 23, VR-SC 26 *Penicillium sp.* and VR-SC 142 *Penicillium sp.*, respectively. In general, strains of Campus Cauamé presented the best Enzyme Indexes for both enzymes tested. These results demonstrate the importance of filamentous fungi isolated from various soil types in areas of forest and savanna in Roraima as an important resource, especially for production of hydrolytic enzymes.

Keywords: Biotechnology. Hydrolytic enzymes. Amazon. Soil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Subdivisões e Classes da Divisão <i>Eumycota</i>	17
Figura 2 -	Classificação Internacional das Enzimas.....	29
Figura 3 -	Produção de enzimas por fungos filamentosos segundo diversos autores.....	30
Figura 4 -	Amilase produzida por fungos filamentosos pelos métodos de fermentação submersa (Smf) e fermentação em estado sólido (SSF) de acordo com diversos autores.....	34
Figura 5 -	Lipase produzida por fungos filamentosos pelos métodos de fermentação submersa (Smf) e fermentação em estado sólido (SSF) de acordo com diversos autores.....	37
Figura 6 -	Esquema geral das atividades realizadas visando à seleção de fungos filamentosos produtores das enzimas amilase e lipase.....	39
Figura 7 -	Localização das áreas de estudo, mostrando Campus Cauamé – UFRR e PARNA Viruá, Roraima.....	41
Figura 8 -	Grade do PPBio com 30 parcelas permanentes no PARNA Viruá - RR.....	42
Figura 9 -	Grade Modular com Parcelas Permanentes do PPBio no Campus Cauamé - UFRR.....	44
Figura 10 -	Esquema geral das atividades realizadas visando à obtenção de isolados de fungos filamentosos do solo.....	46
Figura 11 -	Desenho amostral para coleta de amostras de solo em parcela do PPBio.....	46
Figura 12 -	Mapa das unidades geoambientais do PARNA Viruá – RR, indicando as parcelas amostradas.....	48
Figura 13 -	Mapa das classes de solos do Campus Cauamé – UFRR, indicando as parcelas amostradas.....	49
Figura 14 -	Coleta de amostras de solos utilizando trado tipo holandês.....	50
Figura 15 -	Esquema das atividades de processamento das amostras de solo para obtenção de fungos filamentosos.....	51
Figura 16 -	Catação manual e peneiramento das amostras de solo.....	51
Figura 17 -	Esquema das atividades de isolamento de fungos filamentosos	

	das amostras de solo.....	52
Figura 18 -	Inoculação das alíquotas das diluições de amostras de solo do PARNA Viruá em meio de cultura para isolamento de fungos filamentosos.....	53
Figura 19 -	Quantidade de morfotipos de fungos filamentosos de diferentes tipos de solos do PARNA Viruá – RR, nos meios de cultura Sabouraud (SB) e Yeast Malt Agar (YMA).....	64
Figura 20 -	Quantidade de morfotipos de fungos filamentosos de diferentes tipos de solos do Campus Cauamé – UFRR, nos meios de cultura Sabouraud (SB) e Yeast Malt Agar (YMA).....	66
Figura 21 -	Caracterização das colônias de fungos filamentosos isolados de diferentes tipos de solos do PARNA Viruá – RR.....	69
Figura 22 -	Caracterização das colônias de fungos filamentosos isolados de diferentes tipos de solos do Campus Cauamé –UFRR.....	69
Figura 23 -	Halos característicos da detecção da atividade de amilase (A) e da atividade de lipase (B) por isolados de fungos filamentosos de solo do PARNA Viruá – RR.....	80
Figura 24 -	Halos característicos da detecção da atividade de amilase (A) e da atividade de lipase (B) por isolados de fungos filamentosos de solo do Campus Cauamé –UFRR.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número de espécies de fungos por Região Política do Brasil e Domínio Fitogeográfico.....	21
Tabela 2 -	Descrição do ambiente/solo das parcelas amostradas no PARNA Viruá – RR.....	47
Tabela 3 -	Descrição do ambiente/solo das parcelas amostradas no Campus Cauamé – UFRR.....	47
Tabela 4 -	Densidade de Unidades Formadoras de Colônias de fungos filamentosos isolados de amostras de solos das parcelas do PPBio no PARNA Viruá - RR.....	58
Tabela 5 -	Densidade de Unidades Formadoras de Colônias de fungos filamentosos isolados de amostras de solos das parcelas do PPBio no Campus Cauamé - UFRR.....	61
Tabela 6 -	Quantidade de morfotipos de fungos filamentosos isolados de diferentes tipos de solos do PARNA VIRUÁ, nos meios de cultura Sabouraud (SB) e Yeast Malt Agar (YMA).....	64
Tabela 7 -	Quantidade de morfotipos de fungos filamentosos isolados de diferentes tipos de solos do Campus Cauamé nos meios de cultura Sabouraud (SB) e Yeast Malt Agar (YMA).....	66
Tabela 8 -	Riqueza de fungos filamentosos representada pelo número absoluto de morfotipos isolados de diferentes tipos de solos e ambientes do PARNA Viruá – RR.....	67
Tabela 9 -	Riqueza de fungos filamentosos representada pelo número absoluto de morfotipos isolados de diferentes tipos de solos e ambientes do Campus Cauamé – UFRR.....	67
Tabela 10 -	Resultado do teste qualitativo para produção de amilase e lipase por fungos filamentosos isolados de solos do PARNA Viruá - RR....	74
Tabela 11 -	Resultado do teste qualitativo para produção de amilase e lipase por fungos filamentosos isolados de solos do Campus Cauamé – UFRR.....	76
Tabela 12 -	Resultado da avaliação semiquantitativa da atividade de amilase dos isolados de fungos filamentosos de solos do PARNA Viruá ...	82

Tabela 13 -	Resultado da avaliação semiquantitativa da atividade de amilase dos isolados de fungos filamentosos de solos do Campus Cauamé – UFRR.....	83
Tabela 14 -	Resultado da avaliação semiquantitativa da atividade de lipase dos isolados de fungos filamentosos de solos do PARNA Viruá – RR....	85
Tabela 15 -	Resultado da avaliação semiquantitativa da atividade de lipase dos isolados de fungos filamentosos de solos do Campus Cauamé – UFRR.....	86

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.2	FUNGOS: CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	16
1.2.1	Isolamento de fungos filamentosos de solo no Brasil	25
2	FUNGOS E ENZIMAS.....	27
2.1	Produção de enzimas por fungos filamentosos isolados na Amazônia	30
2.1.2	Seleção de linhagens fúngicas produtoras de enzimas	31
2.3	ENZIMAS HIDROLÍTICAS.....	32
2.3.1	Amilase	33
2.3.2	Lipase	35
2.4	AVALIAÇÃO SEMIQUANTITATIVA PELO MÉTODO DO ÍNDICE ENZIMÁTICO.....	36
3	OBJETIVOS	38
3.1	OBJETIVO GERAL.....	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO.....	40
4.1.1	Parque Nacional do Viruá	40
4.1.1.1	Caracterização Climática do PARNA Viruá.....	40
4.1.1.2	Caracterização Fitofisionômica e Pedológica do PARNA Viruá.....	43
4.1.2	Campus do Cauamé	43
4.1.2.1	Caracterização Climática do Campus Cauamé.....	43
4.1.2.2	Caracterização Fitofisionômica e Pedológica do Campus Cauamé.....	45
4.2	OBTENÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS DE AMOSTRAS DE SOLO.....	45
4.2.1	Desenho amostral e amostragem	45
4.2.2	Coleta e processamento das amostras de solo	50
4.2.3	Isolamento de fungos filamentosos de solo	51
4.2.4	Quantificação do número total de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)	52
4.2.5	Agrupamento, purificação e manutenção de culturas puras de fungos filamentosos	53
4.2.6	Caracterização Morfológica de fungos filamentosos	54
4.3	SELEÇÃO DE LINHAGENS PRODUTORAS DE AMILASE E LIPASE....	54
4.3.1	Preparo do Inóculo para teste enzimático	55
4.3.2	Teste qualitativo para atividade de amilase	55
4.3.3	Teste qualitativo para atividade de lipase	56
4.3.4	Avaliação semiquantitativa da produção enzimática	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	57
5.1	ISOLAMENTO E DENSIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS.....	57
5.1.1	Parque Nacional do Viruá	57
5.1.2	Campus do Cauamé	60
5.2	AGRUPAMENTO EM MORFOTIPOS DE FUNGOS FILAMENTOSOS....	63
5.2.1	Parque Nacional do Viruá	63
5.2.2	Campus do Cauamé	65
5.3	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS DE FUNGOS	68

	FILAMENTOSOS.....	
5.4	MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS DE FUNGOS FILAMENTOSOS.....	71
5.5	SELEÇÃO DE LINHAGENS PRODUTORAS DE AMILASE E LIPASE....	73
5.6	AVALIAÇÃO SEMIQUANTITATIVA DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....	80
5.6.1	Produção de amilase	81
5.6.2	Produção de Lipase	84
6	CONCLUSÕES	88
	REFERÊNCIAS	90

1 INTRODUÇÃO

Um dos campos da biotecnologia que tem se destacado com pesquisas promissoras é o de tecnologia enzimática. Essa área visa o melhoramento dos processos industriais, tornando-os mais eficientes, requerendo menos recursos naturais renováveis e conseqüentemente, gerando menos poluentes.

Nesse contexto, as enzimas microbianas têm sido consideradas como alternativa para usos industriais frente à diversidade de enzimas isoladas de outros organismos. Isso se deve principalmente à facilidade de produção, uma vez que esse processo pode ser realizado em “bancada”, e de extração, pois grande parte das enzimas microbianas é de produção extracelular. Ressalta-se ainda que, uma vez produzida, a enzima poderá atuar independente da célula de origem, desde que mantidas as condições adequadas de pH, temperatura entre outras.

A prospecção de linhagens microbianas com potencial para uso biotecnológico, especialmente de fungos, está fundamentada na capacidade de adaptação destes micro-organismos aos mais diversos ambientes. Isso se deve à sua diversificação ao longo do processo evolutivo, o que proporcionou a esses micro-organismos ampla diversidade genética e metabólica.

Os fungos podem ser isolados dos mais diversos habitats e, representam uma excelente fonte de produtos biológicos, principalmente por sua diversidade bioquímica, pela facilidade de cultivo e de manipulação genética, o que proporciona ao homem explorar, sob condições adequadas e controladas, seus metabólitos bioativos.

A produção de enzimas extracelulares por fungos filamentosos têm demonstrado amplas aplicações biotecnológicas nas mais diversas áreas industriais, por suas características catalíticas, relacionadas com estabilidade, seletividade e especificidade do substrato.

Devido às facilidades de exploração dos metabólitos bioativos, uma grande variedade de segmentos industriais utilizam enzimas de origem fúngica, tais como, indústrias têxteis, de papel e celulose, detergentes, alimentos, biocombustíveis e de produtos médicos e farmacêuticos. Dentre a diversidade de enzimas produzidas por fungos filamentosos, tais como celulasas, xilanases, proteases e tanases, destacam-se as amilases e lipases.

Na busca por micro-organismos com potencial para o uso em biotecnologia, considera-se a premissa de que esses organismos podem ser isolados dos mais diversos ambientes. No entanto, habitats pouco explorados podem ser fonte de seleções ainda desconhecidas ou pouco estudadas, que merecem ser pesquisadas.

Os ambientes amazônicos como no caso do Estado de Roraima, representa um campo vasto a ser explorado com vistas à biotecnologia, principalmente com relação à produção de enzimas microbianas. O Estado possui uma diversidade de tipos de solos, de fitofisionomias, de nichos e de micro-habitas ainda pouco ou totalmente inexplorados, que podem ser fontes de linhagens de micro-organismos interessantes para o uso biotecnológico.

Ressalta-se que o conhecimento sobre a microbiota do solo no Estado de Roraima ainda é incipiente, o que justifica o isolamento e a identificação de linhagens, especialmente de fungos filamentosos. Dessa forma, o isolamento com o foco em prospecção enzimática, em especial de amilase e lipase, as quais vêm despontando entre as enzimas com diversas utilizações em segmentos industriais faz-se necessário.

O presente estudo trata do isolamento e seleção de linhagens de fungos filamentosos, produtores das enzimas amilase e lipase, os quais foram isolados de diferentes tipos de solos em duas áreas no Estado de Roraima, sendo uma Unidade de Conservação, o Parque Nacional do Viruá, representando os ambientes de florestas e, um Campus experimental da Universidade Federal de Roraima, Campus Cauamé, representando o ambiente de savana.

Esse trabalho foi estruturado em seções que trazem o referencial teórico que embasaram o estudo, os objetivos que conduziram esta pesquisa, os materiais e métodos utilizados nos experimentos e resultados e conclusões obtidos.

Visando a melhor compreensão do tema, este Referencial Teórico foi subdividido em itens: inicialmente o tópico “Fungos - Considerações Gerais” versará sobre aspectos gerais deste Reino, suas subdivisões e classes, modo de vida, importância, reprodução, visão geral do conhecimento sobre diversidade no Brasil e no mundo e isolamento destes micro-organismos em solos no Brasil. O segundo tópico “Enzimas e Fungos”, trás uma visão geral da pesquisa de enzimas de origem fúngica e o último “Enzimas Hidrolíticas” considera as enzimas que foram o foco desse trabalho: amilase e lipase.

1.2 FUNGOS: CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os fungos historicamente foram considerados como plantas primitivas ou degeneradas, com ausência de clorofila. No entanto, a ideia de formas fúngicas como um Reino distinto das plantas e animais foi proposto por Wittaker em 1969, e gradualmente passou a ser aceito pela comunidade científica. A maior parte dos fungos pertence à divisão *Eumycota*, porém, outros estão classificados nos Reinos Protozoa e Chromista. Em consequência, o termo “fungi” é usado para o coletivo de organismos tradicionalmente estudados por micologistas em todos os três reinos (HAWKSWORTH, 1991; ABDEL-AZEEM, 2010).

Evolutivamente considera-se como hipótese mais viável, que os organismos do Reino *Fungi* estejam mais próximos ao Reino *Animalia*, que ao Reino *Plantae*. Isso se deve a algumas de suas características, como a presença de quitina, flagelo posterior, o produto de reserva ser o glicogênio e por seu código mitocondrial codificar triptofano (LOGUERCIO-LEITE, 2004).

O Reino dos Fungos proposto por Wittaker possui duas divisões: *Myxomycota* e *Eumycota*. Na primeira estão os fungos gelatinosos, conhecidos por Myxomycetes, e na segunda os fungos verdadeiros. Estes últimos podem apresentar sua fase vegetativa na forma de duas unidades morfológicas básicas, unicelulares, como as leveduras, ou filamentosos (LACAZ et al., 1998).

Ao nível de Reino, esses organismos são separados por categorias de *Filos* ou *Divisões* baseado principalmente nas estruturas esporuladoras originadas por via sexual. Dessa forma, foram classificados em quatro Filos ou Divisões:

Chytridiomycota ou *Mastigomycotina*, *Zygomycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota* (LOGUERCIO-LEITE, 2004).

Chytridiomycota ou *Mastigomycotina* produzem zigotos flagelados e estão presentes em ambientes aquáticos e no solo, necessitando de água para a reprodução. *Zygomycota* produzem zoósporos, são terrestres, saprófitos no solo e esterco, além de serem parasitas de insetos. *Ascomycota* produzem ascósporos, são terrestres, saprófitos e patógenos de plantas. Os *Basidiomycota* são terrestres, saprófitos, formam basídios e basidiósporos encerrados em basidiocarpos, sendo comumente chamados de cogumelos (LOGUERCIO-LEITE, 2004; MORTON, 2005).

Porém, para alguns fungos ainda não foi possível demonstrar a produção de estruturas esporuladoras por via sexual. Estes são denominados fungos mitospóricos, onde se observa apenas a produção de fases anamórficas, com a reprodução através de esporos assexuais: clamidósporos, artrósporos e conidiósporos. Estes fungos passaram a ser classificados em categorias artificiais, sem base filogenética, denominada *Deuteromycota*, que compreendem os *Fungi Imperfectii* (LOGUERCIO-LEITE, 2004).

A figura 1 esquematiza as Subdivisões e Classes da Divisão *Eumycota*, trazendo as cinco subdivisões propostas por Ainsworth, Sparrow e Sussman (1973) citado por Lacaz et al. (1998), sendo esta a classificação adotada neste trabalho.

Figura 1- Subdivisões e Classes da Divisão *Eumycota*. Fonte: Construído a partir de Lacaz et al. (1998).

Divisão <i>Eumycota</i>	
Subdivisão	Classe
<i>Mastigomycotina</i>	<i>Chytridiomycetes, Hyphochytridiomycetes, Oomycetes</i>
<i>Zygomycotina</i>	<i>Zygomycetes, Trichomycetes</i>
<i>Ascomycotina</i>	<i>Hemiascomycetes, Plectomycetes, Pyrenomycetes, Discomycetes, Laboulbeniomycetes, Loculoascomycetes</i>
<i>Basidiomycotina</i>	<i>Teliomycetes, Hymenomycetes, Gasteromycetes</i>
<i>Deuteromycotina</i>	<i>Blastomycetes, Hyphomycetes, Coelomycetes</i>

A nova classificação do reino dos fungos proposta por Hibbett et al. (2007) com base em análises recentes da filogenia molecular, considera 7 filos:

Chytridiomycota, *Blastocladiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Microsporidia*, *Glomeromycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota*. No entanto, não reconhece *Zygomycota*, e ainda o separam em 4 subfilos (*Mucoromycotina*, *Kickxellomycotina*, *Zoopagomycotina* e *Entomophythoromycotina*). Assim, na nova classificação, o reino dos fungos apresenta: 7 filios, 10 subfilios, 35 classes, 12 subclasses e 129 ordens.

Os fungos são organismos heterotróficos que obtêm carbono e outros nutrientes da matéria orgânica. Esses nutrientes são adquiridos por absorção, através da liberação de enzimas digestivas no ambiente externo, que atuam hidrolizando moléculas grandes e complexas em moléculas menores e mais solúveis (LOGUERCIO-LEITE; ESPOSITO, 2004; MORTON, 2005; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Através do processo de nutrição, esses micro-organismos atuam na ciclagem dos compostos orgânicos, uma vez que decompõem a matéria orgânica morta, tornando os nutrientes disponíveis para os próximos organismos da cadeia trófica. São capazes também de metabolizar carboidratos complexos, tais como lignina, que as bactérias não utilizam como nutriente, aumentando sua função de recicladores primários da matéria orgânica em sistemas florestais (LOGUERCIO-LEITE; ESPOSITO, 2004; MORTON, 2005; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os fungos são organismos ubíquos, ou seja, estão presente nos mais diversos ambientes, podendo ser saprófitos, parasitas e simbioses, crescendo melhor em pH 5,0. Além do mais, seus esporos que apresentam inúmeros tipos morfológicos, podem dispersar-se por longas distâncias através das correntes de ar, o que aumenta seu caráter de ubiquidade. Com relação ao teor de oxigênio, são essencialmente aeróbicos, existindo algumas leveduras anaeróbicas facultativas. Quanto à pressão osmótica, a maioria é mais resistente quando comparado com as bactérias, podendo crescer em substâncias com baixo grau de umidade e necessitando de menos nitrogênio (MORTON, 2005; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A capacidade dos fungos estarem presentes nos mais diversos ambientes deve-se também ao fato de terem se diversificado ao longo do processo evolutivo, para se adaptarem a uma grande variedade de substratos e habitats. Isso faz com que diferentes espécies requeiram condições diferentes para um crescimento ótimo (GRIMM et al., 2005).

Com relação à diversidade, os fungos compõem o segundo grupo mais rico em espécies, com estimativas de 1,5 milhões. No entanto, somente 70 mil espécies

foram identificadas, o que representa que apenas 5% do número estimado de fungos estão descritos, e que falta descrever 95%. Essa afirmação implica que 1,43 milhões de espécies permanecem desconhecidas, contudo, cerca de 1.700 novas espécies são descobertas a cada ano (HAWKSWORTH, 1991; BLACKWELL, 2011).

Por outro lado, o número de habitats com potencial para descoberta de novas espécies de fungos é enorme, como por exemplo, o solo e a liteira, que continuam a ser fonte de fungos incomuns. Nesse aspecto, pesquisas utilizando métodos seletivos para isolamento de fungos do solo, como o isolamento com baixa temperatura para microfungos e basidiomicetos, têm demonstrado grupos inteiros que anteriormente eram ignorados, mesmo em substratos relativamente bem estudados como os citados (HAWKSWORTH; ROSSMAN, 1997).

Parece existir consenso entre alguns autores (HAWKSWORTH, 1991; HAWKSWORTH; ROSSMAN, 1997; BLACKWELL, 2011) em afirmar que a diversidade de fungos nos trópicos é maior que em regiões temperadas, além disso, que faltam referências em diversidade de fungos em países tropicais, e que nichos ecológicos pouco pesquisados podem gerar novidades. Com base nestas informações, Hawksworth (2001) observou que entre os anos de 1990 a 1999, 60% das espécies de fungos descritos foram provenientes de regiões tropicais, incluindo o Brasil. Os 40% restantes foram isolados em outras regiões, incluindo a Índia, que se destacou como uma forte geradora de novas descrições, seguida pelos Estados Unidos, Austrália, China e França. Esse autor afirma ainda, que lugares novos em pesquisas podem produzir 95% de espécies desconhecidas para a ciência.

Alguns autores (HAWKSWORTH, 1991; HAWKSWORTH; ROSSMAN, 1997; BLACKWELL, 2011) ressaltam que os trópicos possuam a maior biodiversidade do mundo, e que pouco se conhece sobre a complexa diversidade desses ambientes. Neste contexto podemos incluir a região amazônica, que apresenta a maior área florestada do planeta, e que requer esforço para o conhecimento de sua diversidade fúngica, a qual é ainda bastante incipiente. Desta forma, esse ecossistema apresenta enorme potencial na geração de descrições de fungos ainda desconhecidos pela ciência. Borneman e Triplet (1997) e Vital e Zilli (2010) ressaltam ainda o agravante de a região amazônica ser a mais carente em pesquisas e pesquisadores, principalmente na área de microbiologia do solo.

Com a preocupação em divulgar o conhecimento sobre a diversidade brasileira, o catálogo de plantas e fungos do Brasil do Instituto de Pesquisas Jardim

Botânico do Rio de Janeiro (FORZZA et al., 2010) mostra a dimensão do conhecimento em se tratando de plantas e fungos. Esse catálogo registra um total de 3.608 espécies fúngicas, o que corresponde a 3,7% das descritas mundialmente, com um nível de endemidade de 14,5%. Porém, esses números ainda estão longe da estimativa prévia para as espécies fúngicas, realizada por Lewinsohn e Prado (2005) de pouco mais de 14.000 espécies, correspondendo a 14% das descritas mundialmente.

Forzza et al. (2010) observam que a dificuldade em se fazer uma lista em diversidade fúngica, deve-se principalmente ao tamanho microscópico de algumas espécies e pela falta de estudos devido a problemas relacionados com a coleta, análise e determinação taxonômica desse grupo. Esses autores relatam ainda a dificuldade de se analisar a diversidade brasileira tanto por região política quanto por domínio fitogeográfico. As regiões que concentram um grande número de pesquisadores ativos, com o maior esforço de coleta e registro de espécies, coincidem com o domínio brasileiro reportado como megadiverso, a Mata Atlântica.

Particularmente no caso dos fungos, com grupos de pesquisa bastante coesos no Recife e no eixo Rio-São Paulo, os números de espécies registradas no catálogo de plantas e fungos do Brasil mostram que o Nordeste do Brasil ultrapassou o Sudeste, enquanto o domínio Caatinga ultrapassou os números da Amazônia e do Cerrado, como mostrado na tabela 1. Esse catálogo registra para Roraima uma riqueza de 75 espécies de fungos, com nenhum registro de espécie endêmica, ficando a frente apenas do Acre com 61, Maranhão com 52, Espírito Santo com 45 e Tocantins com 05 (FORZZA et al., 2010).

Hyde (2001) afirma que alguns habitats e nichos devem ser considerados na busca por fungos ainda não descritos, principalmente nos trópicos. Estes ambientes incluem os aquáticos e o solo de florestas úmidas, as quais são produtoras de grande quantidade de madeira e liteira, degradada por fungos do solo ou do dossel, que liberam nutrientes de volta para a floresta. Esse autor ressalta a preocupação de que o conhecimento sobre fungos em alguns habitats pode não ter sido explorado o suficiente, como por exemplo, a madeira em lagos ácidos tropicais, vários substratos lignocelulósicos em ambientes aquáticos e muitos outros substratos em florestas úmidas, assim como a associação de fungos com palmeiras e insetos. E ainda a relação desses micro-organismos com o ambiente, se são espécies ubíquas ou de ocorrência específica.

Tabela 1- Número de espécies de fungos por Região Política do Brasil e Domínio Fitogeográfico. Fonte: Construído a partir de Forzza et al. (2010).

Região Política do Brasil	Números de Espécies de Fungos	Domínio Fitogeográfico	Números de Espécies de Fungos
Norte	743	Amazônia	519
Nordeste	1.749	Mata Atlântica	1.664
Centro-Oeste	296	Cerrado	291
Sudeste	1.411	Caatinga	734
Sul	1.320	Pampa	01
		Pantanal	28
	Total 5.519		Total 3.237

Alguns autores (MULLER; SCHMIT, 2007; SCHMIT; MULLER, 2007) ressaltam ao nível de discussão sobre a diversidade global de fungos, a necessidade de levantamento de dados sobre distribuições biogeográficas, níveis de endemismo e níveis de especificidade, uma vez que é consenso que os fungos são um grupo pouco conhecido, porém extremamente diverso, que apresenta papel chave nos ecossistemas, seja como decompositores, mutualistas ou patógenos, além de na maioria dos casos, o papel individual desses organismos na natureza permanecer desconhecido. Esses autores fazem inferência a um limite inferior da diversidade de fungos, estimando em no mínimo 712.285 espécies em todo o mundo, sendo que mais de 82% são de espécies associadas a plantas terrestres, onde aproximadamente 13% já foram descritos.

Destacando a preocupação sobre a incipiência do conhecimento sobre a diversidade fúngica, Blackwell (2011) relata que, no *Dicionary of Fungi*, edição de 2008, cerca de 99.000 espécies fúngicas estão descritas na entrada do “número de fungos”, sendo em sua grande maioria ascomycetos e basidiomycetos; enfatiza a necessidade de melhor amostragem em muitas regiões e habitats do mundo, para a descoberta de fungos, principalmente de fungos microscópicos.

Gams (2007) relata que os fungos do solo se espalham facilmente e que a maioria é considerada como tendo uma distribuição cosmopolita. Afirma ainda que, mesmo em florestas tropicais muitos táxons são semelhantes aos encontrados em solos de regiões temperadas. Além do mais, outros autores (BASS; RICHARDS,

2011; BLACKWELL, 2011) afirmam que a falta de conhecimento sobre a diversidade fúngica real e as lacunas em heterogeneidade de habitats, relações de espécie-área e estrutura biogeográfica global, podem ser sanadas com um maior esforço amostral e com o uso das técnicas moleculares.

A importância econômica dos fungos está relacionada principalmente à saúde humana e a produção de alimentos. Na indústria farmacêutica muitos produtos são feitos por fungos ou baseados em seus biocompostos. No setor químico esses organismos são importantes produtores de ácidos orgânicos, como ácido cítrico produzido por *Aspergillus niger*. Outros usos incluem a indústria petroquímica com a produção de etanol, a fermentação de óleos e outros produtos vegetais, a indústria de papel e celulose, através da ação enzimática visando à hidrólise de moléculas complexas de celulose e lignina. Nesse contexto, o uso industrial das enzimas obtidas especialmente de *Aspergillus* e *Trichoderma* sp. são os mais diversos, os quais incluem celulasas, lacases, lipases, pectinases, proteases e xilanases (HAWKSWORTH, 2009).

Segundo Bull, Ward e Goodfellow (2000) a biotecnologia está baseada na busca e descoberta de recursos biológicos exploráveis, sendo reconhecida como a chave tecnológica do século XXI. Esta área da ciência constitui ferramenta indispensável para a demanda do mercado econômico e industrial por tecnologias sustentáveis, otimização de energias a partir de recursos naturais, por produtos de limpeza e processos industriais com menos emissão de poluentes. Em consequência disso, a biotecnologia microbiana está entre as maiores geradoras de novos conhecimentos à ciência, onde a prospecção de micro-organismos em solos e habitats pouco explorados mostra-se uma fonte de recurso de novos compostos bioativos.

Analisando a prospecção de fungos do solo, podemos definir solo, segundo Meurer (2010), como um corpo natural que se constitui de mistura das fases: sólida, líquida e gasosa, sendo um ambiente heterogêneo do ponto de vista microbiológico, onde estão presentes complexas comunidades microbianas, nas mais diversas associações, contribuindo assim, para o funcionamento equilibrado dos ecossistemas.

O solo é um habitat de alta diversidade de fungos, a qual é mais elevada próximo de material orgânico, tais como raízes e exsudados de raiz. Um número elevado de fungos microscópicos ocorre em solo puro, os quais são em grande parte

ascomicetos e alguns zigomicetos. Estima-se que 3.150 espécies de fungos de solo são conhecidas, e aproximadamente 70% estão disponíveis em cultura. Contudo, atualmente há uma elevada taxa de isolamento de novas espécies, mesmo em habitats bem amostrados como o solo (BLACKWELL, 2011).

Os fungos filamentosos que ocorrem nos solos estão distribuídos nas divisões: *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Deuteromycota*, os quais diferem-se das leveduras por serem multicelulares e possuírem um soma (corpo) filamentoso, formado por hifas que por sua vez se reúnem em um micélio, o qual pode ser visualizado a olho nu, como um emaranhado de fios delgados variando do hialino ao colorido dependendo da espécie (LOGUERCIO-LEITE; ESPOSITO, 2004).

As espécies de fungos filamentosos quando visualizadas ao microscópio ótico podem apresentar dois tipos básicos de hifas: septadas e cenocíticas (asseptadas). As hifas septadas apresentam paredes transversais (septos), as quais dividem as hifas em unidades celulares uninucleadas. Nas classes *Chytridiomycota* e *Zygomycota* as hifas não contêm septos, ou seja, são cenocíticas, e apresentam-se como células longas e contínuas com muitos núcleos (LOGUERCIO-LEITE; ESPOSITO, 2004).

A densidade e diversidade dos fungos filamentosos do solo podem ser avaliadas de forma indireta através do cultivo em meios nutritivos, embora haja grande limitação desse método frequentemente adotado, uma vez que estima-se que cerca de 1% ou menos dos micro-organismos do solo sejam cultiváveis, isto é, apresentam crescimento em meio de cultura. No entanto, as contagens em meio de cultura continuam sendo uma ferramenta útil em estudos comparativos ou para micro-organismos específicos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Esses autores afirmam que a avaliação de determinados micro-organismos em meio de cultura deve considerar seus requerimentos nutricionais específicos, além de requerimentos ambientais, como pH e temperatura.

Colen (2006) salienta que para cultivar um micro-organismo é necessário empregar uma fonte de energia, disponibilizar nutrientes que forneçam materiais essenciais para a formação de biomassa, evitar a presença de inibidores de crescimento e submetê-lo as condições ambientais favoráveis. Desta forma, a formulação dos meios de cultura atende aos três primeiros parâmetros, que

conjuntamente às condições ambientais nas quais o micro-organismo é cultivado, contribuem significativamente para a viabilidade do inóculo.

Alguns fungos requerem ainda fatores de crescimento, principalmente vitaminas, além de micronutrientes como o ferro, zinco, cobre, manganês e molibidênio, que são essenciais para seu crescimento. Em consequência, alguns inóculos podem perder a viabilidade em decorrência do não fornecimento destes elementos em um meio de cultura sintético (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2004, COLEN, 2006).

Os fatores do ambiente, como temperatura, grau de umidade, pH e aeração, têm grande influência sobre o crescimento dos fungos, de modo que, distintas espécies possuem diferentes ótimos e podem crescer dentro de uma faixa para cada fator. Todos esses fatores ambientais podem se converter em fatores de estresse para o fungo ou mesmo restringir seu crescimento quando se afastam da faixa ótima requerida pela espécie (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2004).

Uma vez crescidos nos meios de cultivo, os fungos filamentosos podem ser isolados em cultura pura, ou seja, separados de uma comunidade microbiana mista, por repicagens sucessivas de colônias isoladas, para meio de cultura em placa onde culturas puras poderão ser distinguidas por suas características fenotípicas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Os aspectos das macrocolônias dos fungos filamentosos são de grande importância na identificação preliminar de uma determinada espécie. Na caracterização da cultura devem ser observadas as seguintes características: tamanho da colônia em relação a um determinado tempo de crescimento, características das bordas, textura, relevo e pigmentação, tanto da colônia, quanto pigmentação difusível no meio (SIDRIM; ROCHA, 2004).

As estruturas de reprodução sexuais (gametângios) e assexuais (conídios, esporângios, artroconídios e blastoconídios) são aspectos microscópicos fundamentais para a diferenciação dos grupos. Para sua visualização é necessário fazer lâminas das culturas para observação ao microscópio ótico, sendo o microcultivo fúngico uma das técnicas frequentemente utilizadas (SIDRIM; ROCHA, 2004).

A grande dificuldade na classificação/identificação das espécies fúngicas está associada ao fato de que a taxonomia do grupo envolve classificações de *taxa* baseados em aspectos morfológicos com a observação sistemática de várias características, tanto macroscópicas, quanto microscópicas, os quais são aplicados

às chaves de identificação. Tarefa esta que demanda tempo, dedicação e expertise por parte do pesquisador (BAKRI; MAGALI; THONART, 2009).

Em diversos casos, os taxonomistas têm dificuldades para determinar quais são os caracteres que realmente definem uma espécie ou gênero. Além do mais, fases assexuadas (teleomórficas) e sexuadas (anamórficas) de um mesmo genótipo, são classificadas como espécies distintas (AZEVEDO; ARAÚJO; INÁCIO, s/d).

As técnicas moleculares vêm contribuindo de forma significativa para a classificação e identificação dos fungos, para o melhor entendimento das relações filogenéticas entre as diferentes espécies fúngicas, e conseqüentemente, melhorando a classificação das novas espécies (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; BAKRI; MAGALI; THONART, 2009).

1.2.1 Isolamento de fungos filamentosos de solo no Brasil

Hawksworth (1991) cita como pioneiro para a Amazônia o trabalho de Chaves Batista, que descreveu aproximadamente 3.500 novas espécies de fungos entre 1954 e 1972 isolados de ambientes amazônicos.

Schoenlein-Crusius e Milanez (1998) isolaram fungos microscópicos a partir de ambientes aquáticos e do solo da Mata Atlântica, na Reserva Biológica de Paranapiacaba, São Paulo, onde obtiveram para ambos os ambientes o total de 1.770 ocorrências de diferentes táxons de fungos. Para o solo obtiveram o total de 405 ocorrências distribuídas entre os filos *Deuteromycota*, *Zygomycota*, *Mastigomycota* e *Ascomycota*.

Em outro estudo também na Mata Atlântica, em Cubatão, São Paulo, os autores realizaram amostragem de água, solo e folheto misto, onde obtiveram como resultado para as amostras de solo, 43 táxons de fungos zoospóricos, 36 táxons de Mucorales, 44 táxons de Glomales (AMF- Fungos Micorrízicos Arbusculares), os quais foram encontrados em associação com Melastomataceae e outras plantas nativas, além da ocorrência de 44 táxons de anamorfos e nenhuma de Ascomycota ou de Basidiomycota (SCHOENLEIN-CRUSIUS et al., 2006).

Cavalcanti et al. (2006) isolou fungos filamentosos de solo na região de Xingó, que se caracteriza por apresentar um ecossistema típico de caatinga. Esses autores realizaram amostragem em período chuvoso e de seca, com coletas de superfície e

a 20 cm de profundidade. Obtiveram como resultado a identificação de 96 táxons pertencentes a 8 espécies de Ascomycota, 8 espécies de Zygomycota e 80 anamorfos. Dentre os *Hyphomycetes* os gêneros mais diversos foram *Penicillium* com 31 espécies e *Aspergillus* com 17 espécies.

Simões (2006) isolou fungos filamentosos do solo a 15 cm de profundidade, de uma área de caatinga, na Floresta Nacional Contendas do Sincorá, Bahia. Onde obteve 10 gêneros, sendo eles: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Hiphomyceto*, *Fusarium*, *Clamidosporium*, *Humícola* e *Emericellopsis*, no período seco. Para o período chuvoso foram isolados 7 gêneros, sendo eles: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Actinomyceto*, *Nigrospora* e *Epicoccum*.

Ainda para área de caatinga, na região do semi-árido da Paraíba, Souto et al. (2008) determinaram a população de micro-organismos do solo na profundidade de 0-15 cm, com contagem total de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de fungos e bactérias. Os resultados desses autores indicaram maior número de fungos em relação ao de bactérias. De modo geral, houve maior taxa de crescimento de fungos nos períodos mais secos. Os autores chegaram a conclusão que o pH ligeiramente ácido (pH 6,3) do solo foi determinante para o elevado número de fungos.

Para uma área de transição entre Amazônia e Cerrado (MELZ; TIAGO, 2009) foram avaliadas as propriedades físico-químicas e microbiológicas do solo, e a influência dos períodos seco e chuvoso com relação aos parâmetros analisados, em três ambientes. Os autores observaram que as comunidades fúngicas tiveram interação significativa entre as áreas estudadas e épocas de avaliação. O resultado das densidades de fungos foi maior no período chuvoso nas áreas de lazer e alterada com 6,4 e 6,9 x 10⁴ UFC/g de solo, respectivamente. Já no período seco, os fungos predominaram na área de reserva natural com cobertura vegetal, apresentando 3,5 x 10⁴ UFC/g de solo.

Em ambientes amazônicos, Rodrigues et al. (2011) verificaram a variabilidade quantitativa da população microbiana associada as condições microclimáticas observadas em solo de floresta tropical úmida, em duas áreas experimentais, PPBio e ESECAFLOR, em Caxiuanã, Pará. As análises microbiológicas verificaram que os fungos desenvolvem-se melhor principalmente em níveis superficiais, diminuindo com a profundidade. Apresentaram na época seca 80 UFC/g de solo (ESECAFLOR) e 120 UFC/g de solo (PPBio), e na época chuvosa 60 UFC/g de solo (ESECAFLOR)

e 80 UFC/g de solo (PPBio), sendo a pesquisa realizada em ambientes de Latossolo Amarelo.

Em outro estudo, Delabona (2011) isolou fungos filamentosos de solo de reservas de floresta amazônica nativa na Amazônia Oriental, das quais obteve 110 linhagens fúngicas pertencentes aos grupos: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Penicillium* e *Mucor*. A autora ressaltou que poucos trabalhos são encontrados na literatura sobre o isolamento de fungos filamentosos de solo na região Amazônica. Da mesma forma, Vital e Zilli (2010) salientam que poucos estudos têm examinado especificamente a população microbiana do solo desta região, embora exista grande necessidade em se conhecer a diversidade microbiana desse ambiente devido sua relevância, por representar um recurso genético de valor inestimável.

Vital e Zilli (2010) citam o trabalho de Batista e Lima (1964) como pioneiro sobre os aspectos microbiológicos do Estado de Roraima, que mostrou baixo índice populacional de micro-organismos, com predominância de bactérias. Relatam ainda a realização de pesquisas pontuais sobre microbiologia de solo em Roraima, como a que descreveu a diversidade fúngica de solos na Estação Ecológica de Maracá, com ênfase na identificação de leveduras isoladas de diferentes fitofisionomias desta Unidade de Conservação. Em uma dessas pesquisas, o resultado da análise das médias das UFC/g de solo dos micro-organismos quantificados, indicou para todas as fitofisionomias estudadas, há predominância das populações de fungos filamentosos nos períodos seco e chuvoso, seguido das leveduras.

Outro estudo realizado em Roraima também com ênfase em leveduras foi feito por Farias (2008), que isolou 519 cepas a partir de 12 amostras de solos coletados no Parque Nacional do Viruá, as quais foram utilizadas em estudos de investigação enzimática.

2 FUNGOS E ENZIMAS

As enzimas são proteínas essenciais ao sistema metabólico de todos os organismos vivos, que podem ser isoladas de animais, plantas e micro-organismos e têm papel importante na degradação da matéria orgânica e na deterioração dos alimentos. Estas proteínas estão envolvidas em atividades naturais como processamento de nutrientes, produção de energia e outras funções metabólicas.

Formam-se por cadeias longas de aminoácidos unidas por ligações peptídicas e são biocatalizadores, ou seja, facilitam reações bioquímicas, aumentando a velocidade das reações sem serem consumidas durante o processo (MAHAN; MYERS, 2009).

As enzimas são classificadas e codificadas pelo NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) e divididas pelas regras oficiais de nomenclatura, em seis grupos de acordo com os compostos sobre os quais agem ou com o tipo de reação que catalisam. Cada um desses grupos é ainda subdividido em classes e subclasses, sendo que, cada enzima é identificada por *EC* (*Enzyme Commission*) seguido de números, de forma que não haja ambiguidade.

Cada enzima possui uma organização estrutural específica, onde o seu sítio ativo permite a ligação de apenas o(s) seu(s) substrato(s), fazendo com que a catálise seja de grande especificidade. A estrutura tridimensional da enzima, ou seja, sua estrutura e seu sítio ativo, podem ser afetados por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças na conformação da proteína, tornando a atividade enzimática dependente das características do meio, “*in vitro*”, principalmente do pH e da temperatura (MARZZOCO; TORRES, 2010). As classes das enzimas recebem o nome pela adição do sufixo “ase” ao nome dos seus substratos (figura 2) ou a uma palavra que descreve sua atividade (NELSON; COX, 2011).

As enzimas microbianas são consideradas boas fontes para usos industriais em relação à diversidade de outras já encontradas, como as de plantas e animais, sendo que ampla variedade de segmentos industriais utilizam enzimas de origem microbiana para reduzir grandes compostos a unidades fundamentais. De 1998 a 2009, houve um crescimento do mercado de enzimas industriais, sendo 45% na indústria de alimentos, 34% na de detergentes, 11% na indústria têxtil, 3% na de couro, 1% na indústria de papel e celulose (SHARMA et al., 2009).

Sharma et al. (2009) afirmam que a utilização de fungos em bioprocessos ganhou importância devido à produção de inúmeras enzimas com características físico-químicas variadas e com excelente potencial para a aplicação industrial. Ressaltam que a capacidade de síntese de enzimas pelos fungos em grande escala, bem como a facilidade com que são excretadas no meio externo, constituem as características fundamentais que justificam o uso desses micro-organismos. Desse modo, os fungos filamentosos representam excelente fonte de produtos biológicos devido à facilidade de manipulação genética, fácil cultivo e ampla diversidade

bioquímica, além da elevada produção de enzimas extracelulares (GUIMARÃES et al., 2006).

Figura 2 – Classificação Internacional das Enzimas. Fonte: Construído a partir de Nelson e Cox (2011).

Classe de Enzimas	Nome da Classe	Tipo de Reação Catalisada
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons hidreto ou átomos de Hidrogênio)
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água)
4	Liasas	Adição de grupos a ligações duplas, ou formação de ligações duplas por remoção de grupos
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares

O mercado de enzimas industriais foi estimado em mais de 1,6 bilhões de dólares em 2009, com quase metade dessas enzimas produzidas em fermentação por fungos filamentosos. Isso foi possível porque muitas linhagens industrialmente importantes de fungos como *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Acremonium chrysogenum* e *Penicillium chrysogenum*, foram classificados como seguros (GRAS – *Generally Regarded as Safe*) e podem crescer em substratos relativamente baratos, além de produzir e secretar grande quantidade de proteínas recombinantes, ou seja, através de modificações genéticas (SHARMA et al., 2009).

Diversos autores relatam a produção de diferentes enzimas por fungos filamentosos (figura 3). Essas enzimas demonstram relevantes aplicações biotecnológicas nas diversas áreas industriais, como nas indústrias de química fina e produtos biomédicos, além de potencial na biorremediação ambiental.

Figura 3 – Produção de enzimas por fungos filamentosos segundo diversos autores.

Enzima	Fungo Pesquisado	Referência
Amilase	<i>Mucor spp.</i> , <i>Rhizopus microsporus</i> , <i>Paecilomyces variotti</i>	Alves et al. (2002), Guimarães et al. (2006).
Celulase	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ahmed et al. (2009)
Lipase	<i>Mucor spp.</i>	Alves et al. (2002)
Pectinase	<i>Rhizopus microsporus</i>	Jayani; Saxena; Gupta (2005), Guimarães et al. (2006)
Protease	<i>Mucor spp</i>	Alves et al. (2002)
Tanase	<i>Penicillium atramentosum</i>	Macedo; Matsuda; Battestin (2005), Belur; Mugeraya (2011), Selwal et al. (2011)
Xilanase	<i>Aspergillus caespitosus</i> , <i>A. phoenicis</i>	Guimarães et al. (2006)

2.1 Produção de enzimas por fungos isolados na Amazônia

Nos últimos anos, alguns trabalhos focaram a produção de enzimas por fungos isolados da região amazônica, como Zanotto et al. (2009) que avaliaram 212 fungos endofíticos de plantas desta região, quanto ao potencial para aplicação em biocatálise como fornecedores de lipase. Esses autores realizaram a seleção preliminar dos micro-organismos testados, utilizando tributirina como substrato, sendo que 87% dos isolados apresentaram atividade para lipase.

Em outro estudo com fungos endofíticos isolados de *Piper hispidum* (OLIVEIRA, 2010) foram avaliados qualitativamente 58 isolados para as atividades de amilase, lipase, protease, celulase, pectinase e xilanase. Como resultado, 39,7% dos isolados endofíticos apresentaram potencial para serem utilizados em processos enzimáticos.

Utilizando outra metodologia para seleção, Faheina Jr. et al. (2010) selecionaram linhagens fúngicas produtoras de xilanase em fermentação submersa. Nesse estudo, os autores avaliaram 33 cepas de diferentes fungos, sendo eles: *Aspergillus niger*, *Trichoderma sp.*, *Colletotrichum*, *Fusarium* e *Lasiodiplodia*

theobromae. Como resultado, obtiveram que as cepas de *A. niger* e *Trichoderma* foram as mais promissoras, obtendo os maiores valores para a atividade xilanólítica.

Investigando a enzima celulase, Delabona (2011) testou o potencial enzimático de 110 fungos filamentosos isolados de solo da Amazônia Oriental. Destes, 10 apresentaram melhor crescimento no *screening*, os quais foram testados em fermentação em estado sólido. Como resultado, os isolados de *Aspergillus fumigatus* e *A. niger* apresentaram a maior produção enzimática para a enzima celulase.

Em outro estudo, Tonelotto (2012) realizou seleção de 40 linhagens de fungos filamentosos isolados da Amazônia, em fermentação em estado sólido (FES), visando à produção de enzimas relacionadas à degradação da biomassa vegetal, dentre elas xilanase, endoglucanase, FPase, pectinase e β -glicosidade, além de proteínas totais. Das 40 linhagens testadas em FES, três se destacaram e foram avaliadas em fermentação submersa. Na fermentação submersa, o isolado de *Aspergillus niger* apresentou os melhores resultados para a produção das enzimas avaliadas.

Em Roraima, destaca-se o trabalho de Farias (2008), que avaliou qualitativamente leveduras isoladas de solo do Parque Nacional do Viruá e da Estação Ecológica de Maracá, quanto à produção de lipase, protease, esterase, celulase e amilase. Em média, foram testadas 397 linhagens de leveduras, das quais, aproximadamente 90% exibiu atividade para pelo menos uma enzima e 30% para duas ou mais enzimas. A autora ressaltou que a seleção primária para uma determinada atividade enzimática, é um passo essencial na busca por um produto ou um processo biotecnológico.

2.1.2 Seleção de linhagens fúngicas produtoras de enzimas

Apesar dos avanços biotecnológicos, os programas de seleção primária, ou também chamados *screening*, para metabólitos alvos, a exemplo das enzimas microbianas, são frequentemente utilizados principalmente quando se pretende testar grande quantidade de linhagens microbianas (COLEN; JUNQUEIRA; MORAES-SANTOS, 2006).

Colen, Junqueira e Moraes-Santos (2006) enfatizam que o sucesso ou falha na seleção de micro-organismos produtores de enzimas de interesse, depende de um bom processo de seleção primária. Para os ensaios a serem empregados na fase de seleção primária, deve-se ainda levar em consideração aspectos como simplicidade, custo, rapidez e especificidade do método.

Antes da realização dos procedimentos de seleção primária, os micro-organismos são isolados de amostras ambientais, purificados, selecionados e testados como culturas puras. Essas culturas são submetidas a condições altamente seletivas visando à detecção e seleção daqueles micro-organismos ou metabólitos alvos de interesse (COLEN; JUNQUEIRA; MORAES-SANTOS, 2006).

Para o *screening* utiliza-se primeiramente o meio de cultura sólido em placa de Petri. Esse passo é chamado de seleção primária, onde os micro-organismos que possuem a capacidade de produzir o metabólito ou substância de interesse são detectados. Na próxima etapa, as culturas selecionadas, em geral, são crescidas em cultivo submerso, para se obter o caldo fermentado resultante do crescimento do micro-organismo testado. Por fim, a quantidade de metabólitos ou substâncias produzidas é avaliada e comparada com a de outras linhagens alvo, selecionando assim as linhagens mais promissoras (COLEN, 2006).

2.3 ENZIMAS HIDROLÍTICAS

Os fungos filamentosos produzem e secretam extracelularmente uma grande variedade de enzimas hidrolíticas, também chamadas de hidrolases. A diferença nesse tipo de reação, é que existe a necessidade da presença de água (FOJAN et al., 2000).

Várias espécies de fungos filamentosos são utilizadas para a produção de enzimas desse tipo, tais como proteases, celulases, tanases, fitases, amilases e lipases, com finalidades industriais (CUZZI et al., 2011). Dentre estas, as enzimas amilase e a lipase foram objeto de pesquisa deste trabalho.

2.3.1 Amilase

As amilases são enzimas capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas da molécula de amido, que por sua vez, é o segundo polímero mais abundante na natureza e principal carboidrato sintetizado pelas plantas. A molécula do amido é composta basicamente por dois polímeros quimicamente parecidos: a amilose e a amilopectina. Para que haja a hidrólise desses polímeros de grande peso molecular, é necessário um complexo enzimático atuando em conjunto de forma a hidrolisar a amilose e a amilopectina. As amilases podem ser divididas em duas categorias quanto ao seu modelo de ação: as endoamilases e as exoamilases (SILVA, 2009).

As endoamilases são conhecidas também como enzimas de liquefação ou despolimerização e compreendem as α -amilases (EC 3.2.1.1) que atacam as ligações internas α -1,4 da molécula de amido. As exoamilases ou enzimas de sacarificação são compostas por glucoamilases (EC 3.2.1.3), sendo a glicose o principal produto da clivagem terminal das ligações α -1,4 do amido. As enzimas desramificadoras, tais como a pululanase (CE 3.2.1.41) atuam predominantemente nas ligações α -1,6 da molécula de amilopectina (CASTRO et al., 2010).

As amilases podem ser derivadas de várias fontes, incluindo plantas, animais e micro-organismos, no entanto, as produzidas por fungos e bactérias têm dominado a maior parcela do setor industrial. As amilases estão entre as enzimas mais importantes industrialmente, as quais, especialmente as de origem microbiana possuem um grande valor biotecnológico agregado por substituírem com êxito os produtos químicos utilizados para a hidrólise do amido (PANDEY et al., 2000; GUPTA et al., 2003; SOARES et al., 2010; SOUZA; MAGALHÃES, 2010).

As amilases possuem aplicações nas indústrias têxteis, de alimentos, de fermentações de bebidas e panificação, de ração animal, nos processos de liquefação e sacarificação do amido e na indústria de papel. Assim, com a expansão das fronteiras da biotecnologia, a aplicação dessa classe de enzimas será expandida para muitos outros campos, como química clínica, médica e analítica (SOARES et al., 2010).

Enzimas amilolíticas, principalmente do tipo α -amilase, são comumente produzidas por fungos filamentosos, dos quais *Aspergillus* e *Rhizopus* são os gêneros preferenciais. Outros gêneros como *Mucor*, *Humicola* e *Thermomyces*

também são potenciais produtores dessa enzima (PANDEY et al., 1999; SILVA, 2009).

Com relação à produção, as enzimas extracelulares podem ser produzidas tanto em meio de cultivo sólido quanto líquido. Contudo, o uso de meios sólidos permite uma rápida seleção de populações de fungos, permitindo a detecção de enzimas específicas, como no caso da amilase. Um dos métodos clássicos para o *screening* de linhagens fúngicas para a detecção de amilase em meio sólido, pode ser realizado adicionando amido solúvel ao meio de cultivo, onde a produção enzimática pode ser evidenciada pela formação de um halo claro ao redor da zona de crescimento da colônia após a revelação com solução de iodo (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975; ALVES et al., 2002).

Alguns estudos verificaram a produção quantitativa de amilases por fungos filamentosos com diferentes propriedades catalíticas, por meio da fermentação em estado sólido (SSF) ou por fermentação submersa (SmF), os quais são sintetizados na figura 4.

Figura 4 – Produção de amilase por fungos filamentosos pelos métodos de fermentação submersa (Smf) e fermentação em estado sólido (SSF) de acordo com diversos autores.

Método Utilizado	Fungo Pesquisado	Referência
SmF	<i>Aspergillus flavus</i>	Bakiri; Magali; Thonart (2009)
	<i>Aspergillus tamarii</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. awamori</i> , e <i>A. flavus</i>	Morya; Yadav (2009)
	<i>Aspergillus sp.</i>	Chimata; Chetty; Suresh (2011)
	<i>Aspergillus niger</i>	Spier et al. (2006); Varalakshimi et al. (2009); Suganthi et al. (2011)
	<i>Penicillium fellutanum</i>	Kathiresan; Manivannan (2006)
	<i>Penicillium purpurogenum</i>	Silva et al. (2011)
SSF	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Ertan et al. (2006)
	<i>Aspergillus niger</i>	Slivinski et al. (2011)
	<i>Aspergillus awamori</i>	Castro et al. (2010)
	<i>Aspergillus sp.</i> e <i>Trichoderma sp.</i>	Farid; Shata (2011)
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Parbat; Singhal (2011)
	<i>Rhizopus oryzae</i>	Ghosh; Ray (2011)

2.3.2 Lipase

As lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) pertencem à classe das enzimas serino hidrolases, com função de catalisar a hidrólise de ligações de éster em triglicerídeos, produzindo diglicerídeos, monoglicerídeos, glicerol e ácidos graxos. Devido sua elevada seletividade são capazes de catalisar, em determinadas condições, reações de síntese como: esterificação, interesterificação e transesterificação, em diferentes faixas de pH e temperatura, além de possuir estabilidade em solventes orgânicos (TREVISAN, 2004).

A lipase destaca-se entre as enzimas de origem fúngica com grande potencial biotecnológico, com aplicação em diferentes setores industriais, devido à versatilidade da estrutura molecular e das propriedades catalíticas que hidrolisam as gorduras (COLEN, 2006; AZEREDO et al., 2007; ALBERTON, 2009; SHARMA et al., 2009; RAJESH et al., 2010).

Enzimas lipolíticas podem ser encontradas em animais, plantas e micro-organismos, porém, os fungos são as melhores fontes de lipase para aplicações com fins industriais, principalmente para a indústria de alimentos. Isso se deve principalmente ao seu caráter GRAS, devido ao uso histórico de espécies como *Aspergillus* e *Penicillium* na preparação de queijos, alimentos e bebidas, como missô e saqué. Essas enzimas tem sido extensivamente estudadas do ponto de vista genético e bioquímico, o que tem favorecido a geração de várias patentes para aplicação da mesma (COLEN; JUNQUEIRA; MORAES-SANTOS, 2006; DAMASO et al., 2008; TREICHEL et al., 2010).

Treichel et al. (2010) destacam que a importância da lipase pode ser observada pelo elevado número de artigos publicados na última década, bem como, pela demanda industrial por novas fontes dessa enzima com diferentes propriedades catalíticas para atuar em diversos substratos. As melhores espécies produtoras descobertas pertencem aos gêneros *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Rhizomucor*.

Existem alguns métodos clássicos para realizar testes qualitativos para *screening* de isolados produtores de lipase em meio sólido. Esses métodos de observação direta baseiam-se na formação de zonas claras ou turvas, em torno das colônias ou na formação de cristais de corantes no interior das gotículas de gorduras

na superfície do ágar. Os substratos mais utilizados para a evidência de zonas claras ou turvas são a tributirina, trioleína, Tween 20 e Tween 80. A tributirina é frequentemente utilizada visando à seleção preliminar de linhagens produtoras de lipase, a qual após ser hidrolisada gera dibutirina, monobutirina, glicerol e ácido butírico, todos solúveis em água (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975; COLEN, 2006; RAJESH et al., 2010).

Outro método de *screening* também utilizado é a detecção da atividade da lipase utilizando corante fluorescente, como a rodamina B. Esse corante é emulsionado ao meio de cultura, geralmente contendo óleo de oliva como substrato, no qual é observado halo alaranjado fluorescente ao redor da colônia quando exposta a irradiação por luz UV (HASAN; SHAH; HAMEED, 2009; MACIEL; PACHECO; GONÇALVES, 2010).

Dentre os métodos utilizados para a determinação quantitativa da produção da lipase estão a fermentação submersa (SmF) e a fermentação em estado sólido (SSF), sendo a última muito similar ao habitat natural dos fungos. Para fermentação submersa pode-se utilizar como substrato, os óleos de soja e de oliva. Para a fermentação em estado sólido pode-se utilizar resíduos agroindustriais como fonte de lipídios sólidos, tais como torta de babaçu e farelo de soja (DAMASO et al., 2008; TREICHEL et al., 2010).

No entanto a comparação da produção entre fermentação submersa (SmF) e fermentação em estado sólido (SSF) usadas para quantificar a atividade da lipase, é dificultada pela diferença metodológica entre ambas (DAMASO et al., 2008; TREICHEL et al., 2010). Alguns estudos verificaram a produção de lipase por fungos filamentosos com diferentes propriedades catalíticas através da fermentação em estado sólido (SSF) e da fermentação submersa (SmF), os quais são sintetizados na figura 5.

2.4 AVALIAÇÃO SEMIQUANTITATIVA PELO MÉTODO DO ÍNDICE ENZIMÁTICO

Para se avaliar de forma semiquantitativa a produção enzimática por micro-organismos em meio sólido, o índice enzimático (IE) é um parâmetro frequentemente utilizado. Esse índice se baseia na relação direta entre a capacidade de degradação, pelo micro-organismo, da enzima pesquisada e o diâmetro da área degradada, ou

seja, o tamanho do halo formado pela hidrólise do meio seletivo para a enzima testada (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

Segundo Cuzzi et al. (2011) a atividade enzimática (PZ), com base na metodologia do índice enzimático, é determinada pela razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da zona de degradação enzimática acrescido da área de crescimento da colônia, expressa como:

$$PZ = \frac{dc}{dhc}$$

Onde dc é o diâmetro da colônia e dhc o diâmetro da colônia + a área de degradação do meio. Assim, as linhagens podem ser classificadas como fortemente positivas (PZ 3; IE < 0,64), positivas (PZ 2; IE > 0,64 < 1,0) e negativas (PZ 1; IE > 1,0) para a atividade enzimática alvo da pesquisa.

Figura 5 – Produção de lipase por fungos filamentosos pelos métodos de fermentação submersa (Smf) e fermentação em estado sólido (SSF) de acordo com diversos autores.

Método Utilizado	Fungo Pesquisado	Referência
SmF e SSF	<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	Colen; Junqueira; Moraes-Santos (2006)
	<i>Penicillium restrictum</i>	Azeredo et al. (2007)
	<i>Rhizopus sp.</i>	Pogori; Xu; Cheikhyoussef (2007)
SmF	<i>Trichoderma reesei</i>	Rajesh et al. (2010)
SSF	<i>Aspergillus niger</i>	Damaso et al. (2008); Dutra et al. (2008)
	<i>Penicillium verrucosum</i>	Kempka et al. (2008)
	<i>Rhizopus microsporus</i>	Alberton (2009)

Do ponto de vista prático, existem várias propostas para determinar a atividade enzimática por difusão radial em meio sólido. Sendo que os fatores determinantes que viabilizam essa seleção incluem a correlação direta entre o tamanho do halo e a capacidade degradativa do micro-organismo para a atividade enzimática pretendida (SOARES et al., 2010).

3 OBJETIVOS

Visando responder aos questionamentos desse trabalho foram traçados os seguintes objetivos.

3.1 OBJETIVO GERAL

- Verificar a produção de amilase e lipase por fungos filamentosos isolados de diferentes tipos de solos de florestas e savana de Roraima, visando a potencial utilização em processos biotecnológicos.

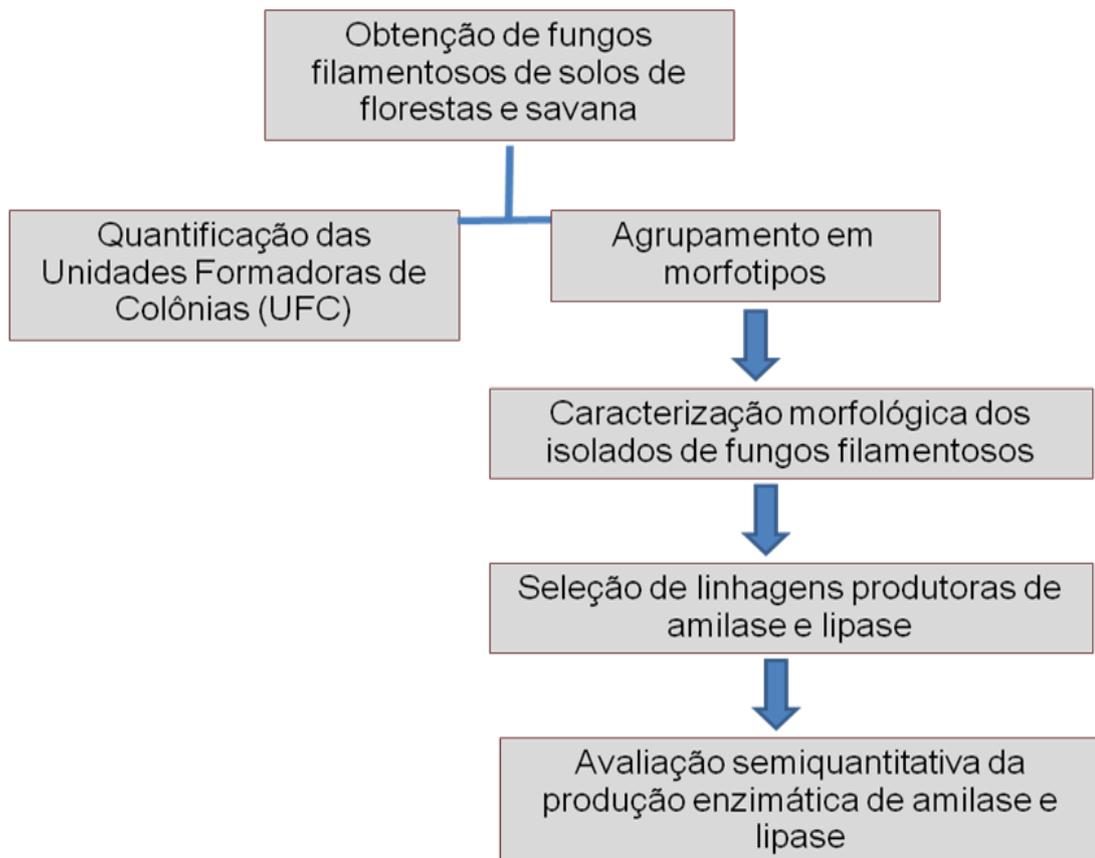
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os morfotipos de fungos filamentosos de amostras de diferentes tipos de solo provenientes do PARNA Viruá e Campus Cauamé – UFRR.
- Selecionar através de teste qualitativo isolados de fungos filamentosos potencialmente produtores de amilase e lipase.
- Realizar avaliação semiquantitativa da produção enzimática.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental deste trabalho como processamento, armazenamento, análise das amostras e testes qualitativos foi realizada nos laboratórios do Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais – Pronat e do Centro de Estudos da Biodiversidade – CBio, da Universidade Federal de Roraima. A figura 6 mostra o esquema geral das atividades executadas durante a realização desse trabalho.

Figura 6– Esquema geral das atividades realizadas visando à seleção de fungos filamentosos produtores das enzimas amilase e lipase.



4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO

Essa pesquisa foi realizada em duas áreas de estudo: PARNA Viruá e Campus Cauamé (figura 7), aproveitando a grade (constituída de parcelas permanentes) do Programa de Pesquisa em Biodiversidade – PPBio, na qual as parcelas possuem comprimento de 250 m, seguindo a curva de nível (cota altitudinal), a fim de minimizar as variações edáficas. Estas são espaçadas a uma distância mínima de 1 km em grades completas e 0,5 km em grades modulares, com um número de réplicas variando de 30 a 60 em grades completas, ou com menos réplicas em grades modulares (PPBio, 2011).

4.1.1 Parque Nacional do Viruá

O PARNA Viruá está situado na região centro-sul do Estado de Roraima, no município de Caracaraí, faz parte de um complexo de Unidades de Conservação e possui uma grade completa com 30 parcelas permanentes do PPBio (figura 8). O PARNA Viruá conta com uma área de 227.011 hectares, limitado a oeste pelo Rio Branco, a leste pela BR 174 e por um trecho de rodovia abandonado conhecido como Estrada Perdida, por onde é feito o acesso ao Parque, e limitado ao sul pelo Rio Anauá (PPBio, 2011).

4.1.1.1 Caracterização Climática do PARNA Viruá

O clima da região é classificado como quente e úmido, de dias curtos, com chuvas fortes e torrenciais, delimitados por um curto período seco. A sazonalidade da região é definida por um período de seca entre os meses de outubro a abril, e um período de chuvas de maio a setembro (PPBio, 2011).

Na classificação de Köppen o clima do setor sul do PARNA Viruá é definido como Amw (chuva do tipo monção), enquanto que na porção nordeste do Parque é Aw (verão úmido e inverno seco), sendo a variação de precipitação anual em torno de 1.300 a 2.350 mm, com média de 1.794 mm (SCHAEFER; MENDONÇA; FILHO, 2009).

Figura 7– Localização das áreas de estudo, mostrando Campus Cauamé – UFRR e PARNA Viruá- Roraima.

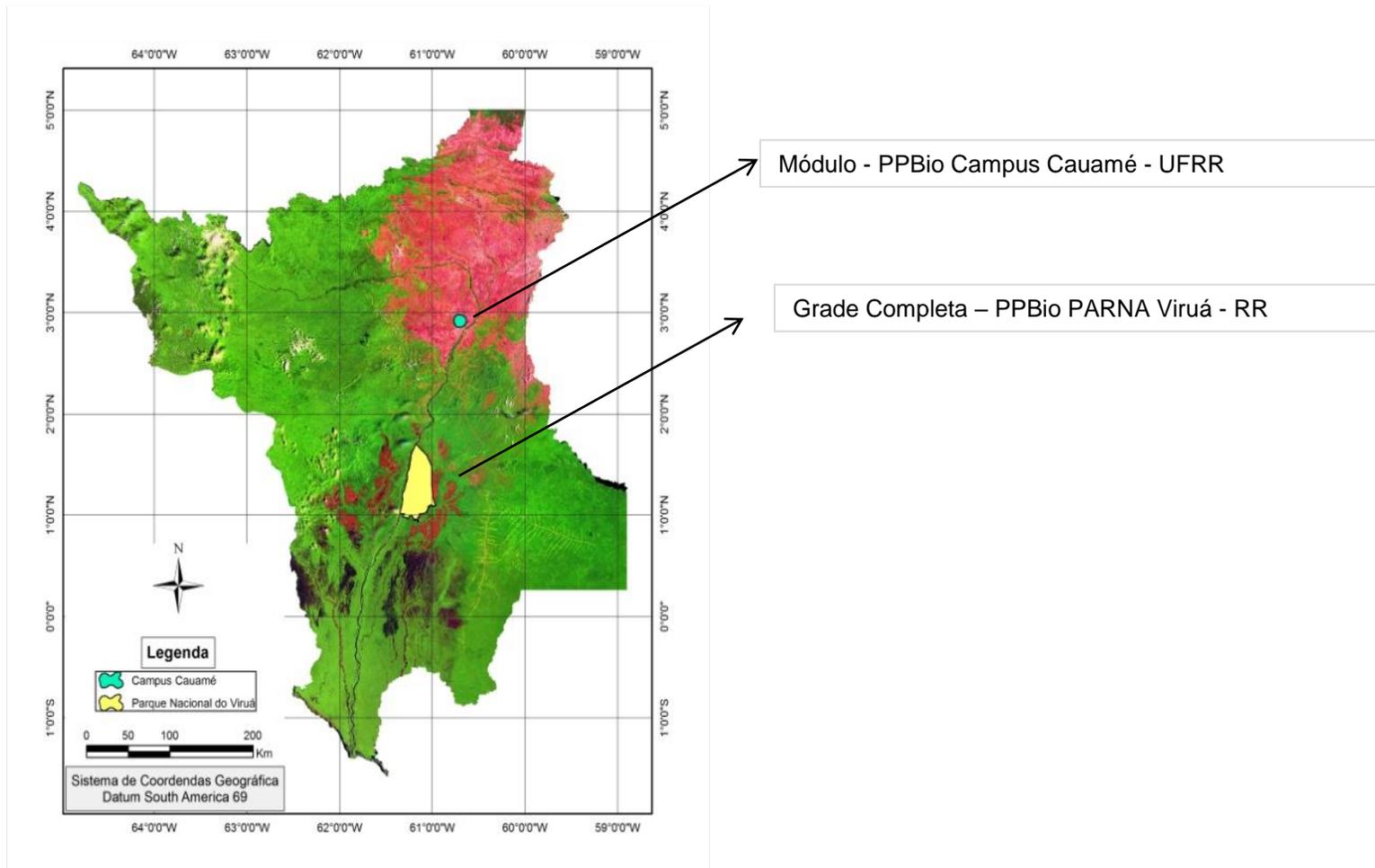


Figura 8 – Grade do PPBio com 30 Parcelas Permanentes localizada no PARNA Viruá - RR. Fonte: PPBio (2011).



4.1.1.2 Caracterização Fitofisionômica e Pedológica do PARNA Viruá

No PARNA Viruá são encontradas diversas fisionomias vegetais florestais e não florestais típicas da Bacia Amazônica e do Planalto das Guianas. Nesse ambiente ocorrem florestas ombrófilas densas e abertas das terras baixas (florestas de terra firme), florestas aluviais (de várzea e de igapó), pequenas áreas de floresta submontana nos morros residuais, sendo grande extensão da unidade marcada pela presença de campinas e campinaranas, além de buritizais não-linearizados que colonizam áreas encharcadas, predominantes ao sul da Unidade (GRIBEL et al., 2009).

Os solos são em sua maioria hidromórficos, arenosos, pobres quimicamente e ácidos, com pH variando de 3,0 a 5,0. Com relação à topografia da região, esta é predominantemente plana e favorece a formação de inúmeras lagoas, áreas encharcadas e inundáveis (SCHAEFER; MENDONÇA; FILHO, 2009).

4.1.2 Campus Cauamé

O Campus Cauamé da Universidade Federal de Roraima está localizado a margem esquerda do rio Cauamé, situado no município de Boa Vista a 1,1 km da BR 174 sentido Boa Vista-Pacaraima, seguindo o ramal de entrada para a região do Monte Cristo I. Possui uma grade modular, com 19 parcelas do PPBio, entre terrestres e aquáticas (figura 9), abrangendo cerca de 498 hectares (PPBio, 2011).

4.1.2.1 Caracterização Climática do Campus Cauamé

O clima da região do Campus Cauamé é Tropical Chuvoso, quente e úmido. Pela classificação de Köppen seu clima é do tipo Aw, com um nítido período seco. A temperatura média é de 25°C, e a precipitação pluviométrica anual apresenta-se em torno de 1.600 mm, com distribuição irregular, definido por dois períodos de chuvas, sendo o mais chuvoso entre os meses de abril a setembro (BENEDETTI, 2007).

Figura 9 –Módulo de grade com Parcelas Permanentes do PPBio localizada no Campus Cauamé - UFRR. Fonte: PPBio (2011).



4.1.2.2 Caracterização Fitofisionômica e Pedológica do Campus Cauamé

A área do Campus Cauamé constitui o domínio de savanas, com a presença de um mosaico de savana parque à gramíneo-lenhosa, onde o relevo é em grande parte plano a suave ondulado, característico da formação geológica Boa Vista. Os solos são distróficos, variando de Latossolo Amarelo a Argissolo Amarelo, com pH de 4,93 a 6,28, sendo considerados solos pobres quimicamente e ácidos (BENEDETTI, 2007).

4.2 OBTENÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS DE AMOSTRAS DE SOLO

Para a obtenção dos fungos filamentosos de solo nas duas áreas de estudo, foram realizados os seguintes procedimentos: coleta e processamento de amostras, isolamento de fungos filamentosos, obtenção de culturas puras e manutenção dos isolados, como esquematizado na figura 10. As amostras de solo foram coletadas em Abril (PARNA Viruá) e Novembro (Campus Cauamé) de 2011.

4.2.1 Desenho amostral e amostragem

O desenho amostral seguiu o Protocolo Básico de Coleta de Amostras de Solo para Caracterização da Diversidade Microbiana do PPBio (figura 11), onde as amostras foram coletadas nas parcelas permanentes seguindo a curva de nível, em distâncias regulares de 25 m, alternando pontos à esquerda e à direita da parcela, distantes 1 m da trilha, as quais totalizaram 10 sub-amostras, que constituíram uma amostra composta (VITAL; ZILLI, 2010).

Foram amostradas seis parcelas permanentes na área de estudo do PARNA Viruá, as quais são detalhadas com relação às características do ambiente e tipo de solo na tabela 2 e figura 12.

Figura 10 – Esquema geral das atividades realizadas visando à obtenção de isolados de fungos filamentosos do solo.



Figura 11 – Desenho amostral para coleta de amostras de solo em parcela do PPBio. Fonte: VITAL e ZILLI (2010).

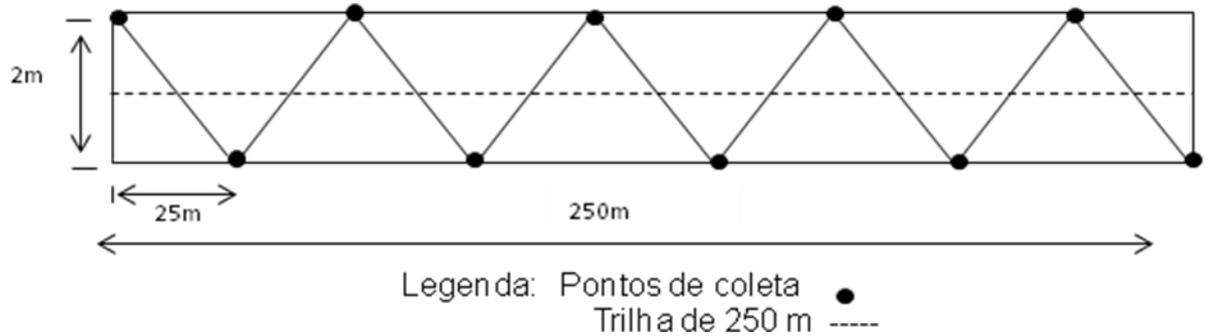


Tabela 2 – Descrição do ambiente e dos tipos de solo das parcelas amostradas no PARNA Viruá - RR.

Amostra	Parcela amostrada	Descrição ambiente/ tipo de solo *
Amostra 1	Ced – L1N1	Colinas e encostas dissecadas e florestadas com Cambissolos e Latossolos
Amostra 2	Sbi – L2N2	Serras baixas e inselbergs com floresta aberta sobre Latossolos, Cambissolos e Neossolos Litólicos
Amostra 3	Iri – L1N3	Igapó e bacia do rio Iruá com solos hidromórficos
Amostra 4	Mpa – L3N1	Mosaico de patamares arenosos baixos inundáveis com campinarana arbóreo-arbustiva
Amostra 5	Rfa – L3N2	Rampas e superfície pediplanada com tensão ecológica de floresta aberta sobre Latossolos e Cambissolos
Amostra 6	Rfa – L3N3	Rampas e superfície pediplanada com tensão ecológica de floresta aberta sobre Latossolos e Cambissolos

* Fonte: Construído a partir de PPBio (2011).

No Campus Cauamé foram amostradas cinco parcelas permanentes, as quais são detalhadas com relação às características do ambiente e tipo de solo na tabela 3 e figura 13.

Tabela 3 – Descrição dos ambientes e dos tipos de solos das parcelas amostrados no Campus Cauamé - UFRR.

Amostra	Parcela amostrada	Descrição tipo de ambiente/solo*
Amostra 1	W2 1250	Campo sujo/ limpo, mosaico de Gleissolo, Neossolo e Latossolo
Amostra 2	W4 1250	Campo limpo sob Latossolos
Amostra 3	W4 1750	Mosaico campo sujo/ limpo sob Latossolos e Plintossolo
Amostra 4	W2 2200	Mosaico campo sujo/ limpo sob Latossolos
Amostra 5	W3 2250	Campo sujo/ limpo, mosaico de Gleissolo, Neossolo e Latossolo

* Fonte: Construído a partir de Benedetti (2007) e Barbosa et al. (2012).

Figura 12 – Mapa das unidades geoambientais do PARNA Viruá – RR, indicando as parcelas amostradas. Fonte: Modificado de PPBio (2011).

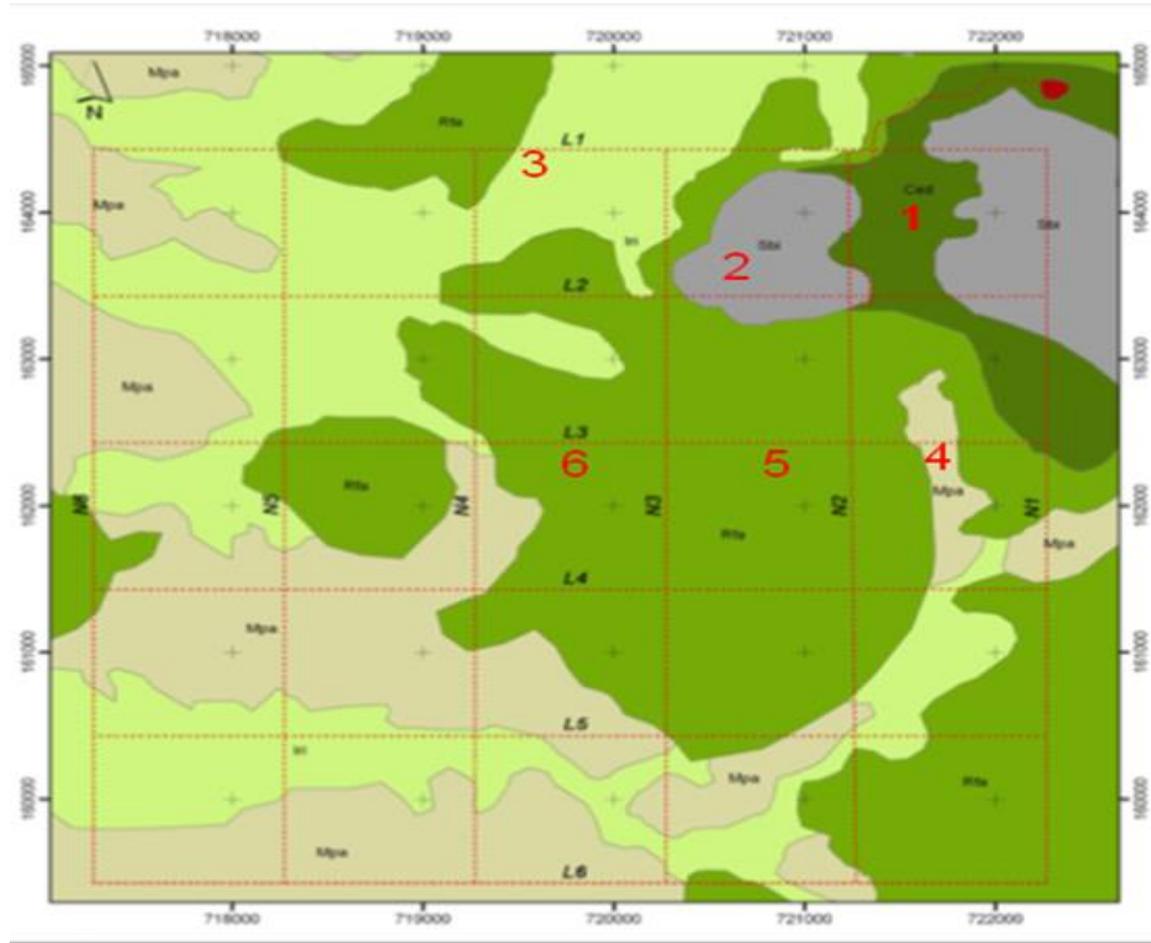
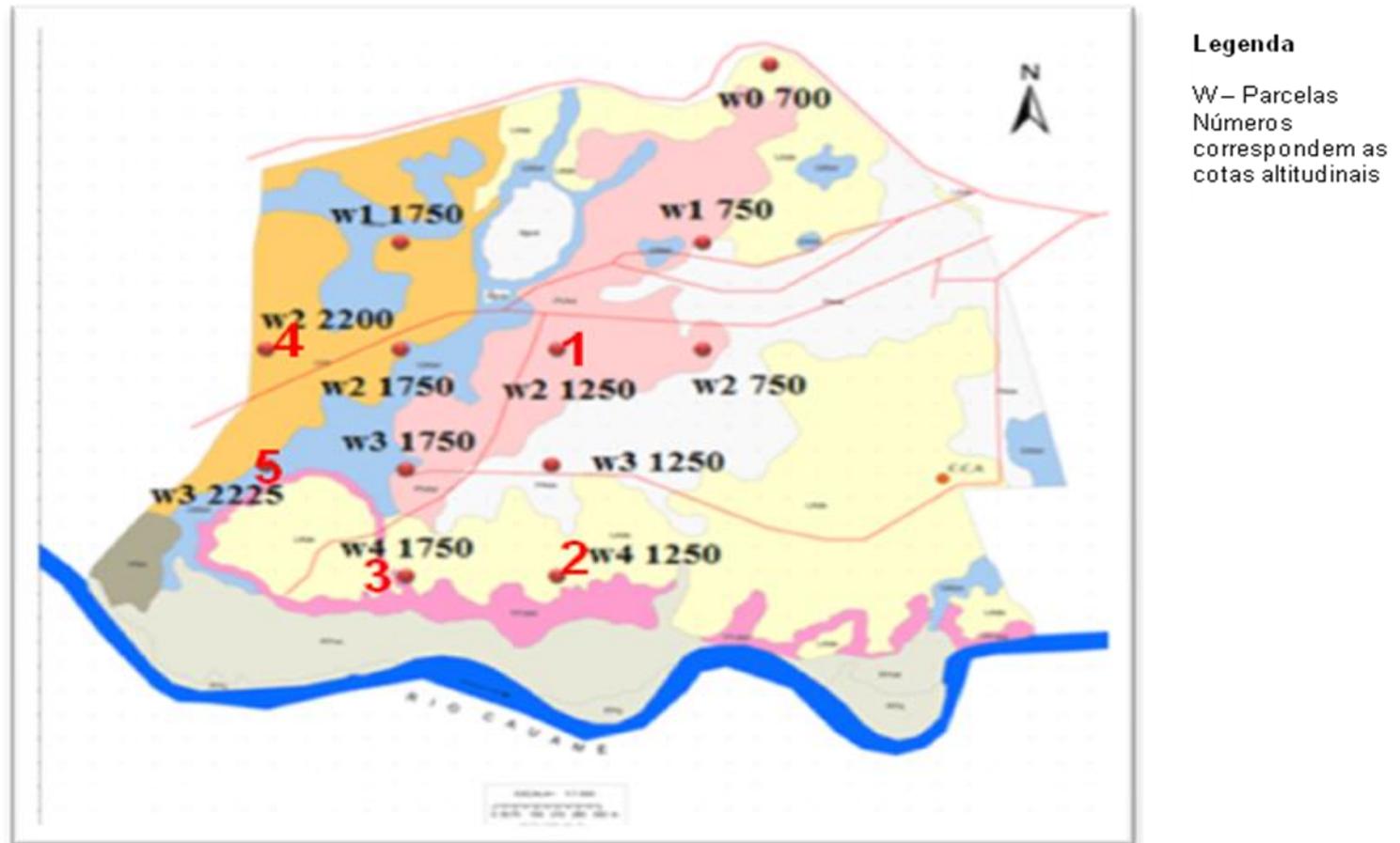


Figura 13 – Mapa das classes de solos do Campus Cauamé- UFRR, indicando as parcelas amostradas. Fonte: Modificado de Benedetti, (2007).



Em ambas as áreas de estudo foram consideradas as características do solo para a escolha das parcelas a serem amostradas. Os dados de pluviosidade do período de coleta foram obtidos no INMET (2012), e os dados de pH do solo foram obtidos nos Metadados do PPBio (2011).

4.2.2 Coleta e processamento das amostras de solo

Para a coleta das amostras de solo utilizou-se um trado do tipo holandês, para retirar cerca de 100g de solo na profundidade de 0-15 cm, para formar cada sub-amostra (figura 14). Cada sub-amostra foi embalada em sacos plásticos individuais, identificados e transportados até o laboratório de Microbiologia – PRONAT, em ambiente protegido, evitando a dessecação e a exposição ao sol.

Figura 14 – Coleta de amostras de solos utilizando trado tipo holandês.



O processamento das amostras foi realizado em até 48 horas após a coleta, no qual foram realizadas as seguintes atividades: homogeneização das sub-amostras para formar a amostra composta, seguida de catação manual da amostra composta e peneiramento como esquematizado na figura 15.

No laboratório, as sub-amostras simples foram homogeneizadas para formar uma amostra composta. Após, foi realizada a catação manual para a retirada de pedras e pequenos gravetos, e o peneiramento em malha de 2 mm para a retirada de restos vegetais (figura 16), segundo o método descrito por van Elsas e Smalla (1997).

Figura 15 – Esquema das atividades de processamento das amostras de solo para obtenção de fungos filamentosos.

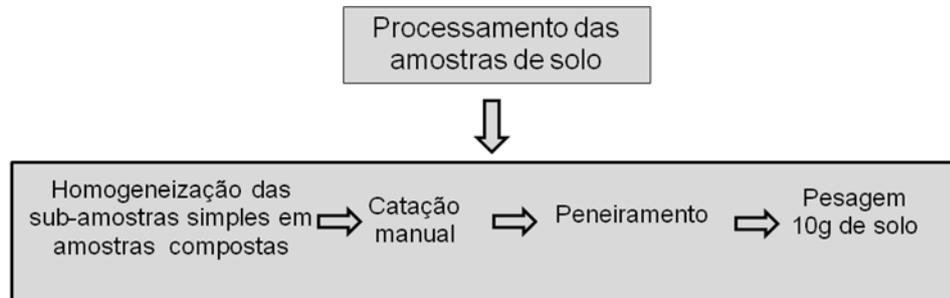


Figura 16 – Catação manual e peneiramento das amostras de solo.



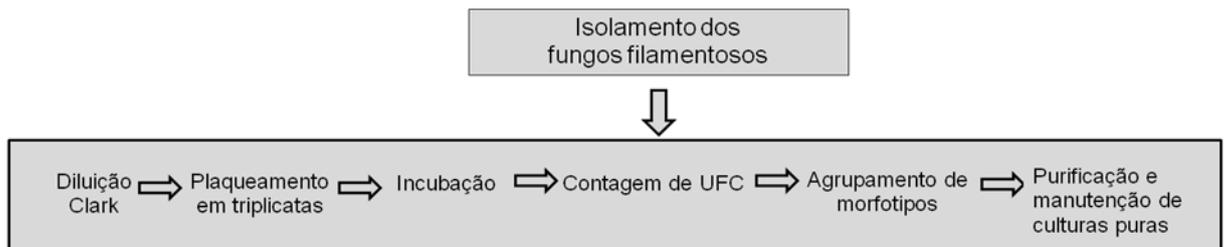
4.2.3 Isolamento de Fungos Filamentosos do solo

As atividades realizadas visando o isolamento de fungos filamentosos das amostras de solo foram: diluição seriada pela técnica de Clark modificada, seguido do plaqueamento das alíquotas das diluições, incubação e quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC), agrupamento em morfotipos, seguido da purificação e manutenção das culturas puras como esquematizado na figura 17.

Para o isolamento dos fungos filamentosos do solo foi utilizada a técnica de diluição de Clark. Para a qual, 10 g de cada amostra de solo foi adicionada em frascos previamente esterilizados contendo 90 ml de solução salina a 0,85%

(MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A modificação na técnica de Clark foi feita acrescentando pirofosfato (0,1%) e Tween 80 (0,1%).

Figura 17 – Esquema das atividades de isolamento de fungos filamentosos das amostras de solo.



Os frascos foram agitados vigorosamente e em seguida a suspensão foi diluída até 10^{-4} . Após a realização da diluição seriada do solo retirou-se alíquotas de 0,1 mL das diluições 10^{-3} e 10^{-4} para inoculação nos meios de cultura ágar sabouraud (SB) e yeast malt agar (YMA), acrescido de 200 mg/L do antibacteriano cloranfenicol. O isolamento foi realizado em triplicatas (figura 18) e as placas de Petri foram incubadas a 28°C , sendo que o crescimento foi acompanhado diariamente por 72 horas.

4.2.4 Quantificação do número total de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Decorrido o período de crescimento, as colônias que se desenvolveram sobre o meio de cultura, foram contadas pelo lado reverso das placas de Petri, com auxílio de um contador de colônias, marcando-se um ponto com caneta permanente sobre cada unidade. A densidade de fungos foi estimada pela média aritmética da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de três repetições, corrigido pelo fator de diluição, expresso como UFC/g de solo.

As densidades de fungos foram submetidas à análise de variância a 5% de probabilidade, e as médias comparadas pelo Teste de Tukey utilizando o programa BioEstat 5.0.

Figura 18 – Inoculação das alíquotas das diluições de amostras de solo do PARNA Viruá em meio de cultura para isolamento de fungos filamentosos.



4.2.5 Agrupamento, purificação e manutenção de culturas puras de fungos filamentosos

As colônias foram agrupadas com base nos aspectos de textura, coloração do verso e reverso e do tipo de relevo apresentado (NEDER, 1992; SIDRIM; ROCHA, 2004). Uma porção do micélio de cada morfotipo foi transferido para uma nova placa contendo o meio de cultura utilizado no isolamento inicial. Cada morfotipo de fungo filamentoso recebeu uma numeração sequencial, precedida do código VR para isolados do PARNA Viruá e CA para isolados do Campus Cauamé.

As culturas puras foram obidas através de repiques sucessivos de pequenas porções do micélio. O meio de cultura utilizado para purificação foi o mesmo do isolamento inicial, para permitir a manutenção das características de cada isolado de fungo filamentoso.

Após a purificação, as culturas puras foram armazenadas em tubos de ensaio contendo o meio batata dextrose ágar (BDA) inclinado, os quais foram mantidos em temperatura ambiente. A manutenção foi feita através de repiques periódicos, a cada quatro meses, em média.

4.2.6 Caracterização morfológica dos fungos filamentosos

As colônias dos fungos filamentosos foram caracterizadas quanto a sua macromorfologia e micromorfologia. Na macromorfologia foram descritos os aspectos de textura, relevo, tipo de borda, tamanho das colônias, cor de verso e reverso, pigmento difuso no meio de cultura, produção de exsudatos e cor dos esporos (NEDER, 1992; SIDRIM; ROCHA, 2004). Na micromorfologia foram analisadas as estruturas reprodutivas.

Para a visualização das microestruturas dos fungos filamentosos foram previamente preparados e esterilizados os sistemas de microcultivo. Cada sistema de microcultivo constitui de uma placa de Petri contendo um círculo de papel filtro no fundo, sob o qual foi presa uma lâmina, e uma lamínula.

Após o preparo dos sistemas, foi adicionado sobre a lâmina, sob condições assépticas, um bloco de meio de cultura Sabouraud. Após a adição desse bloco de meio de cultura, inoculou-se fragmentos do isolado fúngico nos vértices, o qual foi coberto com a lamínula. Terminado esse passo, o papel filtro foi umedecido com água destilada estéril, e os sistemas incubados a 28°C por um período que variou de sete a dez dias.

Após o período de crescimento do microcultivo fúngico foi retirado e descartado o bloco de meio de cultura. A lâmina e a lamínula onde o micélio do fungo filamentoso ficou aderido foram preparadas e coradas com azul de metileno, sendo preparadas duas lâminas por isolado. Procedeu-se então a visualização das lâminas em microscópio ótico (Nikon, E200) onde foram observadas tanto as estruturas reprodutivas como o aspecto das hifas dos fungos filamentosos (SIDRIM; ROCHA, 2004).

4.3 SELEÇÃO DE LINHAGENS PRODUTORAS DE AMILASE E LIPASE

Os testes enzimáticos qualitativos foram realizados visando à seleção primária dos isolados (*screening*) para as atividades enzimáticas de amilase e lipase. Para isso, foi realizada a observação direta em placas de Petri contendo meios seletivos específicos para cada enzima testada. Foi avaliada a formação de halos, ou seja, a formação de zonas claras ou opacas (HANKIN; ANAGNOSTAKIS,

1975), aos quais foi atribuído o critério de atividade positiva (+) e atividade negativa (-) para a produção das referidas enzimas.

4.3.1 Preparo do inóculo para teste enzimático

Os isolados foram repicados em estrias no meio Sabouraud, para promover um crescimento homogêneo visando à obtenção de uma suspensão de células metabolicamente ativa, e incubados a 28°C por cinco a sete dias.

Após o período de crescimento, a suspensão foi preparada raspando-se assepticamente as placas de Petri com swabs estéreis, que foram em seguida mergulhados em tubo contendo aproximadamente 10 mL de água destilada estéril. Procedeu-se a inoculação de 1 mL dessa suspensão de células em placas contendo o meio Sabouraud, previamente preparadas em camada fina (aproximadamente 3 a 5 mL de meio de cultura). Ao término da inoculação, o material foi incubado por 24h a 28°C para obtenção de discos de micélio de 1cm de diâmetro, os quais foram cortados com ponteira estéril.

4.3.2 Teste qualitativo para atividade de amilase

O meio de cultura utilizado para evidenciar a atividade da amilase foi preparado com: Extrato de carne (0,3%); Peptona (0,5%); Amido (0,2%); Agar (2%) e pH 6,0 (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975), o qual foi vertido aproximadamente 20 mL em placas de Petri estéreis.

No meio de cultura para o teste qualitativo para atividade de amilase previamente preparado, foi inoculado um disco de micélio do isolado a ser testado, como descrito no passo anterior, o qual foi cortado com o auxílio de ponteira estéril, com aproximadamente 1 cm de diâmetro. As placas em triplicatas foram incubadas a 28°C. A observação da atividade enzimática foi feita decorrido o período de 48 e 96 horas de incubação.

Para a evidência da atividade amilolítica utilizou-se uma solução de iodo a 0,1 N, previamente preparada com iodo (1 g); iodeto de potássio (3 g); água destilada (300 mL), armazenada em frasco âmbar. Foi vertido 5 mL dessa solução de

revelação nas placas testes, deixou-se agir por cinco minutos, e após esse período foi feita a leitura da presença (+) ou ausência (-) de halo de degradação enzimática.

4.3.3 Teste qualitativo para atividade de lipase

O meio de cultura utilizado para evidenciar a atividade da lipase foi preparado como descrito em Hankin e Anagnostakis (1975) com modificações, utilizando-se: Peptona (1%); Cloreto de sódio (0,5%); Cloreto de cálcio biidratado (0,01%); Agar (2%) e Tributirina (1% p.v) com pH 6,0, o qual foi vertido aproximadamente 20 mL em placas de Petri estéreis.

No meio de cultura para o teste qualitativo para atividade de lipase previamente preparado, foi inoculado um disco de micélio do isolado a ser testado. As placas em triplicatas foram incubadas a 28°C e a observação da atividade enzimática foi feita decorrido o período de 48 e 96 horas, com base na presença (+) ou ausência (-) de halo de degradação enzimática.

4.3.4 Avaliação semiquantitativa da produção enzimática

Os índices enzimáticos (IE) foram obtidos através da razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da zona de degradação (halo) acrescido da área de crescimento da colônia (dhc), que foram medidos com régua milimetrada (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975; CUZZI et al., 2011).

Foi realizada a análise de Produção Enzimática (PZ), dos quais foram considerados bons produtores as linhagens que obtiveram PZ 2 com $IE > 0,64 < 1,0$ e PZ 3 com IE inferior a 0.64, os isolados que obtiveram PZ 1 (negativo), foram excluídos da análise (CUZZI et al., 2011).

Os dados foram submetidos à análise de variância a 5% de probabilidade, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, para os quais foi utilizado o Programa BioEstat 5.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a coleta, isolamento, quantificação da densidade das Unidades Formadoras de Colônias (UFC), agrupamento e purificação de morfotipos de fungos filamentosos, testes enzimáticos qualitativos (*screening*) e avaliação semiquantitativa dos índices enzimáticos, foi possível chegar aos resultados aqui apresentados.

5.1 ISOLAMENTO E DENSIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS

O método clássico padronizado para o isolamento de fungos filamentosos de amostras do solo é realizado por meio de diluições seriadas utilizando meios de cultivo seletivos para estes micro-organismos. A contagem em meio de cultura continua sendo uma ferramenta útil em estudos comparativos, onde o isolamento é o primeiro passo, a partir do qual se pode avaliar a densidade da microbiota do solo.

A partir do isolamento e das densidades de fungos filamentosos isolados de diferentes tipos de solos e ambientes do PARNA Viruá e do Campus Cauamé, foi possível tabular os dados apresentados a seguir.

5.1.1 Parque Nacional do Viruá

A densidade estimada de fungos filamentosos obtidas no PARNA Viruá variou de $1,5 \times 10^6$ a $4,0 \times 10^6$ UFC/g de solo, sendo a média geral de $5,9 \times 10^6$ UFC/g de solo, nas seis parcelas do PPBio amostradas. Houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre a densidade estimada de fungos obtidos a partir de diferentes tipos de solo amostrados no PARNA Viruá (tabela 4).

A densidade de fungos decresceu na seguinte ordem: amostra 2 > amostra 6 > amostra 1 > amostra 5 > amostra 4 e 3.

A amostra 2 do ambiente descrito como serras baixas e inselbergs com floresta aberta sobre Latossolos, Cambissolos e Neossolos, e a amostra 6 do ambiente rampas e superfície pediplana com tensão ecológica de floresta aberta

sobre Latossolos e Cambissolos, que apresentaram as maiores densidades, apresentam pH do solo de 3,9, assim como o ambiente de colinas e encostas dissecadas e florestadas sobre Cambissolos e Latossolos (amostra 1), que apresentou a terceira maior densidade com $1,0 \times 10^6$ UFC/g de solo.

Tabela 4 – Densidade de fungos filamentosos isolados de amostras de solos das parcelas do PPBio no PARNA Viruá - RR.

Amostra	Parcela amostrada	Tipo de ambiente/solo*	pH do solo*	Densidade (UFC/g de solo)
Amostra 1	Ced – L1N1	Colinas e encostas dissecadas e florestadas com Cambissolos e Latossolos	3,9	$1,0 \times 10^6$ c
Amostra 2	Sbi – L2N2	Serras baixas e inselbergs com floresta aberta sobre Latossolos, Cambissolos e Neossolos Litólicos	3,9	$1,5 \times 10^6$ a
Amostra 3	Iri – L1N3	Igapó e bacia do rio Iruá com solos Hidromórficos	4,2	$4,0 \times 10^5$ f
Amostra 4	Mpa – L3N1	Mosaico de patamares arenosos baixos inundáveis com campinarana arbóreo-arbustiva	4,4	$6,0 \times 10^5$ e
Amostra 5	Rfa – L3N2	Rampas e superfície pediplanada com tensão ecológica de floresta aberta sobre Latossolos e Cambissolos	3,9	$9,0 \times 10^5$ d
Amostra 6	Rfa – L3N3	Rampas e superfície pediplanada com tensão ecológica de floresta aberta sobre Latossolos e Cambissolos	3,9	$1,4 \times 10^6$ b
Média Geral				$5,9 \times 10^6$

*Fonte: Construído a partir de PPBio (2011). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

O ambiente de igapó e bacia do rio Iruá (amostra 3) apresentou a menor densidade com $4,0 \times 10^5$ UFC/g de solo, a segunda menor densidade foi obtida no ambiente de mosaico de patamares arenosos baixos inundáveis com campinarana arbóreo-arbustiva (amostra 4) com $6,0 \times 10^5$ UFC/g de solo o pH para estes ambientes foi 4,2 e 4,4, respectivamente.

O caráter hidromórfico dos solos das amostras 3 e 4, assim como a pobreza química derivada da lixiviação destes, provavelmente tenha influenciado na densidade de UFC/g de solo obtidas para esses ambientes, o que pode ser justificado pela forte correlação entre a disponibilidade de nutrientes e a população microbiana. Rodrigues et al. (2011) ressalta que variações no teor de água no solo influenciam diretamente a proporção de fungos e bactérias, ou seja, ao aumentar o volume de água no solo, aumenta a população de bactérias e diminui a população de fungos.

O ambiente de rampas e superfície pediplana com tensão ecológica de floresta aberta sobre Latossolos e Cambissolos (amostra 5) apresentou a terceira menor densidade com $9,0 \times 10^5$ UFC/g de solo. Nota-se que este ambiente foi amostrado duas vezes (amostra 5 e 6) e apresentou densidades de isolamento distintas, as quais foram significativas estatisticamente.

A diferença nas densidades em ambientes definidos como iguais, pode ocorrer devido ao solo ser um ambiente descontínuo e complexo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), bem como pela maneira com que são extraídos os propágulos dos fungos filamentosos que se agregam as partículas do solo, no momento do processamento das amostras (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

A média da precipitação do trimestre no município de Caracaraí, onde se localiza o PARNA Viruá, para o período da coleta, foi da ordem de 306 mm a mínima e 547 mm a máxima (INMET, 2012) caracterizando o período como estação de seca. Rodrigues et al. (2011) observaram que as populações de fungos desenvolveram-se melhor em época seca, devido ao aumento do fluxo de calor no solo e à diminuição do teor de água. Em estudo na ESEC Maracá – Roraima, Vital e Zilli (2010) relatam que o resultado da análise das médias das UFC/g de solo, indicou para todas as fitofisionomias estudadas a predominância das populações de fungos filamentosos nos períodos seco e chuvoso, seguido das leveduras.

Rodrigues et al. (2011) obtiveram 120 UFC/g de solo de fungos na época seca em ambientes de Latossolo Amarelo, no PPBio na região nordeste da Amazônia, resultado semelhante aos obtidos neste trabalho para as amostras 1, 2 e 6, na contagem das médias UFC/g de solo, que foram 101, 150 e 141, respectivamente, em ambientes de Cambissolos e Latossolos. Esses autores concluíram que, os padrões de distribuição de populações de fungos diminuem com a profundidade.

Os resultados obtidos neste trabalho foram superiores ao relatado por Ruiz, Pastor e Diaz (2005) que isolaram fungos e bactérias em três amostras de solo de floresta subtropical em Porto Iguazu, Argentina. Esses autores quantificaram de $2-6 \times 10^4$ UFC/g de solo entre as amostras, dos quais obtiveram 71 isolados.

O PARNA Viruá possui um mosaico de fitofisionomias e tipos de solo, os quais são em sua maioria hidromórficos, arenosos, pobres quimicamente e ácidos, com pH variando de 3,0 a 5,0 (SCHAEFER; MENDONÇA; FILHO, 2009). O pH ácido do solo é favorável à prevalência de fungos filamentosos, os quais crescem melhor em pH 5,0 (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As parcelas amostradas apresentaram pH que variou de 3,9 a 4,4 (PPBio, 2011), sendo que os ambientes com os maiores valores de pH (4,2 e 4,4) foram os que apresentaram as menores densidades de UFC/g de solo, contrariando a afirmação de que pH próximo a 5,0 seja favorável ao desenvolvimento dos fungos. Por outro lado, o hidromorfismo do solo nessas parcelas pode ter contribuído sobremaneira para a baixa densidade de UFC/g de solo.

5.1.2 Campus Cauamé

O Campus Cauamé possui um mosaico de savana parque à gramíneo-lenhosa, onde os solos são distróficos, ou seja, quimicamente pobres, variando de Latossolo Amarelo a Argissolo Amarelo, com pH ácido entre 4,9 a 6,2 (BENEDETTI, 2007). As densidades estimadas de fungos do Campus Cauamé, que possui ambiente de savana, foram baixas em relação às do PARNA Viruá, que possui ambientes de florestas.

A densidade estimada de fungos filamentosos variou de $1,0 \times 10^5$ a $8,0 \times 10^4$ UFC/g de solo, sendo a média geral de $1,1 \times 10^6$ UFC/g de solo nas cinco parcelas amostradas. Houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as densidades de fungos obtidos a partir dos diferentes tipos de solo amostrados no Campus Cauamé (tabela 5).

Valores baixos de densidade eram esperados devido ao caráter distrófico do solo, ou seja, pobre em nutrientes relacionado ao ambiente de savana. Tendo em vista que o sucesso da colonização de um micro-organismo em determinado solo se deve as condições ambientais, sejam elas físicas (água, aeração, porosidade) ou

químicas (disponibilidade de nutrientes) e também das respostas fisiológicas do micro-organismo às condições predominantes no ambiente (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Além do mais, supõe-se existir uma correlação entre a comunidade de fungos, o tipo de vegetação e as condições edafo-climáticas (ABREU; PFENNING, 2008).

Tabela 5 – Densidade de fungos filamentosos isolados de amostras de solo das parcelas do PPBio no Campus Cauamé - UFRR.

Amostra	Parcela amostrada	Tipo de ambiente/ solo*	pH do solo*	Densidade (UFC/g de solo)
Amostra 1	W2 1250	Campo sujo/ limpo, mosaico de Gleissolo, Neossolo e Latossolo	4,8	1,0 x 10 ⁵ cd
Amostra 2	W4 1250	Campo limpo sob Latossolos	5,3	6,0 x 10 ⁵ a
Amostra 3	W4 1750	Mosaico campo sujo/ limpo sob Latossolos e Plintossolo	5,4	8,0 x 10 ⁴ d
Amostra 4	W2 2200	Mosaico campo sujo/ limpo sob Latossolos	4,7	1,1 x 10 ⁵ c
Amostra 5	W3 2250	Campo sujo/ limpo, mosaico de Gleissolo, Neossolo e Latossolo	5,5	2,7 x 10 ⁵ b
Média Geral				1,1 x 10 ⁶

*Fonte: Construído a partir de Benedetti (2007) e Barbosa et al. (2012). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

A densidade de fungos decresceu na seguinte ordem: amostra 2 > amostra 5 > amostra 4 > amostra 1 > amostra 3. O ambiente que apresentou a maior densidade foi o de campo limpo sob Latossolos (amostra 2) com 6,0 x 10⁵ UFC/g de solo. Por outro lado, o ambiente que apresentou a menor densidade foi o mosaico campo sujo/limpo sob Plintossolo e Latossolo (amostra 3) com 8,0 x 10⁴ UFC/g de solo.

Os ambientes de campo sujo/limpo sob mosaico de Gleissolo, Neossolo e Latossolo (amostra 1) e o mosaico campo sujo/limpo sob Latossolos (amostra 4) apresentaram densidades semelhantes, com 1,0 x 10⁵ e 1,1 x 10⁵ UFC/g de solo respectivamente, mesmo em ambientes caracterizados como distintos. Nota-se, porém, que o pH para ambos os ambientes também são semelhantes com 4,8 e 4,7

respectivamente. Provavelmente neste caso, a presença do Latossolo em ambos os ambientes, assim como a semelhança entre o pH, pode ter influenciado na obtenção de densidades semelhantes. Por outro lado, a amostra 1 e a amostra 5 que são provenientes do mesmo tipo de ambiente/solo, apresentaram diferenças entre as densidades obtidas, com $1,0 \times 10^5$ e $2,7 \times 10^5$ UFC/g de solo respectivamente.

A diferença entre as densidades dos ambientes campo sujo/limpo, sob mosaico de Gleissolo, Neossolo e Latossolo, das amostras 1 e 5, pode ser explicada, em parte, pela diferença entre o pH do solo desses ambientes, de 4,8 (amostra 1) e 5,5 (amostra 5), uma vez que os fatores ambientais, como temperatura, grau de umidade, pH e aeração, têm grande influência sobre o desenvolvimento dos fungos (COLEN, 2006).

A média da precipitação do trimestre no município de Boa Vista, onde se localiza o Campus Cauamé, para o período da coleta, foi da ordem de 142 mm a mínima e 173 mm a máxima (INMET, 2012) caracterizando o período como estação de seca. Para essa mesma estação Melz e Tiago (2009) obtiveram a densidade de fungos de $3,5 \times 10^4$ UFC/g de solo para uma área de reserva natural, caracterizada como transição entre a Amazônia e o Cerrado. Relataram ainda que os fungos predominaram na área de reserva natural no período seco, em detrimento dos demais micro-organismos pesquisados e, concluíram que provavelmente foi a presença de cobertura vegetal que proporcionou melhores condições para o desenvolvimento destes micro-organismos.

Os resultados obtidos neste trabalho para a densidade de fungos no ambiente de savana foi superior ao observado por Souto et al. (2008) em estudo com comunidade microbiana do solo da caatinga, no semi-árido da Paraíba. Esses autores obtiveram em média 1,8 UFC/g de solo e concluíram que a maior taxa de crescimento de fungos foi nos períodos mais secos.

Delabona (2011) assim como Vital e Zilli (2010) salientam a falta de estudos sobre a microbiota do solo na região Amazônica. Fato que dificulta a discussão com relação ao isolamento e densidade de fungos filamentosos oriundos do solo dessa região, assim como do ambiente de savana devido às características peculiares de fitofisionomia e tipo de solo.

5.2 AGRUPAMENTO EM MORFOTIPOS DE FUNGOS FILAMENTOSOS

O agrupamento em morfotipos de fungos filamentosos foi realizado após o isolamento desses micro-organismos, os quais foram distinguidos e agrupados com base em características fenotípicas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Com base no agrupamento e na quantificação dos morfotipos de fungos filamentosos isolados das diferentes amostras de solos do PARNA Viruá e do Campus Cauamé, nos meios Sabouraud (SB) e Yeast Malt Agar (YMA), foram obtidos os resultados apresentados a seguir.

5.2.1 Parque Nacional do Viruá

A partir das amostras de solo do PARNA Viruá, foi possível isolar um total de 167 morfotipos de fungos filamentosos, distribuídos nas seis parcelas amostradas (tabela 6) dos quais, 90 foram isolados no meio Sabouraud (SB) e 77 no meio Yeast Malt Agar (YMA).

A maior quantidade de morfotipos foi obtida na amostra 2, descrito como serras baixas e inselbergs com floresta aberta sobre Latossolos, Cambissolos e Neossolos Litólico, onde foram isolados 20 morfotipos em meio SB, e 18 em meio YMA.

A menor quantidade obtida no meio SB foi na amostra 3, descrito como igapó e bacia do rio Iruá em solos Hidromórficos, com 8 morfotipos isolados; no meio YMA, a menor quantidade foi obtida na amostra 6, descrito como rampas e superfície pediplana com tensão ecológica de floresta aberta sobre Latossolos e Cambissolos, com 8 morfotipos isolados.

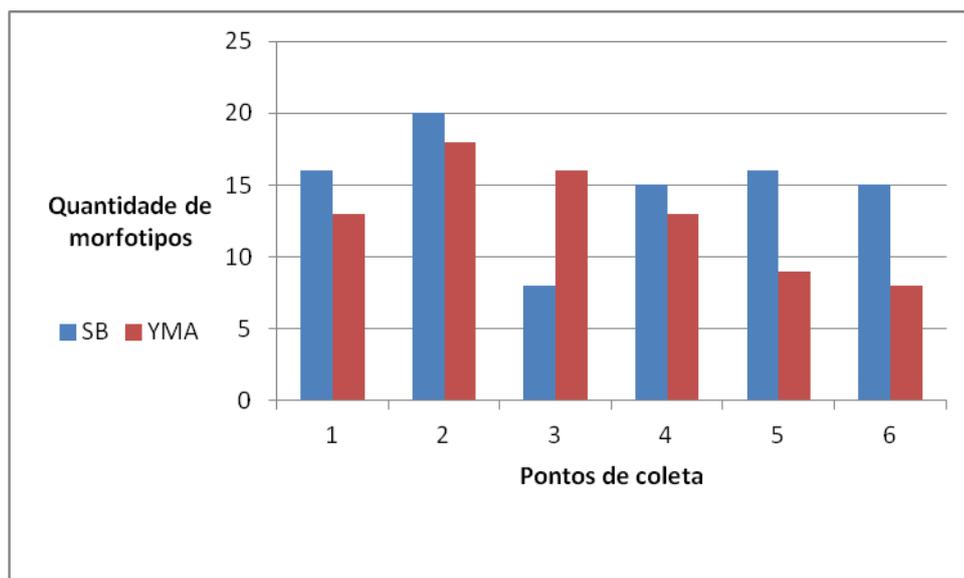
A maior quantidade de morfotipos foi obtida no meio SB, como mostrado na figura 19. O meio YMA apenas na amostra 3 foi melhor que o meio SB, em termos de quantificação de morfotipos.

Tabela 6 – Quantidade de morfotipos de fungos filamentosos isolados de diferentes tipos de solos do PARNA VIRUÁ - RR, nos meios de cultura Sabouraud (SB) e Yeast Malt Agar (YMA).

Amostra	Parcela Amostrada	Tipo de Solo*	pH do solo*	Quantidade de Morfotipos	
				SB	YMA
Amostra 1	Ced – L1N1	Cambissolos e Latossolos	3,9	16	13
Amostra 2	Sbi – L2N2	Latossolos, Cambissolos e Neossolos	3,9	20	18
Amostra 3	Iri – L1N3	Solos Hidromórficos	4,2	08	16
Amostra 4	Mpa – L3N1	Solos Arenosos	4,4	15	13
Amostra 5	Rfa – L3N3	Latossolos e Cambissolos	3,9	16	09
Amostra 6	Rfa – L3N3	Latossolos e Cambissolos	3,9	15	08
Total de Isolados				90	77
Total Geral (Morfotipos)				167	

*Fonte: Construído a partir de PPBio (2011).

Figura 19 – Quantidade de morfotipos de fungos filamentosos isolados de diferentes tipos de solos do PARNA VIRUÁ - RR, nos meios de cultura Sabouraud (SB) e Yeast Malt Agar (YMA).



5.2.2 Campus Cauamé

No Campus Cauamé foram isolados 50 morfotipos de fungos filamentosos, distribuídos nas cinco parcelas coletadas, como mostrado na tabela 7, sendo um total de 18 morfotipos isolados no meio Sabouraud (SB) e 32 no meio Yeast Malt Agar (YMA).

A maior quantidade de morfotipos foi obtida na amostra 5, com solo do tipo Gleissolo, onde foi possível isolar 13 morfotipos no meio YMA. A menor quantidade foi na amostra 3, utilizando o meio SB, do qual foi obtido somente um morfotipo, que se apresentou como dominante para o ambiente amostrado.

No Campus Cauamé as maiores quantidades de morfotipos foram obtidas no meio YMA como mostrado na figura 20. A maior diferença entre as quantidades de morfotipos isolados foi observada para a amostra 5, onde no meio YM foi possível isolar 13 morfotipos, enquanto que no meio SB foram isolados 6. O meio YMA para o ambiente do Campus Cauamé proporcionou o isolamento da maior quantidade de morfotipos de fungos filamentosos do solo, oposto do PARNA Viruá, onde o meio SB se mostrou melhor para o isolamento destes micro-organismos naquele tipo de ambiente.

Para o isolamento de micro-organismos em meio de cultura devemos considerar seus requerimentos nutricionais específicos, além dos requerimentos ambientais, como pH e temperatura. No entanto, as características dos meios de cultura não refletem necessariamente, as mesmas encontradas no meio ambiente (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Sendo assim, meios de cultura com várias composições devem ser testados a fim de determinar qual o mais adequado para se obter a maior densidade e diversidade de populações de fungos filamentosos em determinado tipo de solo.

A riqueza de um ambiente é definida como o número de espécies presentes nesse meio (VITAL; ZILLI, 2010). Esse trabalho não teve como objetivo inferir a riqueza dos fungos filamentosos dos diferentes tipos de solo nos ambientes de floresta do PARNA Viruá e no de savana do Campus Cauamé. No entanto, podemos prever a riqueza desses ambientes tomando como base o número absoluto de morfotipos obtidos para cada amostra (tabelas 8 e 9).

Tabela 7 – Quantidade de morfotipos de fungos filamentosos isolados de diferentes tipos de solos do Campus Cauamé - UFRR, nos meios de cultura Sabouraud (SB) e Yeast Malt Agar (YMA).

Amostra	Parcela amostrada	Tipo de Solo*	pH do solo*	Quantidade de Morfotipos	
				SB	YM
Amostra 1	W2 1250	Gleissolo, Neossolo, Latossolo	4,8	04	05
Amostra 2	W4 1250	Latossolo	5,3	04	05
Amostra 3	W4 1750	Latossolo, Plintossolo	5,4	01	04
Amostra 4	W2 2200	Latossolo	4,7	03	05
Amostra 5	W3 2250	Gleissolo, Neossolo, Latossolo	5,5	06	13
Total de isolados				18	32
Total geral (morfotipos)				50	

*Fonte: Construído a partir de Benedetti (2007) e Barbosa et al. (2012).

Figura 20 – Quantidade de morfotipos de fungos filamentosos isolados de diferentes tipos de solos do Campus Cauamé - UFRR, nos meios de cultura Sabouraud (SB) e Yeast Malt Agar (YMA).

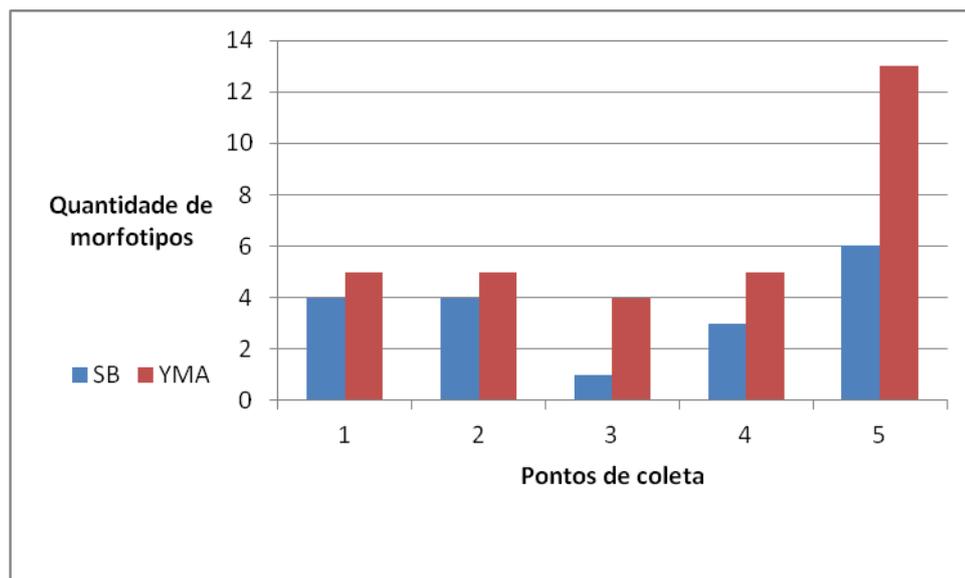


Tabela 8 – Riqueza de fungos filamentosos representada pelo número absoluto de morfotipos isolados de diferentes tipos de solos e ambientes do PARNA Viruá - RR.

Amostra	Tipo de ambiente/solo*	Densidade (UFC/g)	Quantidade de morfotipos
Amostra 1	Colinas e encostas dissecadas e florestadas com Cambissolos e Latossolos	$1,0 \times 10^6$	29
Amostra 2	Serras baixas e inselbergs com floresta aberta sobre Latossolos, Cambissolos e Neossolos Litólicos	$1,5 \times 10^6$	38
Amostra 3	Igapó e bacia do rio Iruá com solos Hidromórficos	$4,0 \times 10^5$	24
Amostra 4	Mosaico de patamares arenosos baixos inundáveis com campinarana arbóreo-arbustiva	$6,0 \times 10^5$	28
Amostra 5	Rampas e superfície pediplanada com tensão ecológica de floresta aberta sobre Latossolos e Cambissolos	$9,0 \times 10^6$	25
Amostra 6	Rampas e superfície pediplanada com tensão ecológica de floresta aberta sobre Latossolos e Cambissolos	$1,4 \times 10^6$	23

Tabela 9 – Riqueza de fungos filamentosos representada pelo número absoluto de morfotipos isolados de diferentes tipos de solos e ambientes do Campus Cauamé - UFRR.

Amostra	Tipo de ambiente/ solo*	Densidade (UFC/g)	Quantidade de morfotipos
Amostra 1	Campo sujo/ limpo, mosaico de Gleissolo, Neossolo e Latossolo	$1,0 \times 10^5$	9
Amostra 2	Campo limpo sob Latossolos	$6,0 \times 10^5$	9
Amostra 3	Mosaico campo sujo/ limpo sob Latossolos e Plintossolo	$8,0 \times 10^4$	5
Amostra 4	Mosaico campo sujo/ limpo sob Latossolos	$1,1 \times 10^5$	8
Amostra 5	Campo sujo/ limpo, mosaico de Gleissolo, Neossolo e Latossolo	$2,7 \times 10^5$	19

No PARNA Viruá a amostra 2 apresentou a maior riqueza com relação aos morfotipos obtidos. Da qual foi possível isolar 38 morfotipos distintos. A segunda e a terceira maior riqueza de morfotipos foram observadas nas amostras 1 e 4, das

quais foi possível isolar 29 e 28 morfotipos respectivamente. Nas demais amostras (6, 3 e 5) os números de morfotipos isolados foram aproximados, com 23, 24 e 25, respectivamente.

No Campus Cauamé a amostra 5 apresentou a maior riqueza com 19 morfotipos. No entanto, a quantidade de morfotipos entre as amostras 1, 2 e 4 foram semelhantes com nove e oito morfotipos. A amostra 3 apresentou a menor, riqueza da qual foram obtidos cinco morfotipos.

De modo geral, as amostras do ambiente de floresta do PARNA Viruá, em relação às amostras do ambiente de savana do Campus Cauamé, tiveram as maiores densidades de UFC/g⁻¹ de solo e também a maior riqueza representada pelas quantidades de morfotipos isolados, uma vez que riqueza pode ser expressa pelo número de espécies. Contudo, é necessário investigar melhor a relação densidade x riqueza, uma vez que, esta é expressa como uma relação linear entre a riqueza de espécies e o número de indivíduos entre amostras do mesmo ambiente (MATOS; SILVA; BERBARA, 1999) para afirmar em qual amostra houve o melhor índice de riqueza.

5.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS DE FUNGOS FILAMENTOSOS

O método clássico para se identificar fungos filamentosos leva em consideração principalmente, as características morfológicas das estruturas reprodutivas (sexual e assexual). Em muitos casos, pode não ocorrer a produção de tais estruturas, sendo necessário alterar as condições de cultivo a fim de induzir a esporulação. No entanto, isso é possível somente para isolados cultiváveis. Em todos os casos, deve se realizar uma preparação microscópica das estruturas, as quais são comparadas com aquelas da literatura por meio de chaves de identificação (AZEVEDO; ARAÚJO; INÁCIO, s/d).

Através da caracterização das colônias de fungos filamentosos obtidos do PARNA Viruá e do Campus Cauamé, foi possível separá-las quanto ao seu aspecto, dividindo-as em: colônias veludas, cotonosas, pulverulentas, penugentas, arenosas, filamentosas e glabrasas (figuras 21 e 22).

Como demonstrado na figura 23, os fungos filamentosos isolados do PARNA Viruá apresentaram em sua maioria (62%) colônias do tipo veludosa, seguido de colônias do tipo cotonosas (27%) e colônias pulverulentas (8%), outros tipos de colônias somaram 3%, sendo elas: arenosas, penugentas e filamentosas.

Figura 21 – Caracterização das colônias de fungos filamentosos isolados de diferentes tipos de solos do PARNA Viruá - RR.

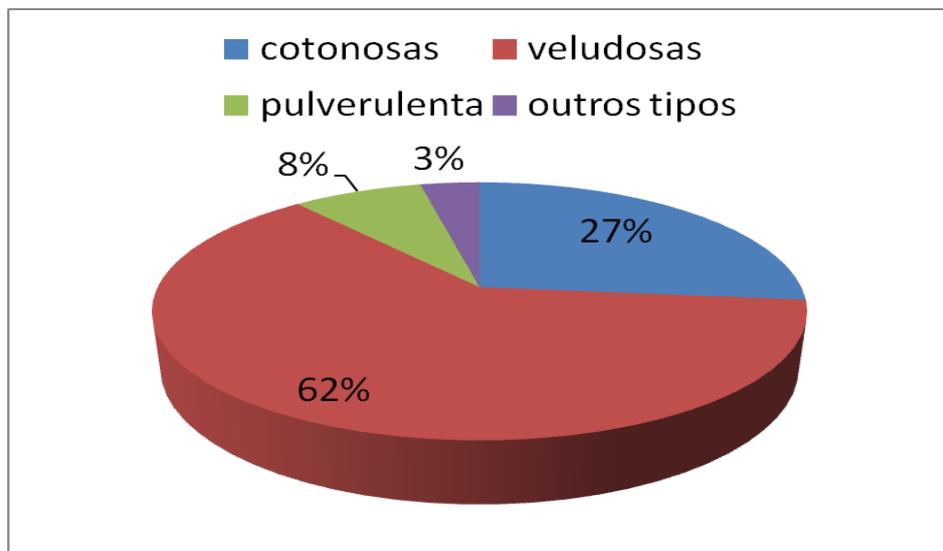
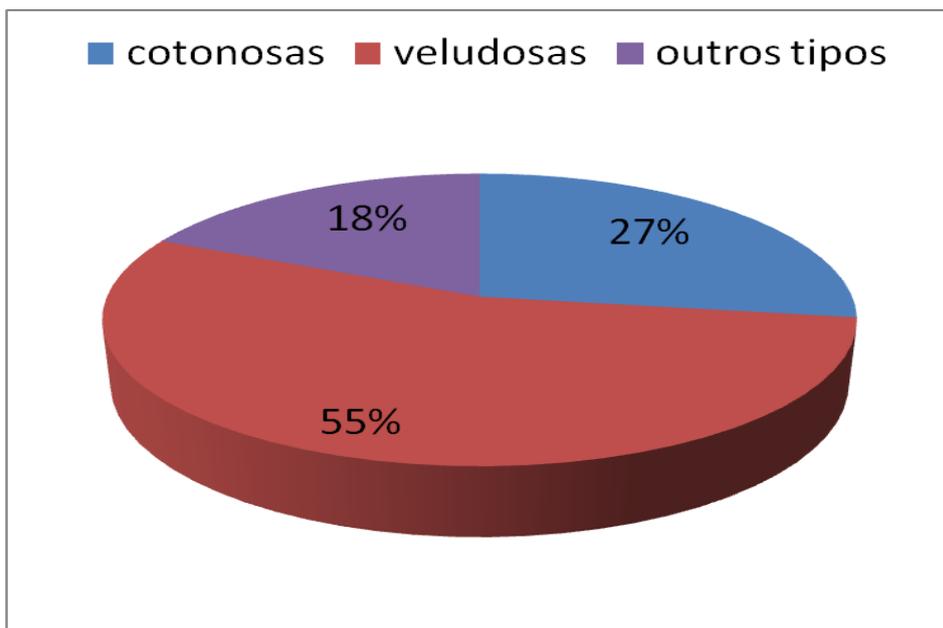


Figura 22 – Caracterização das colônias de fungos filamentosos isolados de diferentes tipos de solos do Campus Cauamé - UFRR.



No Campus Cauamé 55% das colônias de fungos filamentosos isolados foram caracterizadas como veludas e 27% como cotonosas, outros tipos somaram 18%, sendo eles: glabrasas e filamentosas.

Os fungos filamentosos obtidos do PARNA Viruá se encontram em fase de identificação. Porém, dados preliminares dos morfotipos que foram identificados, mostram que os isolados pertencem aos gêneros: *Aspergillus* (17), *Penicillium* (9), *Cladosporium* (1) e *Acremonium* (1).

As colônias entre os isolados do gênero *Aspergillus* variaram de veludas, passando para pulverulentas após alguns dias de crescimento, as quais foram consideradas como pulverulentas na caracterização. As colônias veludas de *Aspergillus sp.* variaram em coloração apresentando tons de branco, amarelo, bege, marrom claro e escuro e verde claro e escuro. As colônias pulverulentas apresentaram coloração de esporos em verde, preto e marrom. Luiz (2010) realizou a identificação fenotípica de um isolado do gênero *Aspergillus* caracterizando a colônia como pulverulenta de coloração verde e a identificação genotípica desse isolado confirmou tratar-se de *Aspergillus fumigatus*. Gava (2002) caracterizou a coloração de colônias de *Aspergillus sp.* variando do branco, passando pelo amarelo, rosa, marrom e preto, com aspecto de borra de café em *A. niger*. No presente trabalho, esse gênero também apresentou colônias cotonosas que variaram do branco ao cinza.

As colônias do gênero *Penicillium* foram caracterizadas como veludas em sua maioria e uma arenosa, as quais apresentaram coloração variando do branco, bege, rosado, verde claro e escuro, amarelo e marrom. Luiz (2010) caracterizou 5 colônias do gênero *Penicillium* como aveludadas de coloração verde a esverdeada com centro branco, com características macroscópicas semelhantes as obtidas neste trabalho.

A ocorrência dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* dentre os isolados de solo do PARNA Viruá são semelhantes aos resultados obtidos por Cavalcanti et al. (2006) que isolaram os gêneros *Penicillium* com 31 espécies e *Aspergillus* com 17 espécies, os quais foram os mais diversos, em solos da região do Xingó.

Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* também foram isolados por Simões (2006), em solos da caatinga. Além dos já citados, foram isolados também *Mucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Hiphomyceto*, *Fusarium*, *Clamidosporium*, *Humícola* e *Emericellopsis* no período seco. Para o período chuvoso a autora isolou sete

gêneros sendo: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Actinomyces*, *Nigrospora* e *Epicoccum*. Ressalta-se a ocorrência dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* nos dois períodos amostrados (seco e chuvoso).

Delabona (2011) obteve 110 linhagens pertencentes aos gêneros: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Penicillium* e *Mucor*, isolados de solo de uma reserva de floresta amazônica nativa na Amazônia Oriental. Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são cosmopolitas, sendo comum sua ocorrência no solo, como relatado por Blackwell (2011).

A colônia de *Acremonium sp.* foi caracterizada como cotonosa a qual apresentou coloração cinza no centro e branca nas bordas da colônia. O gênero *Acremonium* compreende espécies que são sapróbias no solo, as quais podem ocasionar patologias em humanos como agentes de micoses oportunistas (BRAZ et al., 2009). Resultado semelhante ao deste trabalho foi obtido por Cabello e Arambarri (2002) que isolaram uma espécie de *Acremonium* em solos de floresta não perturbada em Buenos Aires.

Cladosporium sp. foi caracterizado com colônia veludosa que apresentou coloração bege rosado, variando a tons de lilás. A coloração marrom e acinzentada com colônia veludosa foi observada por Luiz (2010) para um isolado desse gênero obtido de amostra de talcos comerciais cosméticos. Silva et al. (2011) isolaram um representante desse gênero em solo de sistemas agroflorestais, resultado semelhante ao deste trabalho.

Borges et al. (2011) obtiveram em amostras de solo de área de monocultivo de erva-mate os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Trichoderma*. Ressalta-se que os quatro primeiros também foram obtidos no presente trabalho em solos de floresta. Esses autores enfatizam que todos os gêneros reportados são comuns em solos de florestas, campos, solos arenosos ou áreas cultivadas.

5.4 MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS DE FUNGOS FILAMENTOSOS

A preservação e manutenção das culturas de fungos devem ser realizadas de forma a garantir a sobrevivência do micro-organismo, bem como a conservação das

propriedades morfológicas, fisiológicas, características genéticas e a pureza dos isolados durante períodos prolongados (CAVALCANTI, 2010).

As metodologias mais adequadas para preservação e manutenção dos micro-organismos por períodos prolongados baseiam-se na redução do metabolismo ao nível de dormência (COCHANE, 1958). Desse modo, não existe um método universal que seja eficiente para a preservação de todos os gêneros e espécies de fungos, devido suas diferenças metabólicas e fisiológicas.

Os métodos usualmente empregados para a manutenção de micro-organismos são o uso de óleo mineral, água destilada esterilizada, baixas temperaturas e liofilização. Cavalcanti (2010) relata que os métodos preferencialmente recomendados para preservação de fungos filamentosos são a criopreservação e a liofilização. Esses métodos garantem a viabilidade por períodos prolongados e minimizam os riscos de contaminação e alterações fenotípicas e genéticas.

Um método frequentemente utilizado para a preservação de isolados de fungos filamentosos é através de repiques sucessivos. Porém, esse método além de trabalhoso e dispendioso acarreta em alterações nas características fisiológicas das culturas, o que pode levar a perda da viabilidade (CAVALCANTI, 2010).

Todos os isolados de fungos filamentosos em cultura pura obtidos de diferentes tipos de solo do ambiente de floresta do PARNA Viruá e do ambiente de savana do Campus Cauamé foram mantidos em meio BDA, com manutenção realizada através de repiques periódicos de em média a cada quatro meses.

A perda de viabilidade dos isolados do PARNA Viruá ficou em torno de 30% e do Campus Cauamé em torno de 40%. Os isolados de fungos filamentosos que não apresentaram crescimento em nenhum momento durante os repiques de manutenção em meio BDA foram transferidos para os meios líquidos Sabouraud e GYMP, visando à melhoria da aeração e revigoração do inóculo. Foram também repicados para os meios sólidos Sabouraud, YMA e Czapeck visando à confirmação da pureza do isolado. Contudo, em poucos casos obteve-se sucesso no revigoração.

A perda da viabilidade de um isolado ocorre principalmente pelo fato dos meios de cultura não conseguirem suprir as exigências nutricionais do inóculo, uma vez que micro-organismos fastidiosos, ou seja, exigentes, possuem requerimentos

nutricionais complexos e indefinidos. Além do mais, cada espécie de fungo têm seu parâmetro ótimo para pH e temperatura como relatado por Colen (2006).

5.5 SELEÇÃO DE LINHAGENS PRODUTORAS DE AMILASE E LIPASE

Foram testados 50 isolados do PARNA Viruá e 20 isolados do Campus Cauamé, os quais foram classificados como atividade positiva (+) e atividade negativa (-) para a produção das enzimas amilase e lipase.

Do quantitativo de isolados testados do PARNA Viruá (tabela 10), 46% apresentaram atividade positiva (+) para a detecção de lipase e 26% apresentaram atividade positiva (+) para a detecção de amilase. Por outro lado, os isolados do Campus Cauamé (tabela 11), 70% apresentaram atividade positiva (+) para a detecção de lipase e 40% apresentaram atividade positiva (+) para a detecção de amilase.

Alguns isolados de fungos filamentosos apresentaram atividade positiva para ambas as enzimas testadas. No PARNA Viruá esses isolados representaram 18% das atividades positivas para ambas as enzimas, os quais foram: VR-SC 57 (*Aspergillus flavus*), VR- SC 140 (*Aspergillus terreus*) VR-SC 134.1 (*Aspergillus sp.*), VR-SC 138 (*Aspergillus sp.*), VR-SC 59, VR-YM 117, VR-YM 118 e VR-YM 153. No Campus Cauamé, 23% de isolados de fungos filamentosos apresentaram atividade para ambas as enzimas, os quais foram: CA-YM 29, CA-YM 54, CA-YM 57, CA-YM 32, CA-YM 115 e CA-YM 118.

Colen, Junqueira e Moraes-Santos (2006) enfatizam que um bom processo de seleção primária garante o sucesso ou falha na produção de enzimas de interesse, assim como Farias (2008) que afirma ser o *screening* um passo essencial no processo de busca por um produto biotecnológico.

Assim como neste trabalho, Balkan, Balkan e Ertan (2011) realizaram o *screening* em placa para a atividade de α -amilase em 39 isolados de *Trichothecium roseum*, que precedeu a produção enzimática em fermentação em estado sólido. Chimata, Chetty e Suresh (2011) realizaram *screening* em espécies de *Aspergillus* visando à identificação de isolados produtores de amilase, sendo que uma linhagem de *A. niger* mostrou a melhor atividade enzimática, e foi utilizada em estudos posteriores de produção em fermentadores e otimização do processo.

Tabela 10 – Resultado do teste qualitativo para produção de amilase e lipase por fungos filamentosos isolados de solos do PARNA Viruá - RR.

Código do Isolado	Identificação	Teste Qualitativo		Código do Isolado	Identificação	Teste Qualitativo	
		Amilase	Lipase			Amilase	Lipase
VR- SC 124	<i>Acremonium sp.</i>	-	+	VR- SC 38	Não identificado	-	-
VR- SC 57	<i>Aspergillus flavus</i>	+	+	VR- YM 42	Não identificado	-	+
VR- SC 80	<i>Aspergillus niger</i>	-	-	VR- SC 44	Não identificado	-	-
VR- SC 03	<i>Aspergillus sp.</i>	-	-	VR- SC 55	Não identificado	-	+
VR- SC 22	<i>Aspergillus sp.</i>	-	+	VR- SC 59	Não identificado	+	+
VR- SC 66	<i>Aspergillus sp.</i>	-	+	VR- SC 60	Não identificado	+	-
VR- SC 92	<i>Aspergillus sp.</i>	-	-	VR- SC 67	Não identificado	-	-
VR- SC 111	<i>Aspergillus sp.</i>	-	-	VR- SC 70	Não identificado	-	-
VR- SC 113	<i>Aspergillus sp.</i>	+	-	VR- YM 86	Não identificado	-	-
VR- SC 134.1	<i>Aspergillus sp.</i>	+	+	VR- YM 92	Não identificado	-	-
VR- SC 138	<i>Aspergillus sp.</i>	+	+	VR- YM 96	Não identificado	-	+
VR- SC 139	<i>Aspergillus sp.</i>	-	-	VR- YM 97.1	Não identificado	-	-
VR- SC 140	<i>Aspergillus terreus</i>	+	+	VR- YM 117	Não identificado	+	+

Continuação

VR- SC 79	<i>Aspergillus versicolor</i>	+	-	VR- YM 118	Não identificado	+	+
VR- SC 15	<i>Penicillium sp.</i>	-	+	VR- SC 122	Não identificado	-	-
VR- SC 26	<i>Penicillium sp.</i>	-	+	VR- SC 123	Não identificado	-	+
VR- SC 81	<i>Penicillium sp.</i>	-	+	VR- SC 125	Não identificado	-	-
VR- SC 104	<i>Penicillium sp.</i>	-	-	VR- SC 128	Não identificado	-	-
VR- SC 142	<i>Penicillium sp.</i>	-	+	VR- SC 132	Não identificado	-	-
VR- SC 144	<i>Penicillium sp.</i>	-	-	VR- YM 141	Não identificado	-	-
VR- YM 01	Não identificado	-	-	VR- SC 143	Não identificado	-	-
VR- SC 11	Não identificado	-	+	VR- SC 145	Não identificado	-	+
VR- SC 23	Não identificado	-	+	VR- SC 146	Não identificado	+	-
VR- SC 27	Não identificado	-	+	VR- SC 147	Não identificado	+	-
VR- YM 28	Não identificado	-	-	VR- YM 153	Não identificado	+	+

Tabela 11 – Resultado do teste qualitativo para produção de amilase e lipase por fungos filamentosos isolados de solos do Campus Cauamé - UFRR.

Código Isolado	Teste Qualitativo		Código Isolado	Teste Qualitativo	
	Amilase	Lipase		Amilase	Lipase
CA-SC 01	-	-	CA-YM 54	+	+
CA-SC 06	-	+	CA-YM 54.1	-	+
CA-SC 21	-	-	CA-YM 57	+	+
CA-SC 23.1	-	+	CA-YM 71	-	+
CA-YM 25.1	-	+	CA-YM 74	-	+
CA-YM 29	+	+	CA-YM 74.1	-	+
CA-YM 30	-	+	CA-YM 96	+	-
CA-YM 32	+	+	CA-YM 98	-	-
CA-YM 33	+	-	CA- YM 115	+	+
CA-YM 52	-	-	CA-YM 118	+	+

(+) presença de halo indicativo da atividade enzimática. (-) ausência de halo indicativo da atividade enzimática.

Outro estudo de *screening* foi realizado por Alves et al. (2002) com 56 isolados do gênero *Mucor* para atividade de amilase, lipase e outras enzimas, dos quais 84% produziram amilase e 66% produziram lipase. Rajesh et al. (2010) realizaram *screening* para atividade lipolítica em isolados de *Trichoderma reesei* utilizando meio suplementado com tributirina. Esses autores relatam que a verificação da atividade de lipase pela produção de zonas de hidrólise em meio com tributirina é um bom preditor da habilidade de micro-organismos em produzir lipase, a qual também foi utilizada como indutor para atividade enzimática da lipase no presente trabalho.

Hawksworth (2009) destaca os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* sp. como produtores das enzimas celulase, lacase, lipase, pectinase, protease e xilanase. Assim como Pandey et al. (2000) destacam as espécies do gênero *Aspergillus* e

Rhizopus como produtores de amilases, as quais têm sido empregadas em diversos processos industriais. As afirmações de Hawksworth (2009) e de Pandey et al. (2000) corroboram para o resultado deste trabalho, onde se observou a atividade positiva no *screening* para as enzimas amilase e lipase por isolados do gênero *Aspergillus*.

Espécies do gênero *Aspergillus* são comumente utilizadas para produção de amilase e lipase em fermentação em estado sólido e também em fermentação submersa. Chimata, Chetty e Suresh (2011) investigaram a produção de amilase por *Aspergillus sp.* utilizando fermentação submersa. Por outro lado, Castro et al. (2010) utilizaram *A. awamori* para fermentação em estado sólido visando à produção dessa enzima, assim como Parbat e Singhal (2011) que por sua vez utilizaram *A. oryza*, e ainda, Farid e Shata (2011) que utilizaram *Aspergillus sp.* visando à produção de amilase em fermentação em estado sólido.

Em outro estudo, Morya e Yadav (2009) investigaram a produção de amilase por várias espécies de *Aspergillus* (*A. tamaraii*, *A. niger*, *A. awamori*, e *A. flavus*). Enquanto que, Bakiri, Magali e Thonart (2009) também utilizaram *A. flavus* para produção de amilase em fermentação submersa. Ainda, Moreira et al. (2001) verificaram a produção de amilase por isolados do gênero *Aspergillus* (*A. glaucus*, *A. clavatus*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. janus*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *A. tamaraii*, *A. fumigatus* e *A. flavus*) utilizando diferentes fontes de carbono em fermentação submersa e fermentação em estado sólido.

Os trabalhos anteriormente citados corroboram com o resultado positivo no teste qualitativo para produção de amilase pelo isolado de *A. flavus* e demonstram a habilidade de várias espécies do gênero *Aspergillus* em produzir amilase em diferentes condições de fermentação.

O fungo filamentoso *A. niger* é citado como produtor de amilase (PANDEY et al., 2000) e de lipase (MALA; KAMINI; PUVANAKRISHNAN, 2001), sendo frequentemente utilizado para produção da amilase em fermentação submersa (SPIER et al., 2006; GUPTA et al., 2008; VARALAKSHIMI et al., 2009; SUGANTHI et al., 2011) e também em fermentação em estado sólido (SLIVINSKI et al., 2011).

Damaso et al. (2008) e Dutra et al. (2008) utilizaram *A. niger* em fermentação em estado sólido visando à produção de lipase com diferentes características catalíticas. Contudo, neste trabalho o isolado *A. niger* (VR-SC 80) não apresentou atividade positiva no teste qualitativo para amilase, assim como para lipase.

Os isolados identificados como do gênero *Penicillium*: VR-SC 15, VR-SC 26, VR-SC 81, VR-SC 104, VR-SC 142 e VR-SC 144 não apresentaram atividade para amilase. Entretanto, espécies desse gênero são relatadas na literatura como produtoras dessa enzima (SOUZA; MAGALHÃES, 2010).

Contrariando os resultados obtidos neste trabalho para a atividade de amilase por *Penicillium sp.*, alguns autores utilizaram espécies desse gênero para produção de amilase com diferentes características em fermentação submersa. Kathiresan e Manivannan (2006) utilizaram *P. fellutanum* isolado de solo de mangue para produção de α -amilase e Silva et al. (2011) utilizaram *P. purpurogenum* isolado de solo para produção de amilase termoestável, da qual obtiveram estabilidade enzimática a 65°C, favorecendo a aplicação desta em processos que requeiram temperaturas elevadas.

Em fermentação em estado sólido Ertan et al. (2006) utilizaram *P. chrysogenum* para produção de α -amilase usando diferentes resíduos agroindustriais como substrato. Esses autores concluíram que a combinação de farelo de trigo, farinha de girassol e torta de beterraba pode ser usada para melhorar a produção de α -amilase por *P. chrysogenum*. No entanto, a produção deverá ser otimizada para uso em escala comercial. Em outro estudo, Metin et al. (2010) após realizar um *screening* com 97 isolados de fungos, selecionaram a linhagem de *P. citrinum*, que mostrou ser o melhor produtor de amilase com base na mensuração do diâmetro do halo, o qual foi então selecionado para produção, caracterização e purificação da α -amilase.

Neste trabalho, apenas um isolado do gênero *Penicillium* apresentou atividade negativa para lipase, demonstrando a capacidade desse gênero de fungos filamentosos como produtores dessa enzima. Treichel et al. (2010) destaca as espécies dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* como produtoras de lipase, e também espécies dos gêneros *Geotrichum*, *Rhizopus* e *Rhizomucor*.

Em consonância com os resultados obtidos neste trabalho para atividade positiva de lipase por espécies do gênero *Penicillium*, Azeredo et al. (2007) utilizaram *P. restrictum* em fermentação submersa e também em estado sólido. Os autores concluíram que a produção de enzimas é bastante diferente entre as metodologias utilizadas, na qual a fermentação submersa apresentou os melhores resultados. Por outro lado, Kempka et al. (2008) utilizaram *P. verrucosum* em

fermentação em estado sólido para produção de lipase, do qual obtiveram bons resultados utilizando farelo de soja como indutor.

Espécies do gênero *Acremonium* são citadas na literatura como produtoras de amilase (PANDEY et al., 2000) e de lipase (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Braz et al. (2009) testaram 31 espécies desse gênero para atividade de amilase, sendo que desse total 16 isolados degradaram amido. Esse resultado difere do obtido neste trabalho para o isolado VR-SC 124 que não apresentou atividade amilásica. Entretanto, esse isolado apresentou atividade positiva para lipase, contrariando o resultado obtido por Cuzzi et al. (2011) onde um isolado de *Acremonium sp.* apresentou resultado negativo para essa enzima.

Dos 70 isolados de fungos filamentosos que foram submetidos ao *screening* para as atividades de amilase e lipase, a atividade positiva para lipase correspondeu a 53% dos isolados, por outro lado, a atividade positiva para amilase correspondeu a 30%. Ressalta-se que 20% do total dos isolados apresentaram atividade positiva para ambas as enzimas.

Nos micro-organismos, as lipases estão envolvidas em várias etapas do metabolismo de lipídeos, incluindo digestão, absorção e metabolismo de lipoproteínas (TREVISAN, 2004). Esse fato corrobora com os resultados deste trabalho onde o maior percentual dos isolados de fungos filamentosos testados apresentou a capacidade de produzir lipase.

Enzimas amilolíticas, principalmente as do tipo α -amilase são produzidas extracelularmente por uma grande variedade de micro-organismos (GUPTA et al., 2003). Entretanto, a molécula de amido é formada por unidades de amilose e amilopectina, as quais necessitam de várias enzimas agindo conjuntamente para que ocorra sua hidrólise completa (MORAES, 2004). Contudo, neste trabalho observou-se maior habilidade pelos isolados de fungos filamentosos desses ambientes em produzir a enzima lipase em detrimento da amilase.

As figuras 23 e 24 mostram halos característicos da evidência das atividades de amilase e lipase por isolados do PARNA Viruá e Campus Cauamé.

5.6 AVALIAÇÃO SEMIQUANTITATIVA DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

Um processo de busca e descoberta de produtos naturais a partir de recursos microbianos começa pela coleta do material biológico, pré-seleção e triagem de materiais, seleção final dos melhores candidatos a partir de uma lista reduzida de opções, que culmina com o desenvolvimento de um produto comercial (OLIVEIRA; SETTE; FANTINATTI-GARBOGGINI, 2006).

Desse modo, a avaliação semiquantitativa, denominada índice enzimático (IE) da produção de enzimas por micro-organismos, produz uma lista reduzida de melhores opções, que se baseia na relação direta entre a capacidade de degradação do substrato pelo micro-organismo e o diâmetro da área degradada, ou seja, o halo formado pela hidrólise do meio seletivo para a enzima testada (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

Figura 23 – Halos característicos da detecção da atividade de amilase (A) e da atividade de lipase (B) por isolados de fungos filamentosos de solo do PARNA Viruá - RR.

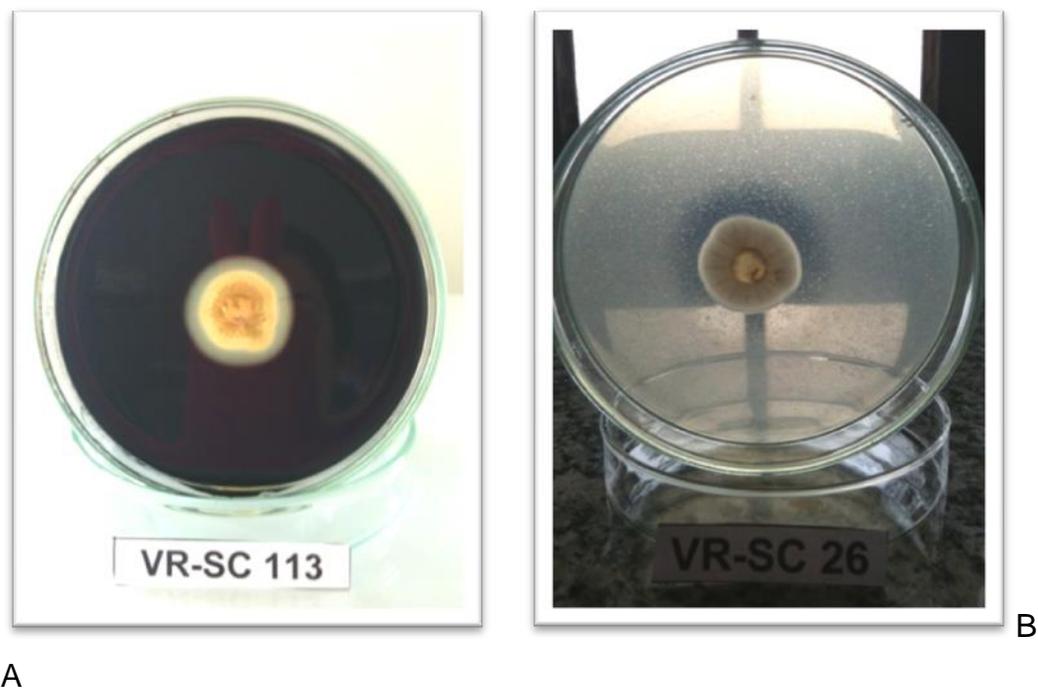


Figura 24 – Halos característicos da detecção da atividade de amilase (A) e da atividade de lipase (B) por isolados de fungos filamentosos de solo do Campus Cauamé - UFRR.



5.6.1 Produção de amilase

Dos 50 isolados do PARNA Viruá testados qualitativamente para produção de amilase, 13 apresentaram resultado positivo, representando 26%, os quais foram avaliados quanto ao índice enzimático e produção enzimática (PZ). Os resultados da avaliação semiquantitativa para produção da amilase dos isolados do PARNA Viruá são mostrados na tabela 12.

Os 13 isolados do PARNA Viruá que apresentaram resultado positivo no *screening* para amilase foram classificados quanto à produção enzimática como PZ 2 (atividade positiva). Os isolados VR-SC 134.1 (*Aspergillus sp.*), VR-SC 79 (*A. versicolor*) e VR-YM 118 apresentaram o melhor índice enzimático (IE 0.68) dentre os demais. Houve diferença significativa de acordo com a análise estatística entre as médias dos índices enzimáticos dos isolados.

Cuzzi et al. (2011) obtiveram para isolado de *Aspergillus sp.* um IE de 0.66 para a atividade amilolítica, índice semelhante ao obtido neste trabalho para os isolados *Aspergillus sp.* (VR-SC 134.1) e *A. versicolor* (VR-SC 79) que apresentaram

IE de 0.68. Outros isolados de *Aspergillus* apresentaram índices enzimáticos de 0.73 (*Aspergillus sp.*), 0.76 (*A. terreus*), 0.80 (*Aspergillus sp.*) e 0.89 (*A. flavus*).

Tabela 12 – Resultado da avaliação semiquantitativa da atividade de amilase dos isolados de fungos filamentosos de solos do PARNA Viruá - RR.

Código isolado	Identificação	Média do dhc* (cm)	Diâmetro médio da colônia (cm)	Índice Enzimático	PZ**
VR-SC 134.1	<i>Aspergillus sp.</i>	2,5	1,7	0.68 a	2
VR-SC 79	<i>Aspergillus versicolor</i>	3,2	2,2	0.68 a	2
VR-YM 118	Não identificado	3,5	2,4	0.68 a	2
VR-SC 138	<i>Aspergillus sp.</i>	2,8	2,2	0.73 b	2
VR-SC 140	<i>Aspergillus terreus</i>	2,6	2,0	0.76 bc	2
VR-SC 59	Não identificado	4,3	3,4	0.79 cd	2
VR-YM 117	Não identificado	2,9	2,3	0.79 cd	2
VR-SC 113	<i>Aspergillus sp.</i>	2,5	2,0	0.80 de	2
VR-SC 146	Não identificado	2,3	1,9	0.82 ef	2
VR-SC 147	Não identificado	2,0	1,7	0.85 f	2
VR-YM 153	Não identificado	2,9	2,5	0.86 g	2
VR-SC 57	<i>Aspergillus flavus</i>	2,9	2,6	0.89 h	2
VR-SC 60	Não identificado	3,5	3,3	0.94 i	2

*dhc – diâmetro da colônia acrescido da área do halo de degradação **Produção Enzimática. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Espécies do gênero *Aspergillus* são frequentemente citadas como boas produtoras de amilase em diferentes tipos de fermentação e utilizando os mais diversos parâmetros de pH e temperatura (MORYA; YADAV, 2009; BAKIRI; MAGALI, THONART, 2009; CHIMATA; CHETTY; SURESH, 2011; FARID; SHATA, 2011).

Dos 20 isolados do Campus Cauamé testados qualitativamente para produção de amilase, 8 apresentaram resultado positivo, representando 40%, os quais foram avaliados quanto ao índice enzimático e produção enzimática (PZ). Os resultados da avaliação semiquantitativa para produção da amilase dos isolados do Campus Cauamé são mostrados na tabela 13.

Tabela 13 – Resultado da avaliação semiquantitativa da atividade de amilase dos isolados de fungos filamentosos de solo do Campus Cauamé - UFRR.

Código isolado	Média do dhc* (cm)	Diâmetro médio da colônia (cm)	Índice Enzimático	PZ**
CA-YM 57	2,9	1,3	0.44 a	3
CA-YM 115	3,4	1,8	0.52 b	3
CA-YM 33	3,0	1,8	0.60 c	3
CA-YM 96	3,5	2,2	0.62 c	3
CA-YM 54	2,5	1,8	0.72 d	2
CA-YM 118	3,8	2,8	0.73 d	2
CA-YM 29	3,8	2,9	0.76 e	2
CA-YM 32	4,1	3,3	0.80 f	2

*dhc – diâmetro da colônia acrescido da área do halo de degradação **Produção Enzimática. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Os isolados CA-YM 57, CA-YM 115, CA-YM 33 e CA-YM 96 foram classificados com produção enzimática fortemente positiva (PZ 3), apresentaram índices enzimáticos de 0.44, 0.52, 0.60 e 0.62, respectivamente. Houve diferença significativa de acordo com a análise estatística entre as médias dos índices enzimáticos dos isolados.

Cuzzi et al. (2011) realizaram *screening* para produção de enzimas hidrolíticas em 11 espécies de fungos endofíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* e observaram a atividade positiva para a amilase em 10 dos isolados, os quais foram classificados como PZ 2 (atividade positiva), sendo o menor IE, 0.66 e o maior, 0.98. Os resultados dos índices enzimáticos deste trabalho em relação à produção de amilase dos 8 isolados do Campus Cauamé são bastante animadores, uma vez que 4 linhagens apresentaram IE inferior a 0.64 (PZ3 fortemente positiva) e 4 apresentaram IE superior a 0.64 e inferior a 1.0 (PZ 2 positiva).

Embora as amilases possam ser obtidas de diversos micro-organismos, ainda é um desafio obter uma linhagem capaz de produzir rendimentos comercialmente aceitáveis. A seleção de uma linhagem adequada é o fator mais preponderante no processo de produção dessa enzima (MORAES, 2004).

As inúmeras aplicações das amilases com diferentes características catalíticas nos mais diversos segmentos industriais impulsiona a busca constante

por linhagens que atendam a esta demanda (PANDEY et al., 2000). Conseqüentemente, a avaliação semiquantitativa fornece uma base da possível produtividade da linhagem, a qual poderá ser analisada quanto sua produção quantitativa em diferentes tipos de fermentação, bem como utilizando diferentes parâmetros.

5.6.2 Produção de lipase

As lipases constituem o grupo de biocatalisadores mais importantes para aplicações biotecnológicas (TREVISAN, 2004). Embora essa enzima possa ser obtida de diversas fontes, os micro-organismos e em especial os fungos filamentosos continuam sendo fontes preferenciais (DAMASO et al., 2008; TREICHEL et al., 2010).

Para a produção de lipase os isolados do PARNA Viruá apresentaram resultados melhores do que para amilase. Dos 50 isolados que foram testados qualitativamente, 23 apresentaram resultado positivo, representando 46% dos isolados. Entretanto, o isolado VR-SC 66 apesar de apresentar halo para atividade da lipase no *screening*, na avaliação semiquantitativa apresentou PZ 1, considerado negativo. Os resultados da avaliação semiquantitativa para produção da lipase dos isolados do PARNA Viruá são mostrados na tabela 14.

Na avaliação semiquantitativa da lipase, o isolado VR-SC 23 apresentou o melhor índice enzimático (IE 0,62), sendo classificado como PZ 3 (fortemente positivo), seguido do isolado VR-SC 26 (*Penicillium sp.*) com IE 0,66 (PZ 2, positivo). O maior índice enzimático foi observado para o isolado VR-SC 134.1 (*Aspergillus sp.*) que apresentou IE de 0,97. Houve diferença significativa de acordo com a análise estatística entre as médias dos índices enzimáticos dos isolados.

Os isolados *Aspergillus sp.* deste trabalho apresentaram índices enzimáticos superiores ao IE obtido por Cuzzi et al. (2011) para *Aspergillus sp.*, o qual foi de 0.77 classificado como PZ 2 (atividade positiva). Entretanto, os isolados do gênero *Aspergillus* deste trabalho também foram classificados como PZ 2. Por outro lado, aqueles autores obtiveram resultado negativo para produção de lipase por *Penicillium sp.*, diferente deste, em que os isolados desse gênero apresentaram índices enzimáticos de 0.66 e 0.70.

Tabela 14 – Resultado da avaliação semiquantitativa da atividade de lipase dos isolados de fungos filamentosos de solos do PARNA Viruá - RR.

Código isolado	Identificação	Média do dhc* (cm)	Diâmetro médio da colônia (cm)	Índice Enzimático	PZ**
VR-SC 23	Não identificado	2,7	1,7	0.62 a	3
VR-SC 26	<i>Penicillium sp.</i>	3,3	2,2	0.66 b	2
VR-SC 142	<i>Penicillium sp.</i>	1,5	1,1	0.70 bc	2
VR-SC 27	Não identificado	2,2	1,6	0.72 c	2
VR-SC 57	<i>Aspergillus flavus</i>	4,4	3,5	0.79 d	2
VR-YM 117	Não identificado	2,2	1,8	0.81 de	2
VR-YM 153	Não identificado	2,8	2,3	0.82 e	2
VR-SC 81	Não identificado	2,2	1,8	0.83 ef	2
VR-SC 55	Não identificado	1,7	1,4	0.84 f	2
VR-YM 96	Não identificado	2,5	2,1	0.84 f	2
VR-SC 59	Não identificado	4,0	3,4	0.85 f	2
VR-SC 22	<i>Aspergillus sp.</i>	2,3	2,0	0.86 fg	2
VR-SC 123	Não identificado	1,9	1,6	0.86 fg	2
VR-SC 11	Não identificado	2,2	1,9	0.86 fg	2
VR-YM 42	Não identificado	2,1	1,9	0.90 h	2
VR-YM 118	Não identificado	2,2	2,0	0.90 h	2
VR-SC 124	<i>Acremonium sp.</i>	2,4	2,2	0.91 h	2
VR-SC 138	<i>Aspergillus sp.</i>	3,7	3,4	0.91 h	2
VR-SC 145	Não identificado	2,3	2,1	0.91 h	2
VR-SC 140	<i>Aspergillus terreus</i>	2,6	2,4	0.92 h	2
VR-SC 15	<i>Penicillium sp.</i>	2,6	2,4	0.92 h	2
VR-SC 134.1	<i>Aspergillus sp.</i>	3,4	3,3	0.97 i	2

*dhc – diâmetro da colônia acrescido da área do halo de degradação **Produção Enzimática. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Resultado divergente também ocorreu com *Acremonium sp.* onde Cuzzi et al. (2011) obtiveram resultado negativo para a produção de lipase por um isolado desse gênero, porém neste trabalho o isolado VR-SC 124 (*Acremonium sp.*) apresentou um índice enzimático de 0.91.

Resultado semelhante para a produção enzimática dos isolados do PARNA Viruá ocorreu com os isolados do Campus Cauamé, os quais também obtiveram os melhores resultados para produção de lipase em detrimento da amilase. Dos 20

isolados testados qualitativamente, 14 apresentaram resultado positivo, representando 70%. Os resultados da avaliação semiquantitativa para atividade da lipase dos isolados do Campus Cauamé são mostrados na tabela 15. Houve diferença significativa de acordo com a análise estatística entre as médias dos índices enzimáticos dos isolados.

O isolado CA-YM 32 apresentou o melhor índice enzimático (IE 0.43, PZ 3) para a atividade da lipase. Cuzzi et al. (2011) obtiveram o melhor índice enzimático (IE 0.50, PZ 3) para o isolado *Cylindrocladium sp.*

Realizar um programa de *screening*, assim como a avaliação semiquantitativa de diversos isolados para atividades enzimáticas específicas reduz significativamente a quantidade de linhagens que poderão ser utilizadas em outras abordagens visando à comparação da produtividade, seja por fermentação submersa ou em estado sólido.

Tabela 15 – Resultado da avaliação semiquantitativa da atividade de lipase dos isolados de fungos filamentosos de solos do Campus Cauamé - UFRR.

Código isolado	Média do dhc* (cm)	Diâmetro médio da colônia (cm)	Índice Enzimático	PZ**
CA-YM 32	4,1	1,8	0.43 a	3
CA-YM 57	2,9	1,4	0.48 b	3
CA-YM 118	3,2	1,7	0.53 c	3
CA-YM 29	3,8	2,3	0.60 d	3
CA-YM 54.1	3,0	2,1	0.70 e	2
CA-YM 115	2,7	1,9	0.70 e	2
CA-SC 23.1	3,0	2,3	0.76 f	2
CA-YM 74	3,8	3,0	0.78 f	2
CA-YM 71	2,1	1,8	0.85 g	2
CA-YM 30	2,7	2,3	0.85 g	2
CA-YM 54	2,3	2,0	0.86 gh	2
CA-YM 74.1	4,1	3,6	0.87 gh	2
CA-SC 06	2,5	2,2	0.88 hi	2
CA-YM 25.1	2,2	2,0	0.90 i	2

*dhc – diâmetro da colônia acrescido da área do halo de degradação **Produção Enzimática. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Dos 57 isolados de fungos filamentosos que foram submetidos à avaliação semiquantitativa da produção enzimática, 21 apresentaram boa atividade amilolítica, sendo que 4 isolados se destacaram pela atividade fortemente positiva, e 36 apresentaram boa atividade lipolítica, dos quais 5 isolados se destacaram também pela atividade fortemente positiva.

Esses resultados demonstram a importância dos fungos filamentosos isolados de diferentes tipos de solo em áreas de florestas e savanas de Roraima como um importante recurso biotecnológico, em especial no tocante a produção de enzimas de grande relevância e uso industrial como é o caso das amilases e lipases. Os isolados que demonstraram ser excelentes candidatos através da avaliação semiquantitativa merecem estudos mais detalhados e conseqüentemente, a viabilização para sua aplicação em processos industriais.

6 CONCLUSÕES

A densidade de UFC de fungos filamentosos nas amostras de solo de floresta (PARNA Viruá) foi maior do que a densidade nas amostras de solo de savana (Campus Cauamé).

Amostras de Latossolos e Cambissolos de floresta (PARNA Viruá) apresentaram as maiores densidades de UFC de fungos filamentosos, enquanto que, as amostras de solos Hidromórficos e Arenosos apresentaram as menores densidades.

Amostras de Latossolos, Gleissolos e Neossolos de savana (Campus Cauamé) apresentaram as maiores densidades de UFC de fungos filamentosos, enquanto que, as amostras de mosaico Latossolo /Plintossolo apresentaram menor densidade de UFC.

Amostras de ambientes semelhantes, tanto no PARNA Viruá quanto no Campus Cauamé, apresentaram diferença significativa entre as médias de UFC de fungos filamentosos.

O ambiente de floresta (PARNA Viruá) foi mais rico em morfotipos de fungos filamentosos do que o ambiente de savana (Campus Cauamé).

O meio Sabouraud apresentou a maior eficiência no isolamento de morfotipos de fungos filamentosos em ambiente de floresta (PARNA Viruá). O meio Yeast Malt Agar foi mais eficiente no ambiente de savana (Campus Cauamé).

As colônias de fungos filamentosos isoladas nos ambientes estudados foram em sua maioria caracterizadas como do tipo veludosa, seguido pelas cotonosas.

Dentre os fungos identificados, os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium* e *Cladosporium* predominaram nesta ordem, entre os fungos filamentosos do ambiente de floresta (PARNA Viruá).

A maioria dos isolados testados se comportaram como potenciais produtores de lipase.

Os fungos filamentosos testados demonstraram maior habilidade em produzir lipase em detrimento da amilase, sendo que alguns isolados apresentaram atividade positiva de produção para ambas as enzimas.

A avaliação semiquantitativa da produção da amilase e da lipase demonstrou alguns isolados promissores com atividade fortemente positiva, os quais são

excelentes candidatos a avaliações de produção quantitativa, bem como a viabilização da aplicação em processos industriais.

Solos de ambientes ainda pouco explorados como os de florestas e savanas de Roraima, são fontes de linhagens de fungos filamentosos interessantes para uso biotecnológico, em especial, para a obtenção de linhagens produtoras de lipase.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-AZEEM, A. M. The history, fungal biodiversity, conservation, and future perspectives for mycology in Egypt. **Ima Fungus**, v. 1, n. 2, p.123-142, 2010.
- ABREU, L. M.; PFENNING, L. H. Diversidade de Microfungos em solos tropicais. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros**, Lavras: UFLA, 2008, p. 445-482.
- AHMED, S. et al. Production and Purification of Cellulose-degrading enzymes from Filamentous Fungi *Trichoderma harzianu*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 3, p.1411-1419, fev. 2009.
- ALBERTON, D. **Produção de Lipases por Fermentação no Estado Sólido visando à Aplicação no Tratamento de Efluente de Laticínios**. 2009. 173p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Programa de Pós-graduação em Ciências, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.
- ALVES, M. H. et al. Screening of *Mucor* spp. for the Production of Amylase, Lipase, Polygalacturonase and Protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p.325-330, dez. 2002.
- AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L.; INÁCIO, C. A. Taxonomia de fungos. In: **Taxonomia: Microbiana, de procariontes, de fungos, de protozoários e de vírus**, s/d. p. 12-13 (Documento Técnico / Centro de Estudos Estratégicos, Ciência, Tecnologia e Inovação).
- AZEREDO, L. A. I. et al. Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations. **Current Microbiology**, v. 54, p.361-365, 2007.
- BAKRI, Y.; MAGALI, M.; THONART, P. Isolation and identification of a new fungal strain for amylase biosynthesis. **Polish Journal of Microbiology**, v. 58, n. 03, p.269-273, 2009.
- BALKAN, B.; BALKAN, S.; ERTAN, F. Optimization of parameters for α -amilase production under solid state fermentation by *Trichothecium roseum*. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 16, n. 5, p. 6591-6600, 2011.

BARBOSA, R. I. et al. **Fitopedologia de uma área de savana da região do Monte Cristo, Campus do Cauamé**. Disponível em: <<http://ppbio.inpa.gov.br>> acesso em: 01 jan. 2012.

BASS, D.; RICHARDS, T. A. Three reasons to re-evaluate fungal diversity “on Earth and in the ocean”. **Fungal Biology Reviews**, v. 25, p.159-164, 2011.

BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3...5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p.426-438, 2011.

BRAZ, S. C. M. et al. Viabilidade, confirmação taxonômica e detecção enzimática de espécies de *Acremonium* preservadas sob óleo mineral na Coleção de Culturas University Recife Mycology. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 1, p. 63-66, jan./fev. 2009.

BELUR, P. D.; MUGERAYA, G. Microbial Production of Tannase: State of the Art. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 1, p.25-40, jan. 2011.

BENEDETTI, U. G. **Estudo detalhado dos solos do Campus do Cauamé da UFRR, Boa Vista – Roraima**. 2007, 105p. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais) – Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2007.

BORGES, L. R. et al. Diversidade de fungos filamentosos em solo de monocultivo de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Revista da Academia de Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 185-194, abr./jun. 2011.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular Microbial Diversity in Soils from Eastern Amazonia: Evidence for Unusual Microorganisms and Microbial Population Shifts Associated with Deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p.2647-2653, jul. 1997.

BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and Discovery Strategies for Biotechnology: The Paradigm Shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p.573-606, set. 2000.

CABELLO, M.; ARAMBARRI, A. Diversity in soil fungi from undisturbed and disturbed *Celtis tala* and *Scutia buxifolia* forests in the eastern Buenos Aires Province (Argentina). **Microbiological Research**, v. 157, n. 2, p. 115-125, 2002.

CASTRO, A. M. et al. Economic analysis of the production of amylases and other hydrolases by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation of babasu cake. **Enzyme Research**, v. 2010, p.1-9, 2010.

CAVALCANTI, M. A. Q. et al. Fungos filamentosos isolados do solo em municípios na região Xingó, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, n. 4, p.831-837, 2006.

CAVALCANTI, S. D. B. **Aplicação de metodologias de preservação e caracterização de fungos na coleção de culturas do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 2010, 74p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CHIMATA, M. K.; CHETTY, C. S.; SURESH, C. Fermentative production and thermostability characterization of α amylase from *Aspergillus* species and its application potential evaluation in desizing of cotton cloth. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p.1-8, 2011.

COCHANE, V. W. **Physiology of fungi**. Estados Unidos: Jhon Wiley, 1958. 524p.

COLEN, G. **Isolamento e Seleção de Fungos Filamentosos Produtores de Lipases**. 2006. 206p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

COLEN, G.; JUNQUEIRA, R. G.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p.881-885, 2006.

CUZZI, C. et al. Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis Dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Global Science and Technology**, v. 4, n. 02, p. 47-57, mai/ago. 2011.

DAMASO, M. C. T. et al. Utilization of Agroindustrial Residues for Lipase Production by Solid-State Fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p.676-681, nov. 2008.

DELABONA, P. S. **Bioprospecção de fungos produtores de celulases da região amazônica para produção de etanol celulósico**. 2011. 122p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

DUTRA, J. C. V. et al. Lipase production in solid-state fermentation monitoring biomass growth of *Aspergillus niger* using digital image processing. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 147, p.63-75, 2008.

ERTAN, F. et al. Solid state fermentation for the production of α -amylase from *Penicillium chrysogenum* using mixed agricultural by-products as substrate. **Biologia**, v. 61, n. 6, p.657-661, 2006.

FAHEINA JR. G. S. et al. Seleção de linhagens fúngicas e efeito do tempo de fermentação para produção de xilanases por fermentação submersa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 18, 2010, Foz do Iguaçu. **Resumo expandido...** p. 4183-4191.

FARIAS, M. V. **Produção de enzimas hidrolíticas por leveduras isoladas de solos de áreas preservadas em Roraima- Brasil.** 2008. 116p. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais) – Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2008.

FARID, M. A. F.; SHATA, H. M. A. H. Amylase production from *Aspergillus oryzae* LS1 by solid-state fermentation and its use for the hydrolysis of wheat flour. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 266-274, out. 2011.

FOJAN, P. What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. **Biochimie**, v. 82, p. 1033-1041, oct. 2000.

FORZZA, R. C. et al. **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil.** Rio de Janeiro: Andréa Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 1, 2010. 873p.

GALVAGNO, M. A.; FORCHIASSIN, F. Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Orgs) **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.** Caxias do Sul: EDUCS, 2004. p. 125-172.

GAMS, W. Biodiversity of soil-inhabiting fungi. **Biodivers Conserv Journal**, v. 16, p.69-72, 2007.

GAVA, M. A. **Desempenho de diferentes meios de cultura utilizados na avaliação de fungos presentes em ambientes de produção de alimentos.** 2002. 65p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

GHOSH, B.; RAY, R. R. Extra-cellular isoamylase Production by *Rhizopus oryzae* in Solid-State Fermentation of Agro Wastes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 5, p. 867-876, set./out. 2011.

GRIBEL, R. et al. **Vegetação do Parque Nacional do Viruá – RR**, Roraima, mar. 2009, 59p. (Relatório Técnico).

GRIMM, L. H. et al. Morphology and productivity of filamentous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, p. 375-384, nov. 2005.

GUIMARÃES, L. H. S. et al. Screening of Filamentous Fungi for Production of Enzymes of Biotechnological Interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p.474-480, jul. 2006.

GUPTA, A. et al. Production and Characterization of α -amylase from *Aspergillus niger*. **Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 551-556, 2008.

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

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

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 27, p.782-798, 2009.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, v. 95, n. 6, p.641-655, 1991.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, n. 12, p. 1422-1432, dez. 2001.

HAWKSWORTH, D. L. Mycology: a Neglected Megascience. In: RAI, M.; BRIDGE, P. D. **Applied Mycology**, Londres: CAB, 2009. p. 1-16.

HAWKSWORTH, D. L.; ROSSMAN, A. Y. Where are all the undescribed fungi? **Phytopathology**, v. 87, n. 9, p. 888-891, 1997.

HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. **Mycological Research** III, p. 509-547, mar. 2007

HYDE, K. D. Where are the missing fungi? **Mycological Research**, v. 105, n. 12, p.1514-1518, dez. 2001.

INMET – INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. **Médias de Precipitação**. Disponível em: <www.inmet.gov.br/webcap/climatologia/faixa-normal>. Acesso em: 08 jun. 2012.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial Pectinolytic enzymes: A Review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931-2944, mar. 2005.

KATHIRESAN, K.; MANIVANNAN, S. α -Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 10, p.829-832, mai. 2006.

KEMPKA, A. P. et al. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 31, p.119-125, 2008.

LACAZ, C. S. et al. **Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier. 1998. 445 p.

LEWINSOHN, T. M; PRADO, P. I. Quantas espécies há no Brasil? **Megadiversidade**, v.1, n. 1, p. 36-42, jul. 2005.

LOUGUERCIO-LEITE, C. Taxonomia dos fungos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Orgs) **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. p. 47-88.

LOUGUERCIO-LEITE, C.; ESPOSITO, E. Fungos: estrutura e ultra-estrutura. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Orgs) **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. p. 15-46.

LUIZ, F. C. J. P. F. **Identificação fenotípica e genotípica de fungos filamentosos isolados de talcos comerciais cosméticos**. 2010, 93p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

MACEDO, G. A.; MATSUDA, L. K.; BATTESTIN, V. Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. **Ciências Agrotecnicas**, Lavras, v. 29, n. 4, p.833-838, jul. 2005.

MACIEL, V. F. A.; PACHECO, T. F.; GONÇALVES, S. B. **Padronização do uso do corante rodamina B para avaliação de atividade lipolítica em estirpes fúngicas.** (Comunicado Técnico), n. 5, Brasília: Embrapa, 2010.

MAHAN, B. M.; MYERS, R. J. **Química um curso universitário.** 4. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2009. 682 p.

MALA, J. G.; KAMINI, N. R.; PUVANAKRISHNAN, R. Strain improvement of a *Aspergillus niger* for enhanced lipase production. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 47, p. 181-186, 2001.

MATOS, R. S. B.; SILVA, E. M. R.; BERBARA, R. L. L. **Biodiversidade e Índices.** Rio de Janeiro: EMBRAPA, 1999, 24 p. (Documentos n. 107).

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 386p.

MELZ, E. M.; TIAGO, P. V. Propriedades físico-químicas e microbiológicas do solo de um Parque em Tangará da Serra, MT, uma área de transição entre Amazônia e Cerrado. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 4, p.829-834, 2009.

METIN, K. M. et al. Purification and characterization of α -amylase produced by *Penicillium citrinum* HBF62. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 45, p. 7692-7701, nov. 2010.

MEURER, E. J. **Fundamentos de Química do Solo.** 4. ed. Porto Alegre: Evangraf, 2010. 264 p.

MORAES, L. M. P. Amilases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. (Eds) **Enzimas como agentes biotecnológicos.** Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 223-243.

MOREIRA, F. G. et al. The use of α -methyl-D-glucoside, a synthetic analogue of maltose, as inducer of amylase by *Aspergillus sp.* In solid-state and submerged fermentations. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p.15-19, 2001.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MORTON, J. B. Fungi. In: SILVIA, D. M. et al. **Principles and Applications of Soil Microbiology**. 2 ed. New Jersey: Pearson, 2005. p. 141-161.

MORYA, V. K.; YADAV, D. Isolation and screening of different isolates of *Aspergillus* for amylases production. **The Internet Journal of Microbiology**, v. 7, n. 1, 2009.

MULLER, G. M.; SCHMIT, J. P. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? **Biodiversity and Conservation**, v. 16, p.1-5, 2007.

NEDER, R. N. **Microbiologia: manual de laboratório**. São Paulo: Nobel, 1992. 138p.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1.274p.

OLIVEIRA, R. L. **Avaliação do Potencial Biotecnológico de fungos endofíticos de *Piper hispidum***. 2010. 95p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2010.

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. **Multi Ciência**, n. 7, p. 1-19, out. 2006.

PAGORI, N.; XU, Y.; CHEIKHYOUSSEF, A. Potential aspects of lipases obtained from *Rhizopus* fungi. **Research Journal of Microbiology**, v. 2, n. 2, p.101-116, 2007.

PANDEY, A. et al. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, n. 01, p.149-162, jul.1999.

PANDEY, A. et al. Advances in microbial amylases. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 31, p.135-152, 2000.

PPBio- PROGRAMA DE PESQUISA EM BIODIVERSIDADE. **Núcleos Regionais, Sítios de Coletas**. Disponível em: <<http://ppbio.inpa.gov.br/Port>>. Acesso em: 12 fev. 2011.

PARBAT, R.; SINGHAL, B. Production of glucoamylase by *Aspergillus oryzae* under solid state fermentation using agro industrial products. **International Journal of Microbiological Research**, v. 2, n. 3, p. 204-207, 2011.

RAJESH, E. M. et al. Investigation of Lipase Production by *Trichoderma reasei* and Optimization of Production Parameters. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 9, n. 7, p.1177-1189, 2010.

RODRIGUES, H. J. B. et al. Variabilidade quantitativa de população microbiana associada às condições microclimáticas observadas em solo de floresta tropical úmida. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 26, n. 4, p.629-638, dez. 2011.

RUIZ, C.; PASTOR, F. I. J.; DIAZ, P. Isolation of lipid-and polysaccharide-degrading micro-organisms from subtropical forest soil and analysis of a lipolytic strain *Bacillus* sp. CR – 179. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, p. 218- 227, 2005.

SCHAEFER, C. E. G. R.; MENDONÇA, B. A. F.; FILHO, E. I. F. **Geoambientes e paisagens do Parque Nacional do Viruá – RR. Esboço de integração da geomorfologia, climatologia, solos, hidrologia e ecologia**. Roraima, mar. 2009, 59 p. (Relatório Técnico).

SCHMIT, J. P.; MULLER, G. M. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, p.99-111, 2007.

SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; MILANEZ, A. I. Fungos microscópicos da Mata Atlântica de Piranapiacaba, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.21, n. 1, p.73-79, abr. 1998.

SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H. et al. Microscopic Fungi in the Atlantic Rainforest in Cubatão, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p.267-275, 2006.

SELWAL, M. K. et al. Tannase production by *Penicillium atramentosum* KM under SSF and its applications in wine clarification and tea cream solubilization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 24, p.374-387, 2011.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHARMA, R. et al. Approaches for refining heterologous protein production in filamentous fungi. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 12, p.2083-2094, ago. 2009.

SILVA, D. C. V. et al. Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais 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.

SILVA, T. M. **Produção e determinação das propriedades funcionais das amilases de *Aspergillus niveus***. 2009, 216p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

SILVA, T. M. et al. Thermostable saccharogenic amylase produced under submerged fermentation by filamentous fungus *Penicillium purpurogenum*, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1136-1140, jan. 2011.

SIMÕES, M. L. G. **Produção de xilanase por fungos filamentosos isolados de solo de área de caatinga**. 2006, 151p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, 2006.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 388 p.

SLIVINSKI, C. T. et al. Biochemical Characterisation of a Glucoamylase from *Aspergillus niger* produced by Solid-State fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 03, p. 559-568, mai/jun. 2011.

SOARES, I. A. et al. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 3, p.700-705, jul./set. 2010.

SOUTO, P. C. et al. Comunidade microbiana e mesofauna edáficas em solo sob caatinga no semi-árido da Paraíba. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 32, n. 32, p.151-160, 2008.

SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. Application of microbial α -amylase in Industry – A Review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 850-861, 2010.

SPIER, M. R. et al. Production and characterization of amylases by *Aspergillus niger* under solid state fermentation using agro industrial products. **International Journal of Food Engineering**, v. 2, n. 3, 2006.

SUGANTHI, R. et al. Amylase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation using agroindustrial wastes. **International Journal of Engineering Science**, v. 3, n. 2, p. 1756-1763, fev. 2011.

TREICHEL, H. et al. A Review on Microbial Lipases Production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p.182-196, 2010.

TREVISAN, H.C. Lipases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. (Eds) **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004, p. 115-136.

TONELOTTO, M. **Produção de celulases, purificação e caracterização bioquímico-cinética da β -Galactosidase produzida por fungo isolado da região amazônica**, 2012, 176p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

VAN ELSAS, J. D.; SMALLA, K. Methods for sampling soil Microbes. In: HURST, C. J. et al. **Manual of Environmental Microbiology**, Washington: ASM Press, 1997. p. 5-13.

VARALAKSHIMI, K. N. et al. Production and Characterization of α -amylase from *Aspergillus niger* JGI 24 isolated in Bangalore. **Polish Journal of Microbiology**, v. 58, n. 01, p. 29-36, nov. 2009.

VITAL, M. J. S.; ZILLI, J. E. **Protocolo Básico de Coleta de Amostras de Solo para Caracterização da Diversidade Microbiana do Programa de Pesquisa em Biodiversidade**. Disponível em: <ppbio.inpa.gov.br/Port>. Acesso em: 05 nov. 2010.

VITAL, M. J. S.; ZILLI, J. E. Avanços em Microbiologia do solo no Estado de Roraima. In: BARBOSA, R. I.; MELO, V. F. (Orgs) **Roraima Homem, Ambiente e Ecologia**, Boa Vista: FEMACT, 2010. p. 409-429.

ZANOTTO, S. P. et al. Potential Application in Biocatalysis of Mycelium-Bound Lipases from Amazonian Fungi. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1046-1059, 2009.