

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
CAMPUS MÉDIO SOLIMÕES
INSTITUTO DE SAÚDE E BIOTECNOLOGIA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

BIANCA KYNSENG BARBOSA DA SILVA COSTA

**AVALIAÇÃO DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS COMO SUBSTRATO PARA
PRODUÇÃO DE HIDROLASES POR FUNGOS FILAMENTOSOS DA AMAZÔNIA**

Coari – AM
2020

BIANCA KYNSENG BARBOSA DA SILVA COSTA

**AVALIAÇÃO DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS COMO SUBSTRATO PARA
PRODUÇÃO DE HIDROLASES POR FUNGOS FILAMENTOSOS DA AMAZÔNIA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Saúde e Biotecnologia – ISB, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Me. Michel Nasser Corrêa Lima Chamy

Coari – AM
2020

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C837a Costa, Bianca Kynseng Barbosa da Silva
Avaliação de resíduos agrícolas como substrato para produção de hidrolases por fungos filamentosos da Amazônia / Bianca Kynseng Barbosa da Silva Costa . 2020
38 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Michel Nasser Corrêa Lima Chamy
TCC de Graduação (Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Substratos agrícolas. 2. Solo. 3. Amilase. 4. Celulase. 5. Fermentação líquida. I. Chamy, Michel Nasser Corrêa Lima. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

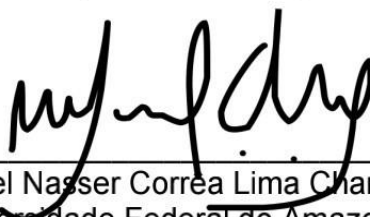
BIANCA KYNSENG BARBOSA DA SILVA COSTA

**AVALIAÇÃO DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS COMO SUBSTRATO PARA
PRODUÇÃO DE HIDROLASES POR FUNGOS FILAMENTOSOS DA AMAZÔNIA**

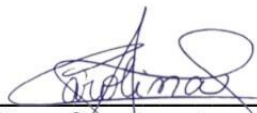
Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Instituto de Saúde e Biotecnologia – ISB,
da Universidade Federal do Amazonas, como
requisito para obtenção do título de Bacharel
em Biotecnologia.

Aprovado em 06 de Novembro de 2020

BANCA EXAMINADORA



Prof. Me. Michel Nasser Correa Lima Chamy, Presidente
Universidade Federal do Amazonas



Profa. Dra. Carolina Arruda de Faria, Membro
Universidade Federal do Amazonas



Prof. Dr. Rogério de Oliveira Neves, Membro
Universidade Federal do Amazonas

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Maria Alzira e Roberto,
pela educação que recebi, pela dedicação,
carinho e amor

Às minhas lindas irmãs Brenda, Eduarda e
Maria Luíza

Aos meus avós Dirce e Jorge

Pelo carinho e apoio incondicional em
todas as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Mesmo que utilizasse todas as palavras já criadas pelos homens eu não conseguiria agradecer em toda a sua plenitude. Ainda assim, expresso aqui o meu mais profundo obrigada:

Ao professor Me. Michel Nasser Corrêa Lima Chamy por me orientar nesta pesquisa, por me guiar durante os quatro anos da vida acadêmica e ouvir minhas frustrações acreditando sempre que podemos mais. Obrigada principalmente por compartilhar seu conhecimento comigo.

A todos os professores do curso de Biotecnologia que a cada etapa da graduação me inspiraram e contribuíram para a realização desse momento.

Aos técnicos Uatyla Lima e Abinadabis Parentes pelo suporte durante a realização dos incontáveis procedimentos nos Laboratórios de Microbiologia e Química.

Aos meus amigos Ana Beatriz, Luan Castro, Camila Machado, Amanda Vasconcelos e Yasmin Moura que foram meus parceiros em todos os trabalhos da graduação. Obrigada pela companhia durante as horas sem fim de lavagem das vidrarias e por suportarem meu temperamento leonino. Obrigada principalmente por crescerem ao meu lado.

À Universidade Federal do Amazonas, em especial ao Instituto de Saúde e Biotecnologia de Coari, pela concessão de bolsa de pesquisa e oportunidade de me graduar em um dos cursos mais lindo que já conheci: a Biotecnologia.

Agradeço mais ainda...

Aos meus pais Maria Alzira e Roberto pelo dom da vida, pela educação que recebi, pela dedicação, carinho e amor.

E aos meus avós, dona Dirce e seu Jorge, que me proporcionaram a melhor infância, base do que tenho de melhor hoje. Vô onde quer que esteja, sinto sua falta.

*Não importa para o que alguém nasça,
mas o que ele cresce para ser.*

J.K. Rowling

RESUMO

Resíduos orgânicos gerados pelo setor alimentício têm sido empregados como fonte de carbono para o crescimento microbiano e produção de enzimas hidrolíticas como as celulasas e amilases. A pesquisa objetivou testar diferentes resíduos agrícolas (cascas de castanha-do-pará, mandioca e banana) como substratos para produção de hidrolases por fungos filamentosos amazônicos no município de Coari. Os fungos foram isolados de solo coletado no Centro de Apoio à Pesquisa do Médio Solimões por diluição seriada seguida de plaqueamento em meio *Sabouraud Dextrose Ágar*. Os resíduos agrícolas provenientes da feira municipal de Coari foram lavados, secos e triturados. A produção enzimática foi obtida por fermentação em estado líquido dos fungos em meio *Manachini* enriquecido com o substrato agrícola. A atividade enzimática foi determinada pela técnica do *Cup-Plate* e por método sacarificante com ácido 3,5-dinitrosalicílico. Foram isolados um total de 63 fungos filamentosos. Todos os resíduos agrícolas selecionados mostraram-se viáveis como substrato indutor para produção de celulasas e amilases. Dentre os isolados, 10 foram testados no *Cup-Plate*, onde o fungo AS 36 foi o melhor produtor de celulasas nos substratos casca de castanha e mandioca, com Índice Enzimático (I) 5,95 e 5,85 respectivamente e AS 51 como melhor produtor de amilases a partir da casca da banana obtendo o valor de 4,85. Quanto a atividade sacarificante, o fungo AS 36 obteve o melhor desempenho para amilase e celulase com $0,81 \text{ UI.mL}^{-1}$, $0,55 \text{ UI.mL}^{-1}$ e $0,48 \text{ UI.mL}^{-1}$ nos substratos casca da banana, castanha e mandioca respectivamente. Os resultados encontrados expressam a potencialidade na produção enzimática de amilase e celulase por fungos isolados do solo de Coari utilizando resíduos agrícolas regionais como substrato indutor.

Palavras-chave: Substratos agrícolas. Solo. Amilase. Celulase. Fermentação líquida.

ABSTRACT

Organic waste generated by the food sector has been used as a carbon source for microbial growth and production of hydrolytic enzymes such as cellulases and amylases. The research aimed to test different agricultural residues (Brazil nuts, cassava and banana peels) as substrates for the production of hydrolases by Amazonian filamentous fungi in the municipality of Coari. The fungi were isolated from soil collected at the Medium Solimões Research Support Center by serial dilution followed by plating on Sabouraud Dextrose Agar medium. Agricultural waste from the Coari Municipal Fair was washed, dried and shredded. Enzyme production was obtained by liquid fermentation of the fungi in Manachini medium enriched with the agricultural substrate. Enzyme activity was determined by the Cup-Plate technique and by saccharifying method with 1-3-dinitrosalicylic acid. A total of 63 filamentous fungi were isolated. All selected agricultural residues proved to be viable as an inducing substrate for the production of cellulases and amylases. Among the isolates, 10 were tested in the Cup-Plate, where the fungus AS 36 was the best producer of cellulases in the substrates of chestnut and cassava, with Enzyme Index (I) 5.95 and 5.85 respectively and AS 51 as the best producer of amylases from banana peel obtaining a value of 4.85. As for saccharifying activity, the fungus AS 36 obtained the best performance for amylase and cellulase with 0.81 IU.mL⁻¹, 0.55 IU.mL⁻¹ and 0.48 IU.mL⁻¹ in banana peel substrates chestnut and cassava respectively. The results show the potential for enzymatic production of amylase and cellulase by fungi isolated from Coari soil using regional agricultural residues as inducing substrate.

Key words: Agricultural substrates. Soil. Amylase. Cellulose. Liquid fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fungos isolados (48 amostras)	22
Figura 2 - Fungos isolados (15 amostras)	22
Figura 3 – Curva Padrão de Glicose para amilase	25
Figura 4 – Curva Padrão de Glicose para celulase	25
Figura 5 – Atividade enzimática amilolítica e celulolítica de fungos filamentosos em substratos agrícolas	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Índice da atividade enzimática para amilase e celulase de fungos amazônicos pelo método do Cup-Plate.....	23
Tabela 2 - Determinação da atividade enzimática para amilase e celulase pelo método DNS.....	25

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	METODOLOGIA.....	16
2.1	Área de estudo.....	16
2.2	Coleta.....	16
2.3	Isolamento dos fungos.....	16
2.4	Conservação.....	17
2.5	Coleta e preparo dos resíduos agrícolas.....	17
2.6	Fermentação em estado líquido.....	18
2.7	Condições de cultivo e obtenção de enzimas.....	18
2.8	Determinação da atividade enzimática.....	18
2.8.1	Análise qualitativa.....	18
2.8.2	Análise quantitativa.....	19
2.8.2.1	Curva padrão de glicose.....	19
2.8.2.2	Celulases e amilases.....	20
3	RESULTADOS.....	22
3.1	Isolamento de fungos filamentosos.....	22
3.2	Análise qualitativa da atividade enzimática.....	23
3.3	Análise quantitativa da atividade enzimática.....	24
4	DISCUSSÃO.....	27
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
	REFERÊNCIAS.....	34

1 INTRODUÇÃO

A Amazônia recebe significativa atenção quanto à diversidade do seu ecossistema, tendo em vista a riqueza do material biológico que possibilita aos pesquisadores as descobertas de recursos genéticos provenientes deste bioma (SHUBART, 1983 apud BARBOSA, 2000).

A literatura frequentemente relata sobre a grande quantidade de organismos presentes nesse habitat que ainda não foram identificados, como plantas, insetos, animais e micro-organismos que são fontes de novos saberes científicos para desenvolvimento de biotecnologias (BARBOSA, 2000; PIROTA *et al.*, 2015).

Nesse contexto, muitos autores ressaltam a importância de identificar e de caracterizar o maior número de espécies, com vistas a favorecer a ampliação da bioindústria, o uso sustentável do recurso biológico e, sobretudo, permitir a preservação de material genético para a posteridade (BARBOSA, 2000; PIROTA *et al.*, 2015; SILVA; MALTA, 2016).

O crescente foco em pesquisas científicas voltadas para a área da microbiologia aplicada desvela a pertinência em estudar o potencial dos micro-organismos. Estudos estimam a existência de 1,5 milhão de espécies de fungos no mundo onde somente 70 mil foram catalogados (OLIVEIRA, 2010; SILVA; MALTA, 2016).

É sabido que o bioma da Amazônia é uma fonte próspera de organismos pertencentes ao Reino Fungi por possuir condições climáticas favoráveis como umidade elevada, grande disponibilidade de água e diversidade no substrato nutricional. Nessas condições, os fungos do tipo filamentosos são abundantemente distribuídos devido a sua diversidade metabólica e estrutura micelial formada por um complexo de hifas que atuam na absorção de nutrientes. Esses organismos heterotróficos frequentemente secretam substâncias no ambiente para degradar polímeros complexos e facilitar a entrada destes na célula fúngica (SPIER, 2005; ROSA, 2014; GONÇALVES, 2016). Nesse sentido, pesquisas a respeito da riqueza microbiana da região podem contribuir para o desenvolvimento da ciência (PIROTA *et al.*, 2015).

Para além da sua importância ecológica através da decomposição de restos orgânicos no ecossistema, os fungos filamentosos possuem grande valor para os

processos biotecnológicos na obtenção de substâncias ativas oriundas do seu metabolismo celular (CARMO, 2011; OLIVEIRA, 2010; SILVA; MALTA, 2016).

A relevância das pesquisas científicas sobre atividades metabólicas nos fungos decorre em grande parte do interesse comercial nas várias substâncias que podem ser excretadas por esses organismos. Os micro-organismos são, em síntese, verdadeiras máquinas para produção de metabólitos de interesse comercial (SANTOS, 2012).

Os metabólitos em questão possuem inúmeras aplicações, tornam-se princípio ativo na fabricação de biofármacos, catalisam reações químicas, melhoram a qualidade e a eficiência dos processos fermentativos aumentando a produtividade, ajudam a degradar substâncias tóxicas oriundas dos corantes têxteis, possibilitam a conversão de biomassa em combustível como o etanol, entre outras atuações nas indústrias (CARMO, 2011).

As hidrolases são algumas das várias biomoléculas produzidas pelos fungos que atuam degradando polímeros complexos em estruturas mais simples para obtenção de energia (SALOMÃO, 2017). De acordo com Carmo (2011) e Gonçalves (2016) grande parte das enzimas aplicadas nas indústrias (75%) é destinada a hidrólise de macromoléculas naturais complexas.

As celulasas constituem um conjunto de enzimas que atuam na despolimerização da celulose. Este polissacarídeo possui um arranjo estrutural complexo formado por ligações glicosídicas na sua cadeia linear e por ligações de hidrogênio dentro da própria molécula ou entre moléculas distintas de celulose que lhe conferem alta resistência e baixa solubilidade em água (ARANTES; MILAGRES, 2009; INFORSATO; PORTO, 2016)

Assim como a celulose, o amido é um polímero encontrado em abundância na natureza e também muito utilizado na indústria de alimentos. As enzimas hidrolíticas responsáveis pela degradação do amido nos processos fermentativos são as amilases. E devido ao grande interesse industrial por estas enzimas, elas constantemente são foco de pesquisas quanto a descoberta de novos micro-organismos produtores (SPIER, 2005; OLIVEIRA, 2013; ASTOLPHO, 2017).

Nessa direção, as enzimas, assim como os micro-organismos, são de grande importância para as indústrias devido, principalmente, à capacidade de bioconversão de substratos diversos em produtos de valores agregados, bem como à facilidade de cultivo em larga escala (ORLANDELLI *et al.*, 2012).

A procura por fungos produtores de enzimas participativas na decomposição do material lignocelulósico e amiláceo como as amilases e celulasas é de suma importância, pois os coquetéis enzimáticos comercializados possuem valor agregado, e, por esse motivo, pesquisas relacionadas a este tema possibilitam o desenvolvimento de alternativas de baixo custo (SORENSEN *et al.*, 2013 apud ASCENCIO, 2016), além da demanda industrial por enzimas que degradem material residual celulósico de empresas, aumentando sua produtividade sem aumentar a área de produção (PIROTA *et al.*, 2015; SILVA; MALTA, 2016; SALOMÃO, 2017).

Com a difusão dos parâmetros de sustentabilidade, tecnologias e processos são desenvolvidos para diminuir o impacto ambiental causado pelo descarte de rejeitos oriundos das indústrias. Resíduos orgânicos gerados pelo setor alimentício, por exemplo, têm sido empregados como fonte de carbono para o crescimento microbiano e para produção das enzimas hidrolíticas. A conversão desses substratos pelas hidrolases origina os mais variados produtos como heteropolímeros de interesse tecnológico, ácidos orgânicos e biocombustível (SANTOS, 2015).

Gonçalves (2016) aponta que existem como principais resíduos oriundos da agroindústria no Brasil os farelos de trigo, mandioca, casca de arroz e café, bagaço de beterraba e cana-de-açúcar. No Amazonas, os dados sobre os resíduos gerados pela produção agrícola são escassos e não estão sistematizados. Todavia, foi possível obter elementos periféricos quanto ao tema através de informações sobre o desenvolvimento da agricultura no Estado indicando que o Amazonas possui como principais rejeitos agrícolas as cascas de cupuaçu, castanha, coco, cascas e caroços de açaí e tucumã (VAL; SANTOS, 2011; AQUINO, 2014).

Por conseguinte, o uso de resíduos oriundos das indústrias alimentícias como substratos para a produção dessas enzimas tem demonstrado muito potencial e baixo custo visto que este setor produz quantidades enormes de rejeitos agroindustriais. A transformação desses rejeitos em subprodutos ultrapassa o interesse econômico na medida em que favorece o desenvolvimento de uma tecnologia limpa e sustentável através do beneficiamento de substratos da indústria alimentícia (ARAUJO, 2013; SANTOS *et al.*, 2013).

Resíduos da cana-de-açúcar, farelo de trigo e sabugo de milho são utilizados como substratos para produção de celulasas por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Acremonium* (PEREIRA, 2013). O fungo *Aspergillus niger* produziu

enzimas amilolíticas a partir dos substratos de bagaço de malte, farelo de trigo e casca de abacaxi (STROPARO *et al.*, 2012).

Nesse sentido, o desenvolvimento de pesquisas sobre a produção de hidrolases por fungos aliada ao emprego dos resíduos agrícolas da Amazônia é pertinente também devido à carência de trabalhos científicos da área, bem como a crescente demanda industrial e a questões de manejo sustentável dos recursos ambientais.

Diante do exposto, a pesquisa objetivou avaliar diferentes resíduos agrícolas regionais (cascas de banana, castanha-do-Pará e cascas de mandioca) como substratos indutores para produção de amilases e celulases por fungos filamentosos isolados do solo no Município de Coari – Amazonas.

2 METODOLOGIA

2.1 Área de estudo

O município de Coari, situado na região do Médio Solimões no Amazonas, com 57.970,768 km² de território (IBGE, 2017), possui solo fértil de várzea e terra firme (LIMA *et al.*, 2007). O local de coleta das amostras de solo foi a antiga Fazenda Experimental da UFAM que atualmente é o Centro de Apoio à Pesquisa do Médio Solimões – CAP-MedSol (S 04°07'31.4" W 063°04'23.9") na cidade de Coari.

2.2 Coleta

Os materiais necessários para coleta do solo (espátulas e envelopes de papel) foram devidamente esterilizados por 15 minutos na autoclave a 121°C e 1atm de pressão. Com o auxílio das espátulas cavou-se uma fenda para retirada de aproximadamente 50 g de solo entre 10 a 15 cm de profundidade, o material foi depositado nos envelopes de papel, logo em seguida, foram lacrados e transportados para o Laboratório de Microbiologia nas dependências do Instituto de Saúde e Biotecnologia (ISB) da UFAM.

2.3 Isolamento dos fungos

Os fungos foram isolados utilizando a técnica de diluição seriada adaptada a partir da metodologia de Colla *et al.* (2008), onde foi preparado uma solução estoque contendo 225 mL de solução salina 0,85% esterilizada e 10 g do solo coletado. A mistura permaneceu sob agitação no Shaker a 150 r.p.m. a 28 °C por 12 horas.

O processo da diluição seriada foi realizado, em triplicata, pipetando-se 1 mL da solução estoque para um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina caracterizando a primeira diluição (10^{-1}). A partir deste tubo de ensaio foi transferido 1 mL para um segundo tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina caracterizando a segunda diluição (10^{-2}). A cada diluição o material foi agitado por 40 segundos no Vortex QL-901 (VERTEX). O procedimento foi repetido até a obtenção de uma diluição equivalente a 10^{-6} .

O inóculo foi realizado em triplicata utilizando apenas as diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} em meio *Sabouraud Dextrose Ágar* (SDA) acrescido de cloranfenicol (COSTA; ZANELLA, 2012), onde 100 μ L das respectivas amostras foram pipetados nas placas de Petri e com o auxílio da alça de *Drigalski* a solução foi uniformemente espalhada na superfície do meio de cultura. O material permaneceu incubado a 28 °C na estufa B.O.D até o aparecimento das colônias, sendo que o isolamento e a manutenção dos fungos isolados foram realizados através de repique contínuo em placas contendo o meio SDA.

2.4 Conservação

A conservação das colônias purificadas foi pelo método de congelamento simples, onde preparou-se uma solução de glicerol a 20%, transferiu-se 1 mL dela para os criotubos de 2 mL sendo o conjunto esterilizado na autoclave por 15 minutos a 121 °C e 1atm de pressão (ROSA, 2014). No interior do fluxo laminar, retirou-se seis partes do isolado com o auxílio de um bisturi transferindo-os para o criotubo contendo a solução de glicerol, após, o criotubo foi identificado com a sigla do fungo correspondente e vedado com parafilme. A conservação foi realizada em duplicata e a coleção foi mantida em freezer a -10 °C.

2.5 Coleta e preparo dos resíduos agrícolas

As cascas de castanha-do-Pará, mandioca e banana foram coletadas na Feira Municipal de Coari assim como de pequenos comerciantes e transportados para o Laboratório de Microbiologia nas dependências do Instituto de Saúde e Biotecnologia (ISB) da UFAM.

Os resíduos agrícolas foram lavados em água corrente seguida de água destilada. A secagem do material foi realizada em estufa a 60 °C pelo período de 24 horas para as cascas da mandioca, por 48 horas para cascas da castanha e 72 horas para as cascas de banana.

O material foi triturado separadamente em moinho de facas tipo Willey usando as peneiras com malha 10 mesh para as cascas de banana e 30 mesh para as cascas de mandioca e castanha, cuja as granulometrias aproximadas são 2 mm e 0,5 mm respectivamente. O pó de cada resíduo agrícola foi armazenado em envelope de

papel protegido por saco *zip lock* no refrigerador até o momento da utilização (SANTOS *et al.*, 2013).

2.6 Fermentação em estado líquido

O meio líquido utilizado para a produção das enzimas foi o Manachini (MANACHINI *et al.*, 1987), composto de (g/L): KH_2PO_4 – 2,0 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1 g; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,9 g; Extrato de Levedura – 1,0 g; Água destilada – 1L. O meio foi suplementado com 1% para cada resíduo agrícola.

2.7 Condições de cultivo e obtenção de enzimas

Para cada fungo, foi realizado um inóculo em frasco Erlenmeyer de 100 mL contendo 30 mL de meio nutriente líquido Manachini enriquecido com 1% do substrato agrícola e incubado em Shaker SL222 (SOLAB) sob agitação de 150 r.p.m. a 28°C por 72 horas. Ao término, os inóculos foram filtrados em papel filtro e funil de vidro. Em seguida, o extrato filtrado foi centrifugado por 30 minutos a 4000 r.p.m. para obtenção de uma solução livre de células utilizada na determinação das atividades enzimáticas.

2.8 Determinação da atividade enzimática

2.8.1 Análise qualitativa

O método para avaliar qualitativamente a atividade enzimática para celulasas e amilases foi a técnica do *Cup-Plate* seguindo o procedimento descrito por Teixeira *et al.* (2011).

Em uma placa de Petri contendo meio de cultivo específico para atividade de cada enzima, foram perfurados espaçadamente quatro poços (\varnothing 5 mm) e pipetados 100 μL do extrato enzimático bruto em cada perfuração. As placas foram embaladas com papel alumínio e incubadas em estufa B.O.D. a 37 °C por 72 horas.

O meio de cultivo para teste da enzima celulase foi composto de 18 g de Ágar e 10 g de Carboximetilcelulose (CMC) dissolvidos em 1000 mL de Tampão acetato de sódio 0,1 Molar (pH 5,0). E para a enzima amilase, preparou-se o meio nutriente

composto por 18 g de Ágar e 10 g de amido solúvel dissolvidos em 1000 mL de Tampão acetato de sódio 0,1 Molar (pH 5,0).

A revelação da atividade enzimática para celulase ocorreu com a formação de halos translúcidos após aplicação da solução aquosa de vermelho do Congo 0,1 % (p/v) e NaCl 1M. A revelação da atividade enzimática para amilase ocorreu com a formação de halos translúcidos após aplicação de iodo ressublimado.

Os halos foram aferidos com o auxílio de um paquímetro e os dados calculados de acordo com a equação 1. Foram considerados como bons produtores de enzimas extracelulares os fungos cujo o Índice de Atividade Enzimática (I) obtido foi superior ou igual a 2,0 (SOARES *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2011).

Equação 1:

$$I = \frac{\text{diâmetro total do halo (mm)}}{\text{diâmetro do poço (mm)}}$$

2.8.2 Análise quantitativa

2.8.2.1 Curva padrão de glicose

Para determinação enzimática, foi calculada uma curva de calibração a partir do teor de glicose (g.L^{-1}) através do método DNS – ácido 3,5-dinitrosalicílico (MILLER, 1959). O método foi adaptado conforme protocolo apresentado por Vasconcelos (2013).

Preparou-se 60 mL de uma solução estoque de glicose ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$). Esta solução foi diluída em 9 tubos de ensaio nas concentrações de 0,1 a $0,9 \text{ g.L}^{-1}$ sendo o volume final completado com água destilada para 10 mL.

Apenas 1 mL de cada diluição foi utilizada para reação com 1 mL do reagente DNS, e o branco da reação foi preparada com 1 mL de água destilada, em substituição a solução de glicose, e a mesma quantia do reagente. Cada reação foi realizada em triplicata.

Os tubos contendo o meio reacional foram homogeneizados para evitar a precipitação da glicose e incubados a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ em banho-maria por 5 minutos. Após o resfriamento em temperatura ambiente, foram adicionados a cada tubo o volume de

3,5 mL de água destilada. A leitura da absorbância das amostras ocorreu na faixa 540 nm no espectrofotômetro (KASUAKI).

Para curva padrão, uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcares redutores por minuto de reação, onde a atividade enzimática é expressa em $\text{UI}\cdot\text{mL}^{-1}$ de resíduo fermentado. As absorbâncias foram convertidas a valores de concentração de glicose ($\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$) mediante os dados apresentados na equação da reta obtida na curva padrão (FERNANDES *et al.*, 2007; PIETROBON, 2008).

2.8.2.2 Celulases e amilases

A determinação quantitativa da atividade enzimática para celulases e amilases foi realizada em triplicata pela mistura de reação contendo 0,5 mL do extrato enzimático bruto e 0,5 mL de substrato indutor específico para cada enzima. A reação controle foi composta de 0,5 mL do substrato e 0,5 mL de água destilada em substituição ao extrato enzimático.

As amostras permaneceram incubadas em banho-maria a 37 °C por 10 minutos e a reação foi interrompida, após esse período, com a adição de 0,5 mL do reagente DNS para quantificação dos açúcares redutores liberados.

Em seguida, todas as amostras foram incubadas novamente em banho-maria por 5 minutos a uma temperatura de 100 °C, sendo, após esse período, resfriadas e adicionado 3,5 mL de água destilada. A medição da absorbância das amostras ocorreu na faixa de leitura 540 nm no espectrofotômetro (FERNANDES *et al.*, 2007; PIETROBON, 2008).

O substrato indutor específico para celulases foi preparado pela mistura de Tampão citrato de sódio a 0,05M e pH 4,8 enriquecido com 1% de Carboximetilcelulose (CMC), e para amilases utilizou-se Tampão fosfato de potássio a 0,05M e pH 6,0 enriquecido com 1% de Amido solúvel.

Conforme Galindo (2016), após as análises acima, as concentrações enzimáticas ($\text{UI}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram calculadas a partir da equação 2:

Equação 2:

$$[\text{enzima}] = [\text{AR}] \times V_{\text{mistura}} \times (\text{Treação})^{-1}$$

Onde:

[AR] = concentração de açúcar produzido ($\mu\text{mol. mL}^{-1}$)

V = volume da mistura reacional (mL)

T_{reação} = tempo de reação enzimática (min).

3 RESULTADOS

3.1 Isolamento de fungos filamentosos

A partir das amostras de solo amazônico coletadas na região do CAP-MedSol em Coari, obteve-se um total de 63 fungos (Figura 1 e 2), isolados após os procedimentos de diluição seriada e repiques contínuos em placas de Petri contendo meio de cultura *Sabouraud Dextrose Ágar* (SDA).

Figura 1 – Fungos isolados (48 amostras)



Fonte: A autora (2018)

Figura 2 – Fungos isolados (15 amostras)



Fonte: A autora (2018)

No decorrer do processo de repique contínuo, tanto para isolamento dos fungos quanto para manutenção das colônias, foi possível observar que o meio de cultura SDA mostrou ser eficiente para o crescimento dos fungos amazônicos quando incubados em temperatura entre 24 °C e 28 °C.

A adição do cloranfenicol ao meio de cultura foi eficaz no que se refere a ação bacteriostática nas placas. A aplicação do antibiótico tornou-se necessária ao se observar, durante o primeiro inóculo realizado logo após a diluição seriada das amostras de solo, um crescimento bacteriano exacerbado inibindo, em alguns casos, o crescimento fúngico, o que afetaria os resultados da pesquisa.

Todos os isolados foram devidamente conservados congelados, em duplicata, dentro de criotubos contendo solução de glicerol a 20%. Contudo, manteve-se uma cópia ativa de cada fungo cultivada em meio de cultura SDA sem cloranfenicol.

3.2 Análise qualitativa da atividade enzimática

A amostragem de isolados para avaliação da produção extracelular das enzimas celulasas e amilases foi de 10 fungos. Os extratos enzimáticos obtidos na fermentação foram submetidos ao teste qualitativo do *Cup-Plate*, onde a partir dos dados coletados (diâmetro total do halo e diâmetro do poço) foi possível calcular os Índices de Atividade Enzimática (I) apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Índice da atividade enzimática para amilase e celulase de fungos amazônicos pelo método do Cup-Plate

ENZIMA SUBSTRATO FUNGOS	AMILASE		CELULASE			
	CASCA DA BANANA		CASCA DA CASTANHA		CASCA DA MANDIOCA	
	HALO (mm)*	(I)	HALO (mm)	(I)	HALO (mm)	(I)
AS 01	9	2,8	24,5	5,9	20,75	5,15
AS 02	17,25	4,45	13,5	3,7	-	-
AS 18	12,5	3,5	-	-	-	-
AS 20	9,5	2,9	22,5	5,5	-	-
AS 26	14,25	3,85	18,75	4,75	-	-
AS 36	15,25	4,05	24,75	5,95	24,25	5,85
AS 51	19,25	4,85	12,25	3,45	-	-
AS 59	8	2,6	-	-	-	-
AS 60	16,5	4,3	17	4,4	14,25	3,85
AS 61	14,75	3,95	18,25	4,65	12	3,4

(I) = Índice da atividade enzimática

- Não houve halo de degradação

* HALO (mm) = diâmetro total do halo – diâmetro do poço

Foram considerados como bons produtores de amilases e celulasas os fungos que obtiveram (I) acima ou igual a 2 (SOARES *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2011).

Nesse sentido, os fungos AS 01, 61, 60 e 36 obtiveram resultados satisfatórios para ambas as enzimas em todos os substratos testados.

Os fungos AS 20, 26, 02 e 51 são bons produtores de amilase e celulase, entretanto estes isolados não foram capazes de produzir celulases a partir da casca da mandioca como substrato. O fungo AS 59 apresentou produção apenas para a enzima amilase no substrato indutor casca da banana.

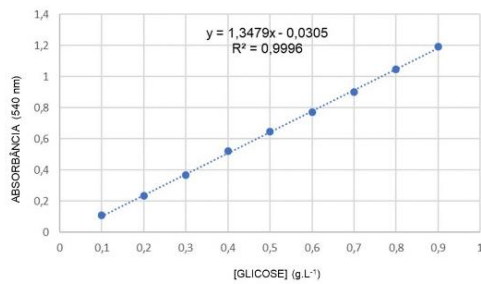
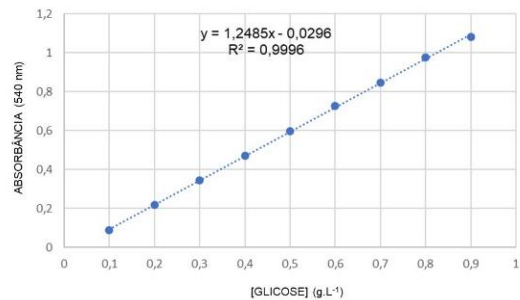
Para celulase, o fungo AS 18 não foi um bom produtor da enzima a partir dos substratos casca da castanha e mandioca, porém apresentou boa produção para amilase a partir do substrato casca de banana.

Em uma perspectiva geral da análise qualitativa, os melhores produtores de enzimas extracelulares foram AS 51 para amilase com Índice de atividade enzimática igual a 4,85 no substrato casca de banana e para celulase o fungo AS 36 que apresentou o melhor desempenho com 5,95 e 5,85 de atividade enzimática nos substratos cascas de castanha e mandioca respectivamente.

3.3 Análise quantitativa da atividade enzimática

Com base nos resultados qualitativos do *Cup-Plate* foram selecionadas as amostras cujo (I) foi superior ou igual a 3,0 para quantificação da atividade enzimática através do método DNS sendo um total de 7 extratos para amilase e 12 extratos para celulase, todos testados em triplicatas.

Foi construída uma curva padrão de glicose para amilase e outra para celulase conforme apresentadas nas Figuras 3 e 4. As curvas foram obtidas com base nas absorbâncias das soluções diluídas de glicose (g.L^{-1}) em reação com reagente DNS. A partir da conversão das absorbâncias das amostras em valores de concentração de glicose (umol.mL^{-1}) mediante as equações da reta $y = 1,3479x - 0,0305$ e $y = 1,2485x - 0,0296$, foi possível determinar a atividade enzimática baseada na concentração da enzima dada em UI.mL^{-1} .

Figura 3 – Curva Padrão de Glicose para amilase**Figura 4** – Curva Padrão de Glicose para celulase

Os valores (média e desvio padrão) da atividade enzimática para amilase e celulase podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 - Determinação da atividade enzimática para amilase e celulase pelo método DNS

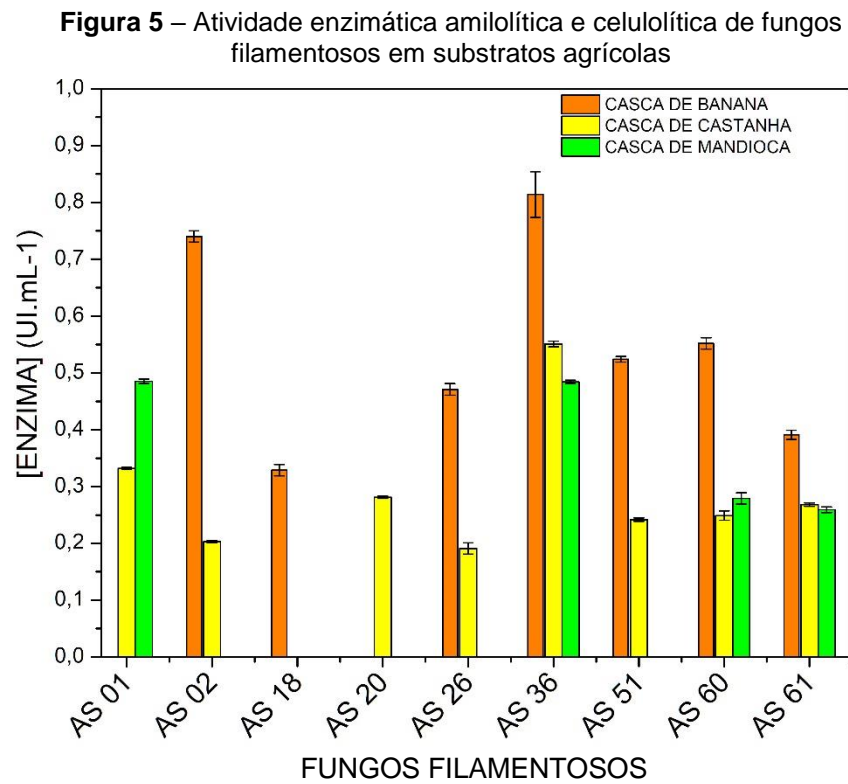
ENZIMAS	AMILASE	CELULASE	
SUBSTRATO	CASCA DE BANANA	CASCA DE CASTANHA	CASCA DE MANDIOCA
FUNGOS	[ENZIMA] (UI.mL-1)	[ENZIMA] (UI.mL-1)	[ENZIMA] (UI.mL-1)
AS 01	NT	0,332±0,002	0,485±0,004
AS 02	0,74±0,01	0,203±0,002	NT
AS 18	0,329±0,01	NT	NT
AS 20	NT	0,281±0,002	NT
AS 26	0,471±0,01	0,191±0,01	NT
AS 36	0,814±0,04	0,551±0,005	0,484±0,003
AS 51	0,524±0,005	0,242±0,003	NT
AS 60	0,552±0,01	0,249±0,008	0,279±0,01
AS 61	0,391±0,008	0,268±0,003	0,259±0,005

NT = Não testado: não obteve (I) igual ou superior a 3,0 no *Cup-Plate*

No que se refere a atividade sacarificante, o fungo AS 36 obteve o melhor desempenho para amilase e celulase nos substratos casca da banana e casca de castanha, cujo os valores de atividade enzimática foram 0,81 UI.mL⁻¹ e 0,55 UI.mL⁻¹ respectivamente. Para o substrato indutor casca de mandioca, o fungo AS 01 foi o melhor produtor de celulase alcançando o valor de 0,485 UI.mL⁻¹.

Os fungos AS 61 e AS 26 apresentaram os valores mais baixos na quantificação de celulases nos substratos de casca de mandioca e castanha (0,25 UI.mL⁻¹ e 0,19 UI.mL⁻¹). Na quantificação de amilase, foi o fungo AS 18 que apresentou baixa produção da enzima a partir da casca de banana como substrato indutor sendo 0,32 UI.mL⁻¹.

Foi possível observar (Figura 5) que a maior atividade enzimática foi obtida no resíduo agrícola casca de banana seguido de casca de castanha como substrato indutor. A casca da mandioca foi o resíduo cuja produção enzimática foi a menor. Constatou-se que o fungo AS 36 foi o melhor produtor de enzimas hidrolíticas em todos os substratos avaliados.



4 DISCUSSÃO

A quantidade de isolados neste trabalho (63 fungos) foi superior ao resultado descrito pelos autores Pirota *et al.* (2015) que isolaram um quantitativo de 40 fungos do solo e de madeira em decomposição da Floresta Amazônica e por Castro *et al.* (2012) que descrevem 45 fungos conidiais isolados de partes em decomposição de *Euterpe oleracea* Mart. (açazeiro) na Área de Proteção Ambiental da ilha do Combu, município de Belém – Pará.

Resultado similar ao deste trabalho é apresentado pelos autores Souza *et al.* (2008) que isolaram 60 fungos Basidiomicetos das áreas de floresta na Amazônia (Reserva de Campina do INPA, Bosque da Ciência do INPA, campus do INPA/V8 e Urucu no município de Coari).

Números mais expressivos de isolados da região amazônica são expostos por vários autores. Fonseca *et al.* (2016) obtiveram 83 fungos da família *Polyporaceae* da área de floresta nos Municípios Autazes, Anamá, Careiro da várzea, Coari, Barcelos, Borba, Manaus, Manicoré, Novo Aripuanã, Nova Olinda do Norte, Parintins e Presidente Figueiredo do Estado do Amazonas.

Bezerra *et al.* (2016) descreve 91 fungos filamentosos isolados de sedimentos do Rio Negro no Amazonas, enquanto que um quantitativo de 110 fungos filamentosos foram isolados por Delabona (2011) de áreas florestais pertencentes a Reserva da Embrapa Amazônia Oriental e da Fazenda Sococo no Estado do Pará.

A quantidade elevada de isolados encontrada por estes autores decorre da extensão da área de coleta que foi superior a área delimitada neste trabalho. Ademais, Moura *et al.* (2015), em seus estudos sobre a variação populacional de bactérias e fungos no solo, afirma que a microbiota responde de maneira variada devido a fatores como teor de umidade, pH, profundidade de coleta, nutrientes, temperatura e período climático que influenciam diretamente na composição dos micro-organismos no ambiente.

Os 63 isolados obtidos das amostras de solo no CAP-MedSol pode ser considerado um bom resultado, porém nota-se a necessidade de um estudo mais aprofundado para se avaliar a dinâmica dos micro-organismos nos períodos de chuva/seca e de transição, bem como sobre a relação da profundidade de coleta do solo com a quantidade de micro-organismos encontrada.

Sob uma perspectiva ampla, a variação no número de isolados na literatura e neste trabalho é uma resposta as distintas condições do local de coleta, dos substratos disponíveis e das influências climáticas. Estes fatores, moldam as características fisiológicas das células fúngicas alterando a atividade enzimática desses micro-organismos.

A análise qualitativa do *Cup-Plate* permite avaliar a produção enzimática em meio sólido através da visualização de halos de degradação do substrato específico para cada enzima. O resultado é expresso em milímetros do halo formado ou através do Índice Enzimático (I) obtido por meio de fórmula matemática.

Segundo Soares *et al.* (2010) e Teixeira *et al.* (2011), são considerados bons produtores de enzimas os fungos que possuem (I) igual ou maior que 2,0. Nesse sentido, todos os fungos analisados neste trabalho podem ser considerados bons produtores de amilases tendo como substrato indutor a casca da banana visto que apresentaram (I) entre 2,6 a 4,85. Para celulasas, 8 fungos foram bons produtores da enzima a partir do substrato casca de castanha com valores entre 3,45 a 5,95 e apenas 4 fungos mostraram produção satisfatória de enzimas celulolíticas no substrato casca de mandioca com (I) entre 3,4 a 5,85.

Valores de (I) muito próximos ao deste trabalho foram relatados por Brito (2017) que investigou a atividade amilolítica de fungos filamentosos endofíticos isolados da mandioca no município de Coari – AM. Dentre os fungos analisados pelo autor, três apresentaram os melhores índices enzimáticos tendo como substrato amido solúvel sendo 3,6, 3,5 e 3,4. Chamy (2017) obteve resultados mais expressivos para a enzima amilase de fungos filamentosos isolados de formigas cortadeira no município de Coari com (I) igual a 4,4 e para celulase o melhor produtor alcançou (I) igual a 5,33.

A similaridade dos resultados pode ter sido alcançada devido as condições de cultivo das enzimas (fermentação submersa a 28°C sob agitação durante 72 horas) e teste da atividade enzimática (37°C por 36 horas) em ambos os trabalhos. O mesmo foi realizado na presente pesquisa com um acréscimo no tempo de incubação do teste enzimático para 72 horas o que pode explicar os valores encontrados relativamente superiores ao destes dois autores.

A atividade amilolítica e celulolítica dos fungos analisados apresentaram halos de degradação de 8 mm a 19,25 mm e de 12 mm a 24,75 mm respectivamente. Esses valores foram mais altos quando comparados aos resultados encontrados por Lima *et al.* (2016) que avaliaram a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares de 24

fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* oriundos da Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM) utilizando substratos comerciais Amido solúvel e Carboxymetilcelulose (CMC). Segundo os autores, dentre os fungos testados, 12 apresentaram resultados positivo para a enzima amilase com halo de degradação variando entre 2 mm a 16 mm e 12 fungos apresentaram atividade para a enzima celulase com halos variando em torno de 1,5 mm a 5 mm.

Os tamanhos dos halos foram superiores também aos diâmetros publicados por Bezerra (2017) quando analisou a atividade enzimática de 15 isolados endofíticos e 15 isolados patogênicos de fungos filamentosos do gênero *Colletotrichum* spp obtidos de folhas de guaranazeiro no município de Maués – AM. Para atividade amilolítica, os isolados patogênicos apresentaram os maiores halos de degradação do amido 1,03, 1,0 e 0,96 cm (10,3, 10 e 9,6 mm). A maior atividade celulolítica foi obtida pelos endofíticos com halo de degradação da celulose de 1,1 cm (11 mm).

Souza e colaboradores (2008) verificaram a produção de algumas hidrolases por linhagens de Basidiomycetes isoladas de áreas de florestas da Amazônia. Para indução de amilases utilizaram como substrato amido de milho, farelo de trigo e maltose obtendo melhor resultado com farelo de trigo onde os halos variaram de 11,70 mm a 27,50 mm. Para celulases, os halos variaram entre 10,6 mm a 21,4 mm no substrato CMC.

A atividade enzimática para amilase no substrato farelo de trigo mencionada por Souza e colaboradores (2008) foi mais expressiva que os resultados encontrados nesta pesquisa com o uso da casca de banana como substrato. Porém, o mesmo não aconteceu para atividade celulolítica no substrato CMC citada pelos autores que permaneceram abaixo dos valores obtidos nos substratos agrícolas avaliados casca de castanha e mandioca.

Tavares *et al.* (2012) testaram a atividade enzimática de fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* isolados das folhas de noni (*Morinda citrifolia*) do Amazonas. Estes autores encontraram diâmetros superiores, onde os maiores halos celulolíticos (34 mm e 33 mm) e amilolíticos (29,5 mm e 29 mm) foram apresentados por exemplares fúngicos do gênero *Aspergillus*.

É plausível que as condições de cultivo e de teste enzimático conferidas por esses autores como temperatura e tempo de incubação das amostras tenham influenciado na formação dos halos de degradação. Tavares *et al.* (2012) pode ter alcançado a amplitude dos halos devido ao tempo de fermentação que foi de cinco

dias, o mais longo dentre os presentes trabalhos. A temperatura de fermentação (30°C) também foi a mais alta onde a prevalência é de 28 °C utilizada pelos outros autores e admitida nos testes dos fungos isolado nesta pesquisa.

Essa premissa indica a necessidade de estudos paralelos afim de conhecer os parâmetros ideais para a melhor obtenção das enzimas e determinação da atividade enzimática em cada ensaio.

É importante destacar que se optou por pesquisar trabalhos na literatura que utilizassem condições parecidas de cultivo das enzimas por fermentação em estado líquido. Durante o levantamento bibliográfico observou-se que muitos trabalhos aplicam a fermentação em estado sólido para cultivo e obtenção das enzimas principalmente no que se refere ao uso de resíduos agrícolas como substrato indutor. Nesse sentido, os dados destes trabalhos não foram empregados na discussão dos resultados qualitativos e quantitativos devido as dessemelhanças metodológicas.

Nota-se também que poucos trabalhos utilizam o método do *Cup-Plate* para se avaliar a produção de enzimas amilase e celulase produzidas por fermentação em estado líquido com o uso de resíduos agrícolas como substratos. Na maioria dos casos, esta análise qualitativa é aplicada como método de seleção/triagem de fungos produtores de tais enzimas a partir de substratos comerciais (Amido solúvel e CMC).

Em síntese, a técnica do *Cup-Plate* permitiu verificar a produção enzimática para amilase e celulase nos extratos obtidos dos isolados. Porém, não se configura um método preciso, visto que não permite identificar o quanto de enzima foi produzida a partir do substrato, tornando-se indispensável uma análise quantitativa.

O método DNS permite quantificar a atividade sacarificante pela determinação dos açúcares redutores produzidos na hidrólise do substrato específico para cada enzima (FERNANDES *et al.*, 2007).

Dentre os fungos analisados, a melhor atividade amilolítica tendo como substrato casca de banana foi obtida pelo isolado AS 36 com 0,814 UI.ml⁻¹. Este mesmo fungo também foi o melhor produtor de enzimas celulolíticas no substrato indutor casca de castanha com 0,551 UI.mL⁻¹. No que se refere a produção de celulasas utilizando casca de mandioca, não foram observadas diferenças expressivas nos valores de atividade enzimática entre os fungos AS 01 com 0,485 UI.ml⁻¹ e AS 36 com 0,484 UI.ml⁻¹. Visto isso, consideraremos este último o melhor produtor celulolítico em ambos os resíduos agrícolas.

Fernandes *et al.* (2007) ao avaliar a produção de amilases pelo fungo filamentoso *Macrophomina phaseolina* em diferentes fontes de carbono obteve a melhor atividade amilolítica sacarificante do fungo no substrato amido, seguido da farinha de arroz. Estes autores não registraram boa atividade enzimática utilizando farinha de banana como substrato indutor.

Santa-Rosa *et al.* (2018) comparou a atividade celulolítica de um fungo do gênero *Penicillium*, isolado do solo no município de Presidente Figueiredo – AM, com o isolado de *Trichoderma reesei* no qual é frequentemente aplicado na produção de enzimas celulolíticas. Os autores relataram que as atividades enzimáticas dos microorganismos analisados foram bastante similares no substrato Carboximetilcelulose (CMC), sendo 0,60 UI.mL⁻¹ para *Penicillium* e 0,86 UI.mL⁻¹ para *T. reesei*. Este resultado, embora ligeiramente superior, foi bem próximo ao do fungo AS 36 com o resíduo agrícola casca de castanha demonstrando a potencialidade deste fungo e a viabilidade do substrato indutor.

Silva *et al.* (2016) comparou a produção enzimática de celulases de três fungos (Basidiomiceto, *Penicillium adametzii* e *Aspergillus niger*) em três resíduos agrícolas produzidos no Amazonas: casca de cupuaçu, maracujá e macaxeira. *A. niger* foi o melhor produtor da enzima com 7,2 UI.mL⁻¹, seguido do fungo *P. adametzii* com 3,1 UI.mL⁻¹ e Basidiomiceto com 3,0 UI.mL⁻¹. O tempo de fermentação aplicado foram de 5 e 10 dias. Os autores esclarecem ainda que a casca de maracujá foi o melhor substrato indutor e a casca da macaxeira foi o menos eficaz, resultado igualmente encontrado para casca de mandioca com o fungo AS 36.

A atividade amilolítica do isolado AS 36 (0,814 UI.mL⁻¹) foi mais expressiva se comparada aos resultados publicados por Silva *et al.* (2017). Esses autores usaram amido solúvel como substrato para produção de amilase por fungos filamentosos provenientes da Coleção de Cultura de Fungos Filamentosos Endofíticos do LPNBio – BA. Registraram a maior atividade (0,47 UA) no tempo de fermentação equivalente a 72 horas, quase a metade do valor produzido por AS 36 utilizando o substrato indutor casca de banana no mesmo tempo de fermentação.

Resíduos agroindustriais foram avaliados como substratos para produção de hidrolases por linhagens de fungos filamentosos no trabalho de Stroparo *et al.* (2012). No artigo em questão, a melhor atividade endoglucanásica (enzima celulolítica que atua na região interna da molécula de celulose) foi obtida com o uso da casca de abacaxi como substrato sendo 0,18 UI.mL⁻¹, consideravelmente inferior ao melhor

produtor AS 36 tanto para casca de castanha quanto para casca de mandioca. Entretanto, a atividade amilolítica descrita por Stroparo *et al.* (2012) foi mais elevada sendo 6,32 UI.mL⁻¹ no substrato farelo de trigo.

Salomão (2017) avaliou a produção de celulase pelos fungos *Penicillium* sp., *Rhizomucor* sp. e *Trichoderma koningii* utilizando como substrato bagaço da cana em duas condições de fermentação: sólida e líquida. O melhor resultado encontrado via fermentação em estado líquido foi obtido pelo fungo *Trichoderma koningii* tendo como fonte de carbono o bagaço *in natura* da cana com atividade 3130,43 UI/L (3,13 UI.mL⁻¹), seguido de *Penicillium* sp. com 147,41 UI/L (0,147 UI.mL⁻¹) a partir do bagaço pré-tratado e *Rhizomucor* com atividade 63,49 UI/L (0,063 UI.mL⁻¹) no substrato *in natura*.

A melhor atividade enzimática encontrada por Salomão (2017) foi superior aos resultados para celulase desta pesquisa, onde o melhor produtor AS 36 expressou o valor de 0,55 UI.mL⁻¹ no substrato casca de castanha.

Contudo, a atividade de AS 36 também excedeu os valores encontrados para *Penicillium* sp. e *Rhizomucor* publicados pelo autor. Isto mostra que a atividade de celulasas pelo fungo pode ser aumentada consideravelmente se ajustados os parâmetros para produção da enzima.

Almeida (2019) avaliou 20 diferentes resíduos agrícolas para indução de amilases e obteve uma intensa atividade amilolítica utilizando casca de banana como fonte de carbono para fungo *Mucor* sp. com 1839,32 UI.mL⁻¹.

É importante salientar que os excelentes resultados expressos por Silva *et al.* (2016), Salomão (2017) e Almeida (2019) foram obtidos após determinar as principais condições operacionais necessárias para otimização da produção e atividade da enzima (meio de cultura, pH, temperatura, concentração do substrato e tempo de incubação). Assim, torna-se necessário conduzir mais testes para ajustar esses mesmos parâmetros afim de otimizar o processo e alcançar níveis mais elevados de atividade enzimática pelos fungos isolados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante da grande quantidade de fungos isolados, pôde-se confirmar que as características do solo e do clima amazônico são favoráveis para o crescimento de micro-organismos, principalmente os organismos pertencentes ao reino Fungi.

Os resíduos agrícolas avaliados nesta pesquisa mostraram-se viáveis como substrato indutor para produção de celulasas e amilases por isolados de fungos filamentosos.

Observou-se o bom desempenho das enzimas produzidas pelos fungos isolados a partir de substratos agrícolas que alcançaram valores de atividade enzimática equiparados as enzimas produzidas a partir de substratos comerciais (Amido solúvel e Carboxymetilcelulose).

Foi possível constatar, que os resultados encontrados expressam a potencialidade na produção enzimática de amilase e celulase por fungos isolados do solo de Coari utilizando resíduos da produção agrícola regional como substrato indutor via fermentação em estado líquido.

A bioprospecção de fungos produtores de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico foi apenas o passo inicial desta pesquisa. A etapa seguinte incide na caracterização da atividade enzimática e identificação molecular dos fungos para se alcançar uma abordagem mais completa do tema.

Espera-se poder contribuir, com as especificidades regionais desta pesquisa, para o estudo e desenvolvimento de bioprodutos como as enzimas hidrolíticas e para disseminação do conhecimento a respeito da diversidade e potencialidade microbiológica presente no solo amazônico.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. C. *Bioprospecção de fungos amilolíticos e caracterização bioquímica da amilase de *Mucor sp.* AD742 visando aplicação na hidrólise do amido*. 2019. 92p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, 2019.
- AQUINO, S. F. *Entre a roça e a feira: a circulação da produção agrícola no Amazonas*. 2014. 215p. Tese de Doutorado – Sociedade e Cultura na Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.
- ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Relevância de compostos de baixa massa molar produzidos por fungos e envolvidos na biodegradação da madeira. *Química Nova*, v. 32, n. 6, 1586-1595, 2009.
- ARAUJO, M. L. *Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas*. 2013. 98p. Dissertação de Mestrado – Centro de Tecnologia/Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2013.
- ASCENCIO, I. M. *Seleção de fungos filamentosos produtores de hidrolases e pré-otimização das condições de cultivo*. 2016. 110p. Dissertação de Mestrado – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, 2016.
- ASTOLPHO, H. A.; CARMO, E. J.; ASTOLFI-FILHO, S. Expressão e caracterização de α -amilase de *Bacillus licheniformis* DSM13 em levedura *Pichia pastoris*. *Scientia Amazônia*, v. 6, n.3, 107-118, 2017.
- BARBOSA, F. A moderna biotecnologia e o desenvolvimento da Amazônia. *Cadernos de Ciência e Tecnologia*, v.17, n.2, 43-79, 2000.
- BEZERRA, A. F. M. *et al.* Bioprospecção de fungos filamentosos isolados dos sedimentos do rio Negro para aplicação em reações de biorremediação enantiosseletiva de cetonas. In: OLIVEIRA, L.A. *et al.* (Ed.). *Diversidade microbiana da Amazônia*. Editora INPA, Manaus, Amazonas, 2016, p. 35-40.
- BEZERRA, C. S. *Caracterização enzimática de *Colletotrichum spp.* isolados de *Paullinia cupana* Kunth. var. *sorbilis* (Mart.)*. 2017. 105p. Dissertação de Mestrado – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus, Amazonas, 2017.
- BRITO, R. G. *Produção de Amilase por *Aspergillus flavus* isolado a partir da mandioca (*Manihot esculenta*)*. 2017. 54p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Amazonas, Coari, 2017.
- CARMO, C. da C. *Purificação parcial e caracterização da enzima xilanase produzida pelo fungo amazônico *Pycnoporus sanguineus* L. F. (MURR)*. 2011. 73p. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2011.

- CASTRO, C. C.; GUTIÉRREZ, A. H.; SOTÃO H. M. P. Fungos conidiais em *Euterpe oleracea* Mart. (açazeiro) na Ilha do Combu, Pará-Brasil. *Acta Botânica Brasilica*. v. 26, 761-771, 2012.
- CHAMY, M. N. C. L. *Identificação de fungos produtores de enzimas extracelulares de interesse biotecnológico associados às formigas cortadeiras Atta sexdens (Linnaeus, 1758)*. 2017. 72p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Amazonas, Coari, 2017.
- COLLA, L. M. *et al.* Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. *Ciênc. agrotec.*, v. 32, n. 3, 809-813, 2008.
- COSTA, J. A. A.; ZANELLA, G. N. Identificação de fungos filamentosos em derivados de milho comercializados em Primavera do Leste – MT. *Rev. Bras. Farm.* 93, 109-113, 2012.
- DELABONA, P. S. *Bioprospecção de fungos produtores de celulases da região amazônica para a produção de etanol celulósico*. 2011. 121p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 2011.
- FERNANDES, L. P. *et al.* Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. *Revista Eletrônica de Farmácia*. v. IV, 43-51, 2007.
- FONSECA, M. D. P. *et al.* Diversidade de macrofungos da família *Polyporaceae* (Basidiomycotina) no Estado do Amazonas. In: OLIVEIRA, L.A. *et al.* (Ed.). *Diversidade microbiana da Amazônia*. Editora INPA, Manaus, Amazonas, 2016, 94-99.
- GALINDO, H. M. *Produção e caracterização de exoglucanases e Endoglucanases de mucorales utilizando fermentação Sólida*. 2016. 57p. Dissertação de Mestrado – Centro de Biociências/Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.
- GONÇALVES, L. G. *Produção de amilases de Rhizopus microsporus var. oligosporus e hidrólise enzimática do bagaço de mandioca visando a produção de etanol por Saccharomyces cerevisiae*. 2016. 66p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Biociências de Rio Claro/Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, 2016.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Cidades: Coari censo, 2017. Disponível em: <ww2.ibge.gov.br/cidadesat/xtras/perfil.php>. Acessado em: Fevereiro de 2019.
- INFORSATO, F. J.; PORTO, A. L. M. Atividade enzimática de celulases pelo método DNS de fungos isolados de sementes em germinação. *Revista Brasileira de Energias Renováveis*, v.5, n.4, 444-465, 2016.

LIMA, A. K. S. *et al.* Enzimas extracelulares de *Aspergillus* e *Penicillium* conservados na Coleção de Fungos da Amazônia – CFAM. In: OLIVEIRA, L.A.; *et al.* (Ed.). *Diversidade microbiana da Amazônia*. Editora INPA, Manaus, Amazonas, 2016, p.336-341.

LIMA, H. N.; TEIXEIRA, W. G.; SOUZA, K. W. Os solos da paisagem da várzea com ênfase no trecho entre Coari e Manaus. In: FRAXE, T. J. P.; PEREIRA, H. S.; WITKOSKI, A. C. (Ed.). *Comunidades ribeirinhas amazônicas: modos de vida e uso dos recursos naturais*. EDUA, Manaus, Amazonas, 2007, p.35-50.

MANACHINI, P. L.; FORTINA, M. G.; PARINI, C. Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Hizopus stolonifer*. *Biotechnology Letters*, v.9, n. 3, 219-224, 1987.

MILLER, G. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*. New York, v.31, 426-428, 1959.

MOURA, Q. L. *et al.* Variação sazonal da população de bactérias e fungos e dos teores de nitrato e amônio do solo nos sítios do LBA e PPBIO, na Amazônia Oriental. *Revista Brasileira de Meteorologia*, v. 30, n. 3, 265-274, 2015.

OLIVEIRA, C. M. *Caracterização das amilases produzidas por isolados de rizóbios e mutantes de Bacillus sp. provenientes de solos amazônicos*. 2013. 112p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

OLIVEIRA, R. L. *Avaliação do Potencial Biotecnológico de Fungos Endofíticos de Piper hispidum*. 2010. 95p. Dissertação de Mestrado – Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2010.

ORLANDELLI, R. C. *et al.* Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. *SaBios: Rev. Saúde e Biol.*, v.7, n.3, 97-109, 2012.

PEREIRA, J. C. *Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos/termotolerantes produtores de celulasas e xilanases e aplicação dos extratos enzimáticos na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar*. 2013. 121p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas/Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, 2013.

PIETROBON, V. C. *Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido e álcali utilizando enzimas microbianas comerciais*. 2008. 66p. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, 2008.

PIROTA, R. D. P. B. *et al.* Caracterização de fungos isolados da região Amazônica quanto ao potencial para produção das enzimas envolvidas na conversão da biomassa vegetal. *Ciência Rural*, v.45, n.9, 1606-1612, 2015.

ROSA, I. Z. *Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de celulasas, xilanases e celobiose desidrogenase com potencial para sacarificação do*

bagaço de cana-de-açúcar. 2014. 77p. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, 2014.

SALOMÃO, G. S. B. *Análise da produção de celulases por fungos utilizando bagaço de cana como substrato*. 2017. 83p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, 2017.

SANTA-ROSA, P. S. *et al.* Production of thermostable β -glucosidase and CMCase by *Penicillium* sp. LMI01 isolated from the Amazon region. *Electronic Journal of Biotechnology*. v. 31, 84-92, 2018.

SANTOS, R. S. *Produção de hidrolases holocelulolíticas por fermentação em estado sólido com uso de fungos filamentosos e coprodutos da agroindústria de óleos vegetais como fontes de carbono*. 2015. 168p. Tese de Doutorado – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, 2015.

SANTOS, S. N. *Biopropecção de biomoléculas isoladas de fungos endofíticos de *Combretum leprosum* do bioma Caatinga*. 2012. 182p. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, 2012.

SANTOS, T. C. *et al.* Produção e quantificação de celulases por meio da fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais. *Scientia Agrária Paranaensis - SAP Mal. Cdo.*, v. 12, n. 2, 115-123, 2013.

SILVA, C. J. A.; MALTA, D. J. do N. A importância dos fungos na biotecnologia. *Ciências biológicas e da saúde*, v. 2, n. 3 49-66, 2016.

SILVA, L. A. F. *et al.* Produção de amilase por fungo filamentoso endofítico em fermentação submersa. *Cad. Ciênc. Agrá.*, v. 9, n. 3, 49–53, 2017.

SILVA, S. R. S. *et al.* Avaliação das enzimas CMcase e xilanase de três fungos endofíticos da Amazônia, em três resíduos agrícolas em duas diferentes condições de cultivo In: OLIVEIRA, L.A.; *et al.* (Ed.). *Diversidade microbiana da Amazônia*, Editora INPA, Manaus, Amazonas, 2016, p.222-227.

SOARES, I. A. *et al.* Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.30, 700-705, 2010.

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

SPIER, M. R. *Produção de enzimas amilolíticas fúngica A-amilase e amiloglucosidase por fermentação no Estado sólido*. 2005. 177p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

STROPARO, E. C. *et al.* Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, n. 6, 2267-2278, 2012.

TAVARES, A. C. D. *et al.* Extracellular Enzymes of Anamorphic Fungi Isolated from *Morinda citrifolia* L. BBR. *Biochemistry and Biotechnology Reports*. v.1, n. 2, p.1-6, 2012.

TEIXEIRA, M. F. S. *et al.* *Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada (aplicações biotecnológicas)*. 1 ed. EDUA, Manaus, 2011, 255p.

VAL, A. L.; SANTOS, G. M. (Ed.). *GEEA: Grupo de Estudos Estratégicos Amazônicos*. Caderno de Debates. Editora INPA, v. 4, Manaus, 2011, 219p.

VASCONCELOS, N. M. Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3, 5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento*, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, 2013, 29p.