

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
BACHARELADO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**MAYARA SCHEFFER**

**ISOLAMENTO DE FUNGOS PRODUTORES DE ENZIMAS  
LIGNOCELULÓSICAS EM DEPÓSITO DE RESÍDUOS DE MADEIRA  
DE PINUS SP**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**PONTA GROSSA**

**2018**

**MAYARA SCHEFFER**

**ISOLAMENTO DE FUNGOS PRODUTORES DE ENZIMAS  
LIGNOCELULÓSICAS EM DEPÓSITO DE RESÍDUOS DE MADEIRA  
DE PINUS SP**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como requisito parcial à  
obtenção do título de Bacharel em  
Engenharia Química, do Departamento de  
Engenharia Química da Universidade  
Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Silva

**PONTA GROSSA**

**2018**



Ministério da Educação  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
Campus Ponta Grossa

Nome da Diretoria  
Nome da Coordenação  
Nome do Curso



---

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

### **ISOLAMENTO DE FUNGOS PRODUTORES DE ENZIMAS LIGNOCELULÓSICAS EM DEPÓSITOS DE RESÍDUOS DE MADEIRA DE PINUS SP**

por

**MAYARA SCHEFFER**

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em 14 de novembro de 2018 como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

Prof. Dr. Márcio Silva  
Prof.(a) Orientador(a)

---

Profa. Dra. Juliana Vitória Messias Bittencourt  
Membro titular

---

Prof. Dr. Luciano Fernandes  
Membro titular

- O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Curso –

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de deixar registrado meus agradecimentos a todos que passaram pela minha vida nesses últimos seis anos e contribuíram indireta ou indiretamente para o meu desenvolvimento como pessoa e como profissional.

Primeiramente agradeço aos meus pais, Soraya e Marco, por terem me proporcionado uma vida confortável e cheia de oportunidades, o que me possibilitou concluir a universidade hoje. Obrigada pelo apoio e paciência todos esses anos e especialmente agora na reta final.

Agradeço ao meu namorado, Johnata H. Rodrigues, por toda a força que me deu, pelo conhecimento compartilhado, por todo amor, carinho e respeito. Obrigada pela nossa construção diária e por tornar minha vida mais leve.

Aos professores que fizeram parte da minha trajetória, agradeço pelos seus ensinamentos e pela marca que cada um deixou. Em especial ao meu orientador Prof. Dr. Márcio Silva, pela sabedoria e paciência com que me orientou neste projeto.

Aos amigos que são parte da família, aos melhores amigos, aos amigos de perto e aos de longe, aos amigos de infância, aos amigos que já não estão na minha vida, aos amigos que vejo de vez em quando e aos amigos que convivo diariamente, enfim, seria injusto querer escrever aqui o nome de cada um de vocês. Portanto agradeço a todos, por todo o compartilhamento e toda a força, e digo que a vida sem vocês não teria sido nada fácil.

"Que nada nos limite, que nada nos defina, que nada nos sujeite. Que a liberdade seja nossa própria substância, já que viver é ser livre."  
(Simone de Beauvoir)

## RESUMO

SCHEFFER, Mayara. **Isolamento de fungos produtores de enzimas lignocelulósicas em depósito de resíduos de madeira de *Pinus sp.*** 2018. 52 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2018.

Microrganismos tais como fungos, bactérias e leveduras são utilizados nos mais variados processos industriais, estando presente no contexto do desenvolvimento biotecnológico há alguns anos. Levando-se em conta os diferentes biomas existentes no território brasileiro decorrente da sua vasta extensão territorial e de suas condições climáticas heterogêneas, a possibilidade de encontrar novos microrganismos na natureza se mostra bastante atrativa. Desse modo, é de fundamental importância conhecer as propriedades físicas e químicas que compõem cada ecossistema para que se tenha a oportunidade de selecionar os organismos com as melhores características de acordo com a aplicação pretendida. Neste contexto, os produtores de enzimas lignocelulósicas tem um papel relevante no processo natural de ciclagem de nutrientes, onde atuam na degradação dos compostos majoritários da parede celular vegetal (celulose, hemicelulose e lignina) em compostos mais simples, que poderão ser aplicados em diversos processos. No presente trabalho, foram prospectados microrganismos em um depósito de resíduos de madeira de pinus da empresa Águia Florestal, com o intuito de isolar fungos que apresentassem resultados positivos para a produção de enzimas celulolíticas. Os resíduos foram depositados no local há mais de 20 anos, promovendo uma microbiota com elevada carga de componentes da biomassa vegetal, proporcionando as condições de nutrição necessárias para o desenvolvimento de fungos capazes de secretar enzimas do complexo lignocelulolítico. Foram coletadas 14 amostras provenientes de diferentes pontos do depósito em profundidades que variavam do nível da superfície do solo até 1,70m, num raio de aproximadamente 10 metros. O isolamento inicial foi realizado inoculando 1 g de cada amostra em placas de Petri contendo meio composto pela Solução de Manachini ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  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,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,9 g, extrato de levedura 1,0 g) acrescida de ágar e suplementada com carboximetilcelulose (CMC) 0,5% (p/v) e incubadas por 7 dias à 30°C. Após o período de incubação, as placas foram reveladas utilizando o corante Vermelho do Congo 0,1% (p/v). Das placas onde houve indícios da degradação da carboximetilcelulose foram retirados fragmentos e realizaram-se os procedimentos de repique afim de obter as cepas mais homogêneas possíveis, resultando em 8 isolados. Utilizando a técnica do *cup plate*, foram determinados os índices enzimáticos e as taxas de crescimento das 8 colônias resultando em 5 isolados com I.E. > 2,0 ao final de 24 horas de incubação à 30°C, o que os caracteriza como microrganismos promissores para aplicações biotecnológicas. As maiores taxas de crescimento foram observadas nos isolados que obtiveram os menores índices enzimáticos, A1 e B1, com uma média de 0,12 cm/dia.

**Palavras-chave:** Biomassa lignocelulósica. Fungos. Enzimas. Celulases.

## ABSTRACT

SCHEFFER, Mayara. **Isolation of fungi producers of lignocellulosic enzymes in *Pinus sp* wood residues deposit.** 2018. 52 sheets. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) - Federal Technology University - Parana. Ponta Grossa, 2018.

Microorganisms such as fungi, bacteria and yeasts are used in the most varied industrial processes, being present in the context of biotechnological development the last years. Taking into account the different biomes existing in the Brazilian territory due to its vast territorial extension and its heterogeneous climatic conditions, the possibility of finding new microorganisms in nature is very attractive. Thereby, it's of fundamental importance to know the physical and chemical properties that compose each ecosystem so that one has the opportunity to select the organisms with the best characteristics according to the intended application. In this context, the lignocellulosic enzymes producers play an important role in the natural process of nutrient cycling, where they act in the degradation of the major compounds of the vegetable cell wall (cellulose, hemicellulose and lignin) into simpler compounds that can be applied in several processes. In the present work, microorganisms were prospected in a pine wood waste deposit of the company Águia Florestal, in order to isolate fungi that had positive results for the production of cellulolytic enzymes. It has been more than 20 years since the residues were deposited at the site, promoting a microbiota with a load of vegetal biomass components, which provides the necessary nutritional conditions for the development of fungi capable of secreting enzymes of the lignocellulolytic complex. Fourteen samples from different points of the deposit were collected at depths ranging from soil surface level up to 1,70 m, within a radius of approximately 10 meters. The initial isolation was performed by inoculating 1 g of each sample into Petri plates containing Manachini's solution ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  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,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,9 g, yeast extract 1,0 g) plus agar and supplemented with 0,5% (w/v) carboxymethylcellulose (CMC) and incubated for 7 days at 30°C. After the incubation period, the plates were revealed using Congo red dye 0,1% (w/v). From the plates where there were indications of carboxymethylcellulose degradation fragments were removed and the replating procedures were performed in order to obtain the most homogeneous strains possible, resulting in 8 isolates. Using the *cup plate* technique, the enzymatic index and the growth rates of the 8 colonies were determined resulting in 5 isolates with E.I. > 2,0 at the end of 24 hours of incubation at 30°C, which characterizes them as promising microorganisms for biotechnological applications. The highest growth rates were observed in the isolates that obtained the lowest enzymatic index, A1 and B1, with a mean of 0,12 cm/day.

**Keywords:** Lignocellulosic biomass. Fungi. Enzymes. Cellulases.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – A lamela media (LM), a parede primária (PP) e as paredes secundárias com suas lamelas constituintes S1, S2 e S3 na parede celular vegetal.....	18
FIGURA 2 – Cadeia linear da celulose, formada por unidades consecutivas de celobiose.....	19
FIGURA 3 – Estrutura de uma cadeia de hemicelulose composta por xilanas.....	19
FIGURA 4 – Representação da estrutura da lignina e seus precursores.....	20
FIGURA 5 – Mecanismo de ação das enzimas sobre a estrutura da celulose.....	24
FIGURA 6 – Ação das enzimas xilanolíticas na degradação de uma molécula de xilana.....	25
FIGURA 7 – Desenho esquemático mostrando a declividade do terreno e as diferentes profundidades de coleta.....	30
FOTOGRAFIA 1 – Depósito de resíduos de madeira.....	29
FOTOGRAFIA 2 – Amostra após 7 dias de incubação a 30°C.....	33
FOTOGRAFIA 3 – Medições do ensaio <i>cup plate</i> onde A = halo de hidrólise e B = diâmetro da colônia.....	36
FOTOGRAFIA 4 – Pontos de coleta 2.1, 3.3 e 4.2 das cepas selecionadas.....	37
FOTOGRAFIA 5 – Isolados pertencentes aos Grupos 1, 2 e 3 depois de 5 dias de incubação a 30°C.....	38
FOTOGRAFIA 6 – Diâmetro da colônia do isolado B1 após 48 horas de incubação.....	42
GRÁFICO 1 – Diâmetro das colônias A1 e B1 (Grupo 1) durante os 5 dias de incubação.....	44
GRÁFICO 2 – Diâmetro das colônias A2, B2 e C2 (Grupo 2) durante os 5 dias de incubação.....	44
GRÁFICO 3 – Diâmetro das colônias A3, B3 e C3 (Grupo 3) durante os 5 dias de incubação.....	45

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Pontos de retirada de amostras e suas características principais.....	31
TABELA 2 – Composição do Meio de Cultura.....	32
TABELA 3 – Divisão dos isolados em grupos e pontos de amostragem.....	38
TABELA 4 – Resultados de índice enzimático (I.E.) para todos os isolados.....	39
TABELA 5 – Taxa de crescimento ( $T_C$ ) das colônias ao longo de 5 dias de incubação à 30°C.....	43
TABELA 6 – Resultados de índice enzimático (I.E.) e taxas de crescimento (T.C.) para todos os isolados e pontos de amostragem onde foram obtidos.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

I.E.	Índice Enzimático
CMC	Carboximetilcelulose
GP	Grau de polimerização
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LiP	Lignina peroxidase
MnP	Manganês peroxidase
PET	Politereftalato de etileno
PIB	Produto Interno Bruto
Tc	Taxa de Crescimento

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
2.1	<b>OBJETIVO GERAL</b>	<b>15</b>
2.2	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>16</b>
3.1	<b>RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS</b>	<b>16</b>
3.2	<b>COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA</b>	<b>17</b>
3.2.1	Celulose	18
3.2.2	Hemicelulose	19
3.2.3	Lignina	20
3.3	<b>BIODEGRADAÇÃO FÚNGICA</b>	<b>21</b>
3.3.1	Degradação da celulose	23
3.3.2	Degradação da hemicelulose	24
3.3.3	Degradação da lignina	25
3.4	<b>BIODEGRADAÇÃO DA MADEIRA</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>29</b>
4.1	<b>LOCAL DA COLETA</b>	<b>29</b>
4.2	<b>AMOSTRAGEM</b>	<b>30</b>
4.3	<b>PREPARO DO MEIO DE CULTIVO SELETIVO</b>	<b>31</b>
4.4	<b>ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS</b>	<b>32</b>
4.5	<b>DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DOS ÍNDICES ENZIMÁTICOS</b>	<b>34</b>
4.5.1	Crescimento em meio líquido	34
4.5.2	Determinação qualitativa dos índices enzimáticos	35
4.5.3	Avaliação da taxa de crescimento	36
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>37</b>
5.1	<b>SELEÇÃO DAS CEPAS PRODUTORAS DE CELULASE</b>	<b>37</b>
5.2	<b>DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DOS ÍNDICES ENZIMÁTICOS</b>	<b>39</b>
5.3	<b>AVALIAÇÃO DAS TAXAS DE CRESCIMENTO</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O isolamento de microrganismos com capacidade de produção de enzimas que promovem a degradação da biomassa lignocelulósica tem se mostrado relevante no contexto atual em virtude da possibilidade de empregar biocompostos em diferentes aplicações biotecnológicas, como na produção de etanol de segunda geração, na biopolpação da celulose e na biorremediação de efluentes industriais (AGUIAR; FERRAZ, 2011; MENEZES; BARRETO, 2015; ORLANDELLI et al., 2012).

A utilização de enzimas promove benefícios aos processos por possuírem alta especificidade e pelo seu caráter ambientalmente sustentável. Pois, além de abrirem espaço para o uso de fontes inovadoras de matéria-prima (principalmente através do reaproveitamento de resíduos) e promoverem a otimização de processos industriais, as enzimas microbianas possuem ainda um grande potencial de biorremediação (MONTEIRO; SILVA, 2009; OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009).

Estudos acerca da degradação de compostos potencialmente prejudiciais ao meio ambiente tem sido conduzidos na última década com o intuito de resolver problemas que geram preocupação em todo o mundo, como por exemplo, o uso extensivo de plástico. Em 2015, pesquisadores japoneses isolaram uma nova bactéria capaz de produzir enzimas que promovem a hidrólise do politereftalato de etileno (PET) convertendo-o em monômeros que são inofensivos ao meio ambiente (YOSHIDA et al., 2016).

Embora apresente uma série de vantagens, o uso de enzimas em aplicações tecnológicas ainda encontra uma série de barreiras para o seu desenvolvimento, principalmente no que diz respeito ao custo e às condições brandas a que serão submetidas em determinados processos (MONTEIRO; SILVA, 2009). Neste contexto, os estudos conduzidos acerca de obtenção, isolamento e purificação destes compostos são de fundamental importância para que num futuro próximo seja possível produzi-los de forma econômica em larga escala.

Nos últimos anos a indústria madeireira tem buscado nas enzimas uma saída para o problema da geração de tocos de madeira provenientes dos processos de corte. Dependendo do gênero da árvore e das características da região de plantio, estes materiais podem levar mais de 20 anos para se degradarem completamente (NEGRÃO, 2011). Deste modo, a presença desses tocos em

extensas áreas de plantio constitui complicações no uso dos maquinários envolvidos no processo de silvicultura e no preparo do solo para um posterior plantio, além de dificultarem uma possível mudança de cultura (COSTA, 2014; FOELKEL, 2014).

A destoca mecânica é o procedimento já difundido para a remoção dos tocos, contudo, apresenta desvantagens em relação ao custo elevado e ao prejuízo ambiental que acarreta, removendo nutrientes do solo e acelerando o processo de erosão (FOELKEL, 2014). Outra alternativa consiste na destoca química, processo que utiliza herbicidas que impedem o rebroto do toco (no caso do eucalipto), facilitando o processo de degradação. Porém, este método acarreta impactos ambientais negativos por promover a contaminação do ecossistema a partir do processo de lixiviação (SPADOTTO; GOMES, 2013). Deste modo, a destoca biológica apresenta uma alternativa técnica e economicamente viável que impulsiona a busca por indivíduos capazes de acelerar o processo natural de degradação (ALONSO et al., 2007).

Dentre os microrganismos que participam da degradação natural dos constituintes da biomassa vegetal (celulose, hemicelulose e lignina) tem-se que os fungos possuem uma maior capacidade de produção de enzimas lignocelulósicas, se comparado com bactérias. Isto porque se adaptam a variadas fontes de carbono e nitrogênio, possibilitando que estejam presentes em nichos ecológicos bastante diferenciados, como solos ou madeira (ARANTES; MILAGRES, 2009; MARTINS, 2012; PIRES, 2013).

Diante do exposto, o isolamento de fungos produtores de enzimas lignocelulósicas provenientes do meio ambiente se mostra uma ferramenta útil na busca por microrganismos que apresentem características favoráveis ao processo de degradação da biomassa vegetal. A possibilidade de aplicação de inóculos compostos por uma microbiota selecionada em tocos de madeira pode contribuir para um aperfeiçoamento do processo que envolve a destoca das árvores e o preparo do solo, gerando não só ganhos econômicos por não envolver a utilização de maquinários específicos, como também ganhos ambientais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo realizar o isolamento de fungos em um depósito de resíduos de madeira de *Pinus sp.*

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Efetuar o isolamento das linhagens fúngicas com base na capacidade de produção de celulases;
- Avaliar a produção de enzimas celulolíticas pelos microrganismos isolados por crescimento em placas;
- Determinar qualitativamente o potencial de degradação de celulose de cada isolado através dos índices enzimáticos;
- Determinar as taxas de crescimento dos fungos isolados.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

O emprego de materiais lignocelulósicos como fontes renováveis de matéria-prima para os mais diversos fins, principalmente na produção de combustíveis de segunda geração, apresenta uma elevada importância no contexto energético atual uma vez que o Brasil produz quantidades abundantes tanto de resíduos agroindustriais quanto de resíduos florestais (SOUZA, 2015). O acúmulo destes resíduos se apresenta muitas vezes como um agente de deterioração do meio ambiente além de um desperdício de recursos, tornando a sua aplicação em novos processos uma alternativa que pode aumentar o seu valor agregado (MENEZES; BARRETO, 2015).

Outro problema relacionado a geração de resíduos lignocelulósicos ocorre na indústria madeireira, pois esta produz uma quantidade excessiva de cepas e tocos de madeira resultantes do processo de corte, dificultando o preparo das áreas para um posterior plantio. Geralmente, a retirada destes materiais é realizada por destoca mecânica, porém este processo provoca danos ao meio ambiente, compactando e danificando a estrutura do solo, além de possuir elevados custos (ALONSO et al., 2007; COSTA, 2014).

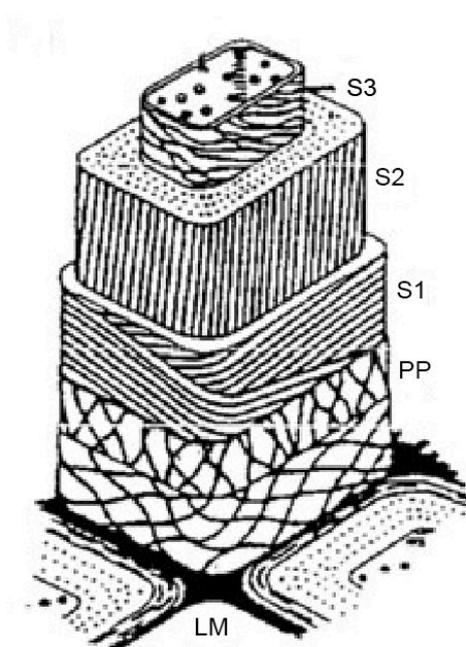
A biodegradação natural da madeira pode levar muito tempo dependendo da região em que os tocos se encontram. A destoca biológica, que consiste na utilização de agentes biológicos externos que promovam uma aceleração no processo degradativo destes materiais, é uma alternativa atrativa (ALONSO et al., 2007). As enzimas de origem microbiana, principalmente as produzidas por fungos, apresentam papel de destaque, atuando como catalisadores biológicos altamente seletivos e específicos nos processos de degradação dos componentes da biomassa lignocelulósica (SOUZA, 2015).

### 3.2 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biomassa lignocelulósica é formada, predominantemente, por três tipos de polímeros: celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é o componente que aparece em maior quantidade (30-60%), seguida da hemicelulose (20-40%) e da lignina (10-25%), além de uma pequena quantidade de extrativos (KUMAR; GAUTAM; DUTT, 2016; MCKENDRY, 2002). Estes compostos são unidos fortemente dentro da estrutura da biomassa por meio de ligações não-covalentes e por ligações cruzadas covalentes. A composição e a porcentagem de cada um destes compostos pode variar de espécie para espécie, do clima e das condições de crescimento (HARGREAVES, 2008).

Segundo Fengel e Wegener (1989, apud MARTINS, 2005) a distribuição desses polímeros nas camadas interiores da parede celular vegetal é variável, sendo que a camada denominada de lamela média, que confere resistência à estrutura, é constituída quase que inteiramente por lignina. Além dessa estrutura, tem-se a parede primária, que é uma camada delgada, permeável e flexível, constituída majoritariamente por celulose e hemicelulose e uma quantidade pequena de lignina, e a parede secundária, dividida em três lamelas,  $S_1$ ,  $S_2$  e  $S_3$  como mostrado na Figura 1.

De acordo com Pérez et al. (2002), tanto a celulose quanto a hemicelulose são macromoléculas formadas por diferentes açúcares, a lignina difere destas em sua constituição, já que se trata de um polímero aromático sintetizado a partir de precursores de fenilpropanóides. Além destes componentes, a parede primária é permeada por pectina, polissacarídeo altamente hidrofílico, e ainda podem ser encontrados componentes como extrativos polares (fenóis e taninos), extrativos apolares (óleos e esteróis) e componentes solúveis (açúcares, amido e proteínas) na estrutura da parede celular vegetal (MARTINS, 2012).



**Figura 1 – A lamela média (LM), a parede primária (PP) e as paredes secundárias com suas lamelas constituintes S1, S2 e S3 na parede celular vegetal**

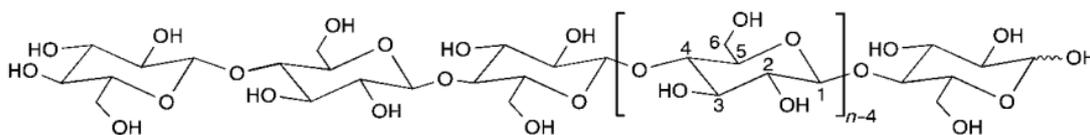
**Fonte: Adaptado de Klemm et al. (2005)**

### 3.2.1 Celulose

Entende-se por celulose a fração do material lignocelulósico formada por várias unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1-4) formando moléculas do dissacarídeo celobiose, como mostra a Figura 2 (MALLAGUTTI, 2015). As longas cadeias de celulose, também chamadas de fibrilas elementares, são formadas pela união de várias moléculas de celobiose por meio de ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1-4). Para formar a fibra, essas longas cadeias de celulose se ligam através de ligações de hidrogênio. Além disso, a celulose apresenta fases cristalinas e amorfas, sendo que a fase amorfa será mais suscetível a hidrólise (BASSO, 2010; MARTINS, 2005).

O grau de polimerização (GP) da cadeia de celulose representa o número de unidades de glicose que a formam, variando de acordo com a fonte, o grau de maturação da parede celular, o processamento que as fibras foram submetidas e o seu envelhecimento. Como exemplo, pode-se citar o GP da madeira que é de 2500

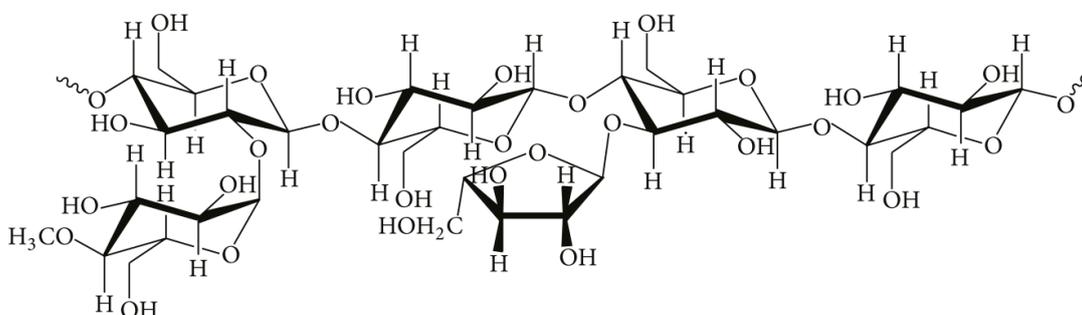
unidades, enquanto que para o algodão esse número chega a 11000 unidades (MARTINS, 2005; TÍMAR-BALÁZSY; EASTOP, 1998).



**Figura 2 – Cadeia linear da celulose, formada por unidades consecutivas de celobiose**  
**Fonte: Klemm et al. (2005)**

### 3.2.2 Hemicelulose

As hemiceluloses são compostas por heteropolissacarídeos complexos. Possuem uma cadeia principal da qual partem várias ramificações e cadeias laterais constituídas de diferentes açúcares, estas interagem com a celulose possibilitando a estabilidade e a flexibilidade ao agregado (SÁNCHEZ, 2009). A cadeia principal pode ser composta por glicanas, mananas, arabinanas e xilanas, sendo que as xilanas aparecem em maior quantidade. Elas são constituídas de unidades de D-xilopiranosil unidas por ligações  $\beta$ -(1-4) (SANTOS, 2008). Dentre os substituintes presentes nas suas moléculas pode-se citar os seguintes açúcares: D-glucose, D-galactose, L-arabinose, D-xilose, D-manose, 4-O-metil-D-glucurônico e L-ramnose, e são unidos por ligações  $\beta$ -(1-4) ou  $\beta$ -(1-3)-glicosídicas (MARTINS, 2005). A Figura 3 mostra a estrutura das xilanas.

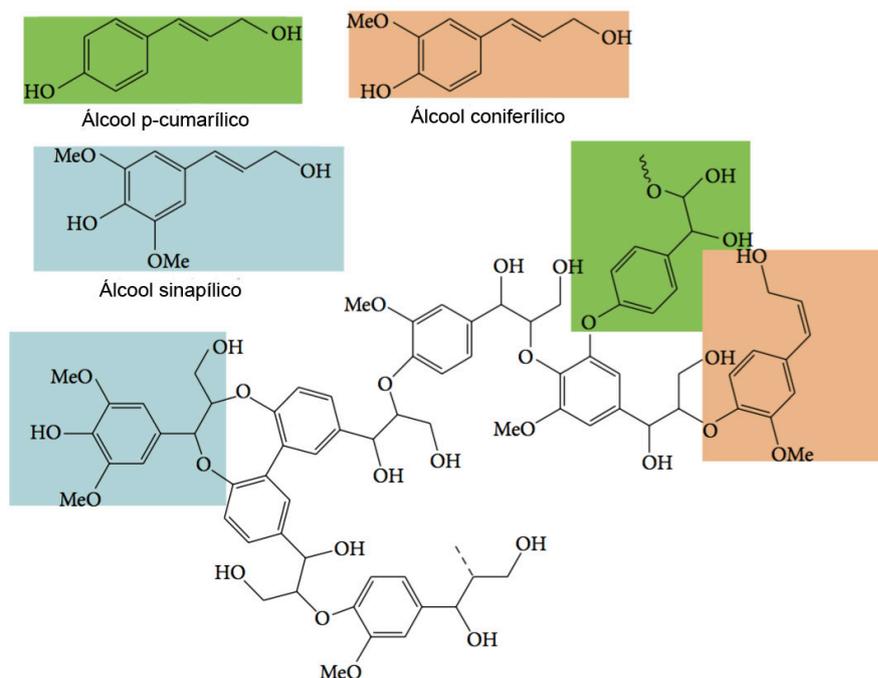


**Figura 3 – Estrutura de uma cadeia de hemicelulose composta por xilanas**  
**Fonte: Adaptado de Lee et al. (2014)**

### 3.2.3 Lignina

A lignina é o constituinte responsável por conferir suporte estrutural, força, impermeabilidade, resistência contra ataques microbianos e estresse oxidativo à parede celular vegetal das plantas. Ela está ligada de forma covalente a hemicelulose, o que resulta em um caráter recalcitrante na estrutura molecular da parede, impedindo o acesso de agentes que promovam a degradação da celulose (FACUNDES, 2014; MENEZES; BARRETO, 2015).

A lignina é constituída por um complexo fenólico unido por diferentes tipos de ligações disposto em uma rede tridimensional e exibe conformação amorfa, é altamente hidrofóbica e opticamente inativa. Sua estrutura é constituída por unidades fenilpropanóides as quais podem ser dimetoxiladas (álcool sinapílico – S), monometoxiladas (álcool coniferílico – G) ou não apresentar metoxilação (álcool p-cumarílico – H). Estes precursores são mostrados na Figura 4 (MARTINS, 2012; PÉREZ et al., 2002).



**Figura 4 – Representação da estrutura da lignina e seus precursores**

Fonte: Adaptado de Lee et al. (2014)

Devido à sua estrutura ser bastante complexa, os estudos acerca da degradação da lignina são de extrema importância, pois ela representa o maior obstáculo na hidrólise dos componentes hemicelulolíticos, dificultando o aproveitamento destes carboidratos (FACUNDES, 2014).

### 3.3 BIODEGRADAÇÃO FÚNGICA

De acordo com Aguiar & Ferraz (2011), a parede celular dos vegetais possui uma grande barreira ao processo de biodegradação, devido ao fato de que a associação entre seus componentes juntamente a existência de uma camada fina rica em lignina entre as células, que constitui a lamela média, resulta em uma ultraestrutura que é capaz de impedir a infiltração de várias moléculas. Os sistemas enzimáticos envolvidos na degradação de materiais lignocelulósicos devem, portanto, ser bastante desenvolvidos e específicos, permitindo que haja a desestruturação da parede celular e a despolimerização desses componentes.

Os fungos fazem parte de um grupo bastante diversificado e numeroso de microrganismos, podendo ser facilmente encontrados na natureza, em solos, vegetais e até mesmo em animais (ANDRADE, 2015). Fazem parte do reino Fungi e são seres que compartilham das seguintes características: serem eucarióticos, portadores de esporos e heterotróficos (ou seja, que se alimentam da absorção dos nutrientes).

Podem ainda ser saprofíticos, parasitas ou biotróficos, mas não possuem clorofila em sua estrutura e se reproduzem tanto de forma sexuada quanto assexuada, além de poderem realizar recombinação gênica. A maioria dos fungos são filamentosos, mas eles podem ter morfologias e ciclos bastante variados, podendo ser uni ou pluricelulares. A atuação deles é imprescindível para a vida terrestre pois participam ativamente da reciclagem de diversos nutrientes (PINTO, 2006).

Dentre os diferentes tipos de fungos, os filamentosos são os que apresentam maior relevância biotecnológica uma vez que estão presentes em vários ecossistemas, possuem crescimento bastante rápido e precisam de meios de cultura relativamente simples para sua produção em condições facilmente controladas. O conhecimento da microbiota em que estes microrganismos estão inseridos é de

fundamental importância pois assim é possível inferir quais processos metabólicos ocorrem para que sejam utilizados posteriormente em interações ambientais ou aplicações biotecnológicas (ROSA, 2014).

Estes organismos realizam a degradação da madeira de forma estritamente extracelular, já que o processo se inicia através da penetração das hifas fúngicas através do lúmen das células vegetais, secretando uma grande quantidade de metabólitos extracelulares (enzimas, principalmente). Estas, por sua vez, irão degradar os componentes da parede celular da madeira em moléculas menores, podendo então ser assimiladas pela membrana plasmática e metabolizada pelo fungo (ARANTES; MILAGRES, 2009; CARVALHO et al., 2009).

As enzimas são componentes que atuam como catalisadores biológicos em diversas reações de forma bastante específica e eficaz. Além disso, o uso das enzimas para a síntese de compostos com alto valor agregado é bastante difundido nas diferentes áreas da tecnologia pois apresentam baixo impacto ambiental por serem biodegradáveis e minimizarem efeitos indesejáveis pela sua alta especificidade (FLORENCIO, 2011). A degradação da parede celular vegetal também será auxiliada pela participação expressiva de compostos de baixa massa molecular resultantes do metabolismo fúngico, como por exemplo, ácido oxálico e ácido linoléico (ARANTES; MILAGRES, 2009).

Através das técnicas de isolamento e seleção de microrganismos é possível encontrar na natureza uma vasta quantidade de fungos que produzem variados tipos de enzimas. Sendo que os fungos produtores de enzimas celulolíticas ocorrem mais comumente no ecossistema do solo (FACUNDES, 2014). É essencial conhecer os fatores químicos e físicos presentes no ambiente pois estes influenciam diretamente na existência de determinadas espécies, já que os microrganismos necessitam de condições específicas para o seu desenvolvimento (ANDRADE, 2015; SOUZA, 2015; WAGG et al., 2014).

O principal objetivo do isolamento torna-se, portanto, explorar estes compostos biológicos que ocorrem naturalmente no meio ambiente, geralmente em locais que possuem grande biodiversidade, fato que torna o Brasil um expoente neste sentido já que apresenta vasta disposição de ambientes com variadas condições ambientais (SILVA, 2014).

### 3.3.1 Degradação da celulose

Os microrganismos envolvidos na hidrólise enzimática da celulose produzem uma vasta quantidade de enzimas que trabalham sinergicamente na biodegradação mas possuem diferentes mecanismos de ação. As principais delas são as enzimas endoglucanases; exoglucanases e  $\beta$ -glicosídeos (PRASAD; SINGH; JOSHI, 2007; SOUZA, 2015).

As endoglucanases são as enzimas que iniciam a hidrólise atacando as regiões internas da fase amorfa da celulose de forma aleatória liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização e originando novos terminais que serão atacados pelas exoglucanases posteriormente (BASSO, 2010). As exoglucanases também conhecidas como celobiohidrolases, podem hidrolisar regiões altamente cristalinas da celulose, além das regiões amorfas. Elas atuam removendo monômeros e dímeros nas extremidades da cadeia de glicose que ficaram expostas pela ação das endoglucanases, gerando glicose ou celobiose (PÉREZ et al., 2002).

As  $\beta$ -glicosídeses atuam como fator limitante do processo de biodegradação da celulose e são essenciais para que se tenha um processo eficiente. Elas apresentam a capacidade de quebrar as moléculas de celobiose e oligossacarídeos de menor grau de polimerização liberando moléculas de glicose, que serão facilmente absorvidas pelo metabolismo fúngico (FACUNDES, 2014; ROSA, 2014).

Dentre as várias espécies de fungos presentes na natureza, destacam-se como bons produtores de enzimas celulolíticas os fungos *Aspergillus niger*, *Trichoderma reseei*, *Penicillium echinolatum* e *Fusarium oxysporum* (SOUZA, 2015). Além de possuírem um importante papel na indústria dos biocombustíveis, as celulases são utilizadas em diversos processos, como na produção de rações para animais ruminantes, na formulação de detergentes e na desengomagem têxtil (FACUNDES, 2014).

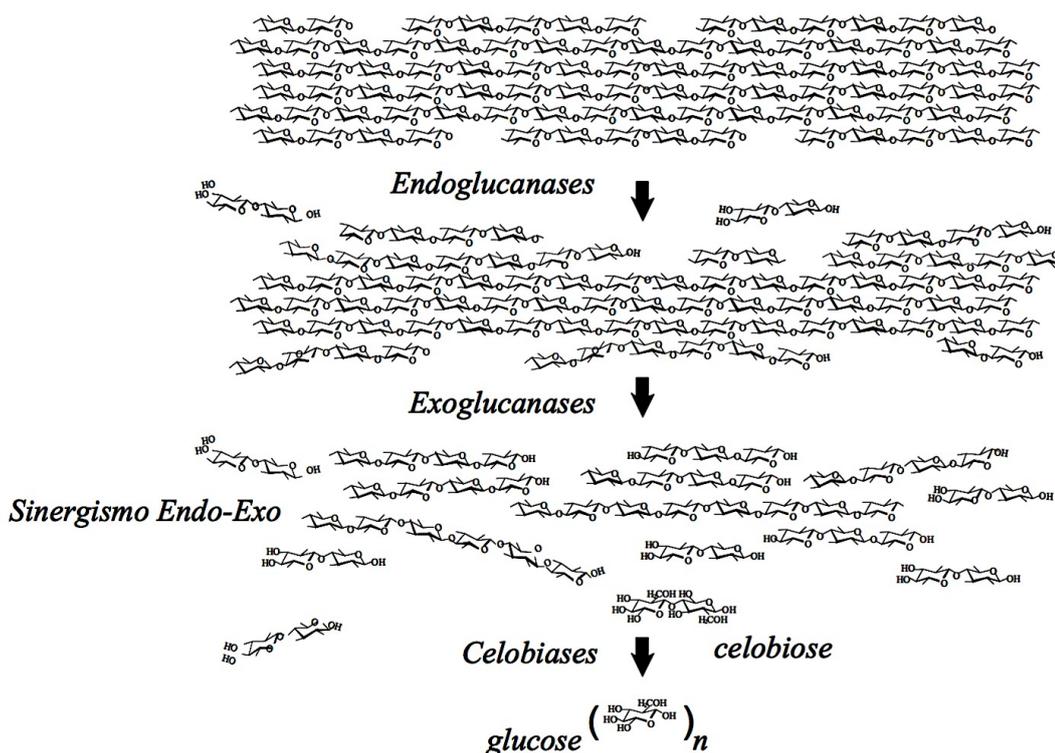


Figura 5 – Mecanismo de ação das enzimas sobre a estrutura da celulose

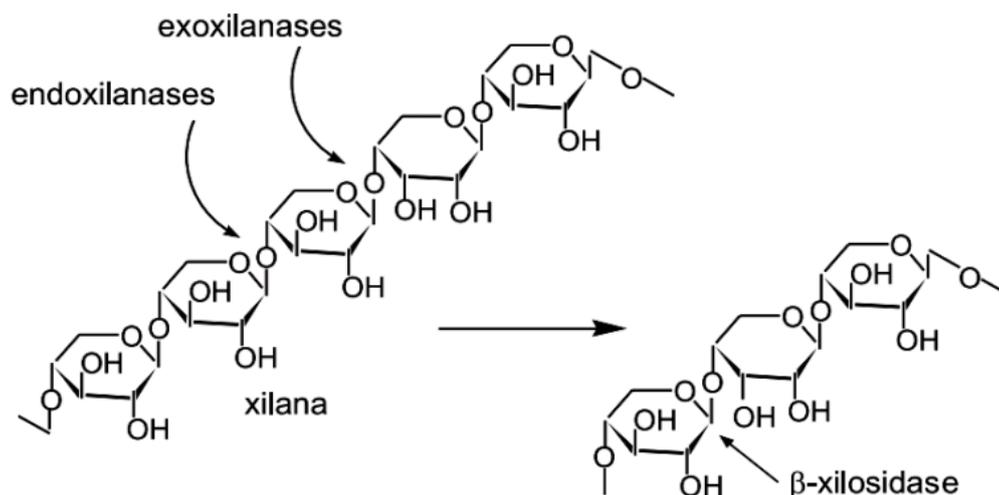
Fonte: Martins (2005)

### 3.3.2 Degradação da hemicelulose

As enzimas hemicelulolíticas são responsáveis por hidrolisar os diferentes polissacarídeos que compõem a estrutura da hemicelulose, as principais delas são a glucuronidase, acetilesterase, xilanase,  $\beta$ -xilosidase, galactomananos e glucomanano. Como as xilanas são os componentes que mais aparecem na estrutura das hemiceluloses, as xilanases microbianas são as enzimas mais relevantes na hidrólise desses compostos (ALMEIDA, 2012).

Devido à sua estrutura ramificada, para que a hidrólise das hemicelulose seja completa é necessário que os componentes das enzimas xilanolíticas atuem com diferentes mecanismos de ação hidrolisando tanto a cadeia principal quanto as cadeias laterais, como mostra a Figura 6. As responsáveis pela hidrólise das cadeias principais são as endo- $\beta$ -1,4-xilanases, que atacam a cadeia de forma aleatória liberando xilo-oligossacarídeos, e as  $\beta$ -xilosidases, que hidrolisam a

xelobiose e outros pequenos compostos, a partir das extremidades, liberando xilose. Já as exo- $\beta$ -1,4-xilanases degradam os oligossacarídeos menores, liberando também a xilose (PIRES, 2013; SOUZA, 2015).



**Figura 6 – Ação das enzimas xilanólíticas na degradação de uma molécula de xilana**  
**Fonte: Souza (2015)**

Pode-se citar como bons produtores de enzimas xilanólíticas os fungos pertencentes às espécies *Aspergillus oryzae*, *Mucor sp* e *Trichoderma viride* (PIROTA et al., 2015; SOUZA, 2015).

### 3.3.3 Degradação da lignina

A lignina, ao contrário do que acontece com a celulose e a hemicelulose, será degradada através de um mecanismo de oxidação. O conjunto de enzimas ligninolíticas empregadas nesse processo incluem as peroxidases, constituídas pela lignina peroxidase (LiP) e pela manganês peroxidase (MnP), dependente de manganês, que atuam na oxidação de subestruturas da lignina em presença de peróxido de hidrogênio. Já as fenoloxidasas, onde estão as lacases e as tirosinases, oxidam as subunidades fenólicas da estrutura formando radicais fenoxilas que são compostos orgânicos de baixa massa molecular (ARANTES; MILAGRES, 2009; TEIXEIRA et al., 2011).

Os principais produtores de enzimas ligninolíticas são os fungos basidiomicetos, também conhecidos como fungos de podridão branca (*white-rot fungi*). Estes organismos podem mineralizar a lignina em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O pela ação de peroxidases e lacases (FACUNDES, 2014). Pode-se citar os fungos das espécies *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* e *Geastrum subiculosum* como bons produtores de enzimas ligninolíticas, podendo ser utilizados em aplicações como modificação de biopolímeros, biorremediação de efluentes e deslignificação de polpas na indústria do papel (FILHO, 2008; SANTANA et al., 2016).

### 3.4 BIODEGRADAÇÃO DA MADEIRA

A atividade florestal no Brasil corresponde a aproximadamente 3,5% do produto interno bruto (PIB) no ano de 2010. O setor tem como características a existência de plantios florestais de rápido crescimento, principalmente das espécies dos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus sp* (VIDAL et al., 2015). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2015), a produção de madeira em tora para papel e celulose em 2015 foi de 76,8 milhões de m<sup>3</sup>, sendo que aproximadamente 83% se origina de plantios de eucaliptos.

O estado do Paraná possui uma produção de madeira de pinus bastante significativa, correspondendo a 72,3% da produção em 2015. Tratando-se da madeira em tora para outras finalidades, a produção foi de 47,2 milhões de m<sup>3</sup>, apresentando um decréscimo de 9,1% em relação ao ano de 2014. Estima-se que são gerados no país anualmente uma quantia próxima de 30 milhões de toneladas de resíduos de madeira, sendo que a indústria madeireira é a principal fonte, contribuindo com 91% dos resíduos (TUOTO, 2009).

A geração de resíduos da madeira, se não forem bem reaproveitados, acarretam em diversos prejuízos financeiros e ambientais (SILVA, 2011). De acordo com Wiecheteck (2009), os principais destinos para os resíduos da madeira podem ser agrupados nas seguintes categorias: uso como matéria-prima para produtos de maior valor agregado; reuso ou reciclagem; e fins energéticos, como para combustão direta e incineração, gaseificação, briquetagem/pelletização ou pirólise.

Nesse contexto, o acúmulo de tocos provenientes dos processos de corte das indústrias madeireiras acarreta na geração de uma grande quantidade de

resíduos de madeira que não podem ser reaproveitados e acabam causando problemas para a atividade de silvicultura, dificultando o uso de maquinário nos plantios (FOELKEL, 2014).

A biodegradação da madeira por fungos ocorre devido às células vegetais serem constituídas por polímeros naturais (celulose, hemicelulose e lignina) que servem como fontes de nutrição para esses organismos, os quais degradam estes compostos através da ação das enzimas em unidades que serão passíveis de ser digeridas pelo metabolismo fúngico (OLIVEIRA; TOMASELLO; SILVA, 2005).

A utilização de fungos para acelerar o processo de degradação em cepas e raízes surge como uma alternativa que apresenta benefícios ao setor florestal se comparado com os processos mais tradicionais de destoca, como a destoca mecânica ou a destoca química. A vantagem do uso de microrganismos que promovam esse apodrecimento acelerado reside na redução da influência negativa dos tocos e na contribuição com a sustentabilidade das florestas plantadas, já que os nutrientes permanecerão no local do plantio (ALONSO et al., 2007).

Durante a degradação, a madeira passa por inúmeras alterações físicas, químicas e morfológicas em sua estrutura e de acordo com o tipo de degradação que os fungos promovem, diferentes características serão observadas na madeira ao final do processo degradativo. Em função destas características, são propostas três principais classes de degradação ou podridão: branca, parda e branda (MENEZES, 2013; PRASAD; SINGH; JOSHI, 2007).

Os principais fungos causadores de podridão branca (*white-rot fungi*) pertencem a classe dos basidiomicetos, os quais são os maiores responsáveis pela degradação de componentes da madeira. Podem-se citar as espécies *Polyporus fumosus*, *Trametes versicolor* e *Polyporus sanguineus* como exemplos (COSTA, 2014; PINTO, 2006).

O mecanismo de ação dos fungos de podridão branca começa pelo ataque na superfície da parede celular vegetal e estes tem capacidade de degradar os seus três principais componentes: celulose, hemicelulose e lignina. A degradação da biomassa lignocelulósica pode ocorrer de duas maneiras distintas. A mais comum é denominada de decomposição branca simultânea e promove a remoção tanto dos carboidratos quanto da lignina. Através da qual se verifica uma erosão progressiva da parede celular no sentido lúmen-lamela média, o que provoca uma diminuição de

forma sucessiva e irregular da espessura da parede. Já a segunda forma é chamada de decomposição branca seletiva, envolvendo a remoção da lignina e das polioses, deixando a celulose praticamente intacta. Porém esta acontece com menor frequência. A podridão branca recebe este nome pois a madeira apresenta um aspecto esbranquiçado e rompe-se facilmente no sentido das fibras ao ser atacada (MENEZES, 2013; SILVA, 2014).

Os fungos de decomposição parda (*brown-rot fungi*) atuam na degradação das frações polissacarídicas da parede celular (celulose e hemicelulose) e causam mínimas alterações na lignina. Por conta da deterioração a madeira perde sua resistência mecânica e surgem fissuras no sentido transversal e ao final do processo apresenta um aspecto pardo-escuro devido a lignina permanecer praticamente intacta. A maior parte dos fungos que provocam esse tipo de degradação não são capazes de decompor a estrutura da celulose isolada, mas sim quando ela está em presença de hemicelulose (PINTO, 2006; SILVA, 2014).

Assim como no caso da podridão branca, a podridão parda é causada por fungos basidiomicetos, como por exemplo as espécies *Postia placenta*, *Neolentinus lepideus* e *Gloeophyllum trabeum* (COSTA, 2014).

Já a podridão branda (*soft-rot fungi*) é caracterizada principalmente pela degradação da celulose e da hemicelulose, promovendo poucas modificações na lignina, contudo ocorre de maneira mais lenta se comparada aos outros tipos de podridão. Geralmente afeta a superfície externa da madeira e o seu ataque é facilitado nas situações em que a madeira se encontra úmida, concedendo a ela uma coloração que varia de cinza a marrom. Os fungos que causam a podridão branda pertencem às classes Ascomicetos e Deuteromicetos e possuem um mecanismo de ação diferenciado, crescendo dentro da parede celular dos vegetais (COSTA, 2014; MENEZES, 2013).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 LOCAL DA COLETA

A biodegradação de resíduos de madeira por meio da ação de microrganismos se trata de um processo natural de reciclagem de matéria orgânica. A motivação de realizar o isolamento em um depósito de resíduos de madeira deve-se ao fato de que esse ambiente apresenta um substrato rico em componentes que caracterizam a biomassa lignocelulósica. Sendo este um substrato ideal para o crescimento de colônias fúngicas que tem potencial de aplicação na destoca biológica de tocos de materiais lenhosos, devido ao fato que utilizam desse substrato como fonte principal de nutrição (ARANTES; MILAGRES, 2009; BONFIM; RODRIGUES, 2015).



**Fotografia 1 – Depósito de resíduos de madeira**

**Fonte: Autoral (2017)**

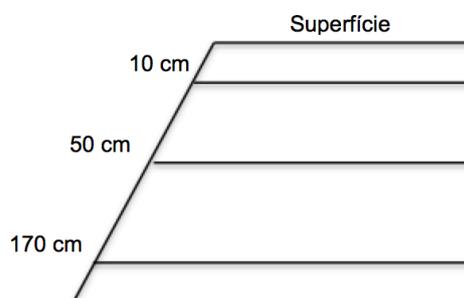
O depósito onde foi realizada a coleta está localizado em um terreno da empresa Águia Florestal que atua na região dos Campos Gerais, no Paraná, realizando o plantio e a industrialização da madeira do pinus. O depósito de resíduos encontra-se em um local com alta declividade e exposto a céu aberto. A constituição do mesmo é formada não somente por serragem, mas também por cascas e pedaços de madeira, já que na época em que os resíduos foram ali depositados (cerca de 20 anos atrás) não havia máquinas que promovessem a separação dos diferentes resíduos resultantes do processamento da madeira na

instituição. Hoje a região caracteriza-se não mais como um depósito de serragem uma vez que já se encontra totalmente tomada pela vegetação, como mostra a Fotografia 1.

#### 4.2 AMOSTRAGEM

A coleta das amostras foi realizada no dia 30 de agosto de 2017 no depósito de resíduos de madeira localizado dentro da propriedade da empresa Águia Florestal em Itaiacoca, Paraná, a 42 km do centro de Ponta Grossa, com coordenadas 25°10'06.4"S 49°51'57.3"W.

Ao todo foram coletadas 14 amostras com aproximadamente 200 g de material de sete diferentes pontos em profundidades que variaram do nível da superfície do solo até 1,70 m num raio de aproximadamente 10 metros. A Figura 7 a seguir apresenta um desenho esquemático do terreno:



**Figura 7 – Desenho esquemático mostrando a declividade do terreno e as diferentes profundidades de coleta**

**Fonte: Autoral (2018)**

Foi utilizado um trado de coleta para retirar material abaixo da superfície e mediu-se a altura com o auxílio de uma trena. As amostras foram coletadas utilizando espátulas e foram acondicionadas em tubos Falcon de 50 mL previamente identificados, a temperatura foi aferida com um termômetro a cada retirada de amostra. Todo o material utilizado foi esterilizado anteriormente ao momento da coleta e entre uma amostra e outra os materiais foram esterilizados usando um maçarico. As amostras foram acondicionadas em geladeira até que se procedesse o procedimento de isolamento dos microrganismos.

Em alguns dos pontos estabelecidos não foi possível chegar a profundidades maiores do que 50 cm, devido a limitações do equipamento utilizado e a limitações do próprio terreno, já que em muitos desses pontos a altura da deposição de resíduos de madeira não ultrapassava 50 cm de profundidade. Na Tabela 1 a seguir são descritos todos os pontos de coleta e as características do solo em cada ponto.

**Tabela 1 – Pontos de retirada de amostras e suas características principais**

PONTO	PROFUNDIDADE	TEMPERATURA	CARACTERÍSTICAS
1.1	10 cm	24°C	Resíduos de madeira
1.2	50 cm	26°C	Resíduos de madeira
1.3	100 cm	27°C	Resíduos de madeira
2.1	10 cm	23,5°C	Resíduos de madeira
2.2	50 cm	21°C	Resíduos de madeira
2.3	50 cm	21°C	Solo abaixo da deposição
3.1	10 cm	24°C	Resíduos de madeira
3.2	50 cm	25°C	Solo abaixo da deposição
3.3	50 cm	25°C	Solo abaixo da deposição
4.1	Pouco abaixo da superfície	27°C	Resíduos de madeira
4.2	Superficial	27°C	Resíduos de madeira, mais seco
5.1	170 cm	30°C	Solo abaixo da deposição
6.1	Superficial	27°C	Resíduos de madeira
7.1	Superficial	27°C	Resíduos de madeira

**Fonte: Autoral (2018)**

#### 4.3 PREPARO DO MEIO DE CULTIVO SELETIVO

O meio de cultura sólido utilizado para o isolamento de microrganismos produtores de celulasas foi composto pela Solução de Manachini acrescida de ágar (MANACHINI; FORTINA; PARINI, 1987) suplementado com carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono numa concentração de 0,5% (p/v), seguindo a composição disposta na Tabela 2 para 1000 mL de solução. Para que houvesse a completa solubilização dos reagentes e da carboximetilcelulose (CMC) em água a solução foi preparada utilizando um agitador magnético provido de aquecimento (máximo de 60°C), como sugere Teixeira et al. (2011).

**Tabela 2 – Composição do Meio de Cultura**

<b>Composto</b>	<b>Quantidade</b>
Fosfato monopotássico – $\text{KH}_2\text{POH}_4$	2,0 g
Sulfato de amônio – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0 g
Sulfato de magnésio heptahidratado – $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
(Mono) hidrogeno fosfato de sódio bihidratado – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,9 g
Extrato de levedura	1,0 g
Ágar	18,0 g
Carboximetilcelulose	5,0 g

**Fonte: Teixeira et al. (2011)**

Alguns trabalhos encontrados na bibliografia envolvendo isolamento e seleção de microrganismos produtores de enzimas celulases utilizaram o mesmo meio de cultivo, obtendo bons resultados (BEZERRA, 2017; BONFIM; RODRIGUES, 2015; SANTOS et al., 2013; SOUZA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2008).

Após o preparo do meio o pH foi corrigido para 5,0, valor recomendado ao se utilizar a carboximetilcelulose como substrato, usando uma solução tampão de acetato de sódio (SOUZA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2008). Uma vez estabilizado o pH, o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos (TEIXEIRA et al., 2011).

O meio de cultivo foi distribuído em placas de Petri formando uma lâmina de aproximadamente 8 mm utilizando a Câmara de Fluxo Laminar Vertical, garantindo um ambiente estéril para evitar possíveis contaminações. As placas foram mantidas a temperatura ambiente por alguns minutos para promover a solidificação do meio e então foram acondicionadas na geladeira até a etapa de inoculação das amostras.

#### 4.4 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

A inoculação foi realizada pesando-se uma quantidade de cerca de 1 g de cada amostra e colocando-as diretamente nas placas contendo o meio de cultura, espalhando uniformemente por toda a placa usando uma Alça de Drigalsk (LUZ et al., 2016), como pode ser observado na Fotografia 2. As placas foram incubadas em estufa a temperatura de 30°C, na ausência de luz, por um período de 7 dias (HARGREAVES, 2008).



**Fotografia 2 – Amostra após 7 dias de incubação a 30°C**  
**Fonte: Autoral (2017)**

Após o crescimento das colônias, as placas foram reveladas utilizando a técnica de revelação da atividade enzimática, sugerida por Kasana et al., (2008) para identificação dos microrganismos produtores de celulases. Para tanto, foi preparada uma solução do corante Vermelho do Congo a 0,1% (p/v) e adicionou-se 10 mL em cada placa, de forma que o meio ficasse completamente submerso. Depois de 20 minutos de reação, na ausência de luz, a solução foi retirada e as placas foram lavadas com solução de NaCl 1,0 M, aguardando novamente por 20 minutos antes de descartar (NEGRÃO, 2011; PINTO et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2011).

Em seguida, foram retirados fragmentos das colônias nas quais se verificava a presença de halos translúcidos de hidrólise e inoculados em novas placas de Petri contendo o mesmo meio de cultivo descrito anteriormente, fazendo a incubação por 5 dias à 30°C em estufa na ausência de luz, procedimento denominado “repique” (BONFIM; RODRIGUES, 2015; SILVA et al., 2015).

Ao final de cada período de crescimento, repetia-se novamente a revelação com corante Vermelho de Congo afim de retirar fragmentos apenas das colônias que evidenciassem a degradação da carboximetilcelulose. Estes procedimentos foram repetidos até que fosse possível identificar visualmente, com base na morfologia, a presença de apenas um tipo de microrganismo isolado (ROMANO, 2015; TEIXEIRA et al., 2011).

## 4.5 DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DOS ÍNDICES ENZIMÁTICOS

A determinação qualitativa dos índices enzimáticos foi realizada utilizando-se uma adaptação da metodologia proposta por Teixeira et al., (2011) e verificada em diversos trabalhos acadêmicos que existem na bibliografia a respeito da avaliação de potencial enzimático de diferentes enzimas (BEZERRA, 2017; BRAGA et al., 2009; HEINZ et al., 2014).

### 4.5.1 Crescimento em meio líquido

Primeiramente foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada nas placas contendo as colônias homogêneas obtidas previamente, as quais foram desprendidas do meio de cultura com o auxílio de uma alça de platina, tomando cuidado para não danificar o meio. Desse preparo, retirou-se alíquotas de 1 mL que foram adicionadas ao meio de cultura líquido composto pela solução de Manachini, preparado seguindo a composição descrita anteriormente na Tabela 2 sem o ágar (MANACHINI; FORTINA; PARINI, 1987; TEIXEIRA et al., 2011).

A preparação do meio líquido foi feita utilizando um agitador magnético com aquecimento máximo de 60°C, para que fosse obtida uma melhor e mais rápida solubilização dos componentes do meio. Inicialmente os sais foram dissolvidos em uma quantidade pequena de água destilada e depois completou-se o volume para 1000 mL, por último foi acrescentada a carboximetilcelulose na concentração de 0,5% (p/v). O pH foi aferido e estabilizado em 5,0 utilizando uma solução tampão de acetato de sódio (1M) e em seguida o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Depois de resfriado a temperatura ambiente, o meio foi colocado em frascos Erlenmeyer de 250 mL até 1/3 de sua capacidade e as alíquotas foram adicionadas a estes Erlenmeyers utilizando uma micropipeta automática. Os cultivos foram então incubados em agitador de bancada numa agitação de 180 rpm por 72 horas, à 28°C (BEZERRA, 2017; SOUZA, 2015; TEIXEIRA et al., 2011).

#### 4.5.2 Determinação qualitativa dos índices enzimáticos

Passado o período de incubação dos cultivos em meio líquido, foi desenvolvida uma adaptação da técnica do *cup plate*, descrita por Teixeira et al., (2011), que consiste em fazer um pequenos furos de aproximadamente 8 mm de diâmetro (com no máximo 2 mm de profundidade) no centro de placas contendo meio de cultivo sólido, com auxílio de tubos de ensaio e espátulas, para que os microrganismos sejam inoculados dentro destes e o crescimento dos halos fúngicos se desenvolvam ao seu redor.

Para o preparo do meio de cultura sólido seguiu-se o mesmo procedimento adotado no início do experimento, sendo este composto pela Solução de Manachini acrescido de ágar conforme consta na Tabela 2 (MANACHINI; FORTINA; PARINI, 1987).

A inoculação dos microrganismos foi realizada adicionando-se 100 µL dos cultivos em cada *cup plate* com a ajuda de uma micropipeta automática. As placas foram deixadas em temperatura ambiente por 30 minutos para que o meio absorvesse os cultivos e em seguida foram incubadas em estufa por 5 dias a 30°C (ABUD; CRUZ JÚNIOR, 2015; BERTONHA et al., 2016; HARGREAVES, 2008).

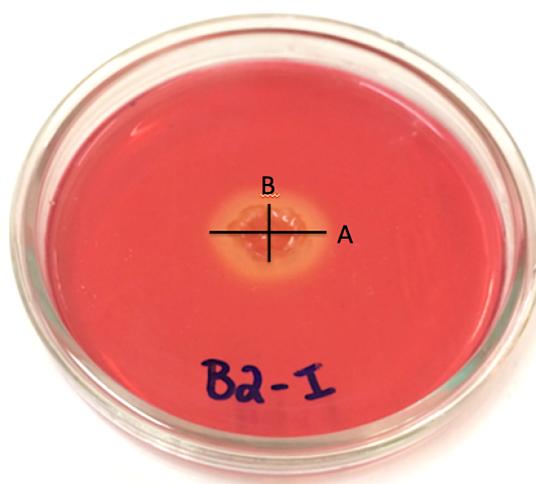
A técnica do *cup plate* descrita por Teixeira et al. (2011) permite que a potencialidade dos microrganismos quanto à atividade enzimática seja avaliada de forma qualitativa. O princípio dessa análise se fundamenta na degradação do substrato pelas enzimas extracelulares secretadas pelo microrganismo no meio de cultura contendo substrato indutor – carboximetilcelulose (CMC).

Cada um dos 8 microrganismos isolados foi inoculado em 5 placas distintas, identificadas com a seguinte nomenclatura: I – sexta-feira; II – sábado; III – domingo; IV – segunda-feira; e V – terça-feira, para serem reveladas com corante Vermelho do Congo em 24, 48, 72, 96 e 120 horas, respectivamente (KASANA et al., 2008).

A degradação do substrato por enzimas celulasas é evidenciada pela formação de halos translúcidos ao redor das colônias no meio de cultivo, enquanto que o restante da placa permanece com uma coloração avermelhada. O índice enzimático (I.E.) pôde ser determinado através da Equação 1 a seguir medindo-se os diâmetros dos halos das colônias (cm) e os diâmetros dos halos de hidrólise (cm)

(Fotografia 3) de cada placa com o auxílio de um paquímetro (AUER et al., 2014; BEZERRA, 2017; TEIXEIRA et al., 2011):

$$I.E. = \frac{\text{diâmetro do halo de hidrólise (cm)}}{\text{diâmetro da colônia (cm)}} \quad (1)$$



**Fotografia 3 – Medições do ensaio *cup plate* onde A = halo de hidrólise e B = diâmetro da colônia**

**Fonte: Autoral (2017)**

#### 4.5.3 Avaliação da taxa de crescimento

A determinação das taxas de crescimento das colônias fúngicas ( $T_c$ ) foi realizada efetuando-se medidas dos diâmetros das colônias dia-a-dia por um período de 5 dias e foram calculadas a partir da razão entre os diâmetros obtidos pelo tempo de incubação (24, 48, 72, 96 e 120 horas) segundo a Equação 2 apresentada abaixo (TEIXEIRA et al., 2011):

$$T_c = \frac{\text{diâmetro do halo da colônia (cm)}}{\text{tempo de incubação (dias)}} \quad (2)$$

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 SELEÇÃO DAS CEPAS PRODUTORAS DE CELULASE

Das 14 amostras iniciais, procedendo com as etapas de isolamentos, chegou-se a um número de 8 cepas isoladas provenientes de 3 pontos de amostragem diferentes. O ponto de coleta 4.2 era superficial e a amostra era composta de solo e de resíduo de madeira e apresentava-se mais ressecada que as demais; o ponto 2.1 se localizava a 10 cm da superfície do solo e a amostra colhida era a mais heterogênea dentre as três apresentadas, constituída por uma mistura de solo e resíduos de madeira; enquanto o ponto 3.3 ficava a 50 cm da superfície e sua amostra possuía um aspecto mais degradado e homogêneo. A diversidade dos locais de onde foram obtidos os microrganismos isolados estão representados na Fotografia 4.



Fotografia 4 – Pontos de coleta 2.1, 3.3 e 4.2 das cepas selecionadas

Fonte: Autoral (2017)

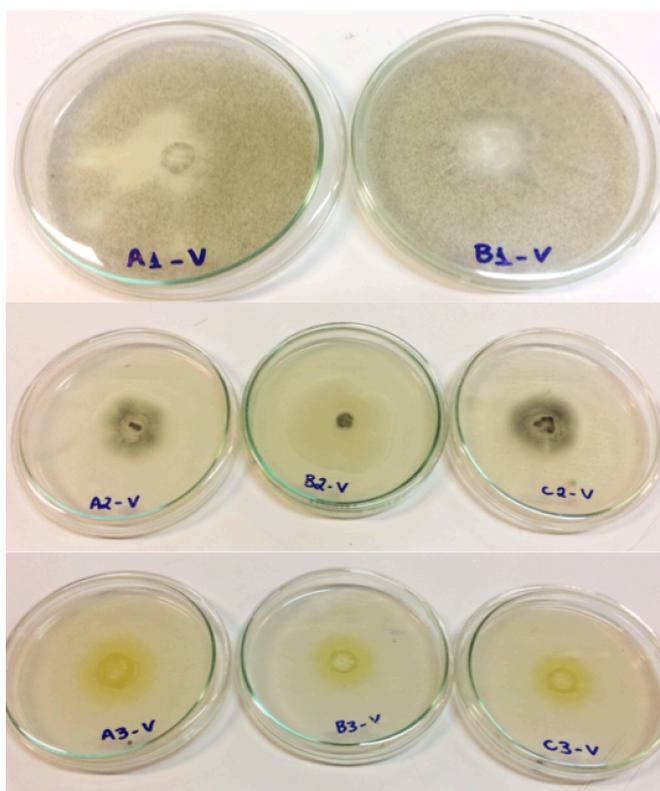
Após o isolamento foi possível realizar o agrupamento dos isolados em 3 diferentes grupos, de acordo com as características morfológicas semelhantes apresentadas pelas suas colônias (Tabela 3).

**Tabela 3 – Divisão dos isolados em grupos e pontos de amostragem**

<b>GRUPOS</b>	<b>MORFOLOGIA</b>	<b>PONTO</b>
Grupo 1	A1	3.3
	B1	4.2
	A2	3.3
Grupo 2	B2	2.1
	C2	2.1
	A3	2.1
Grupo 3	B3	2.1
	C3	3.3

Fonte: Autoral (2018)

A Fotografia 5 apresenta imagens referentes às diferentes morfologias isoladas agrupadas nos seus respectivos grupos mostrados na Tabela 3:



Fotografia 5 – Isolados pertencentes ao Grupo 1, 2 e 3 depois de 5 dias de incubação à 30°C

Fonte: Autoral (2018)

## 5.2 DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DOS ÍNDICES ENZIMÁTICOS

Na literatura existem abordagens diferentes para classificação de microrganismos como bons produtores de celulases de acordo com o seu índice enzimático (I.E.). Os autores Nogueira & Cavalcanti (1996) propõem que, para classificar as cepas como potenciais para aplicação biotecnológica, estas devem apresentar um I.E. com valores superiores à 2,0. Bem como para Teixeira et al. (2011), que classifica as cepas que apresentam valores de I.E. igual ou superior à 2,0 como produtoras promissoras de celulases. Enquanto Andrade (2015), realizando isolamento de fungos filamentosos a partir do solo para aplicação em resíduos de café, utilizou um valor mínimo de I.E. de 1,2 para selecionar os melhores indivíduos. No presente trabalho foi considerado um valor de I.E. maior ou igual a 2,0 para a classificação das melhores cepas quanto à produção de enzimas celulolíticas.

A Tabela 4 a seguir apresenta os resultados de índice enzimático (I.E.) para todas as cepas, ao longo dos cinco dias em que foram efetuadas as medições dos halos de hidrólise e dos diâmetros das colônias.

**Tabela 4 – Resultados de índice enzimático (I.E.) para todos os isolados**

(continua)

PERÍODO	PARÂMETROS	A1	B1	A2	B2	C2	A3	B3	C3
24 horas	Halo de hidrólise (cm)	2,9	2,6	2,2	2,1	2,2	1,8	1,4	0,0
	Diâmetro da colônia (cm)	2,5	2,4	1,0	1,0	0,7	0,6	0,5	0,0
	Índice Enzimático (I.E.)	1,16	1,10	2,20	2,10	3,14	3,00	2,80	0,00
48 horas	Halo de hidrólise (cm)	7,7	6,8	2,8	3,4	3,1	2,4	1,8	1,4
	Diâmetro da colônia (cm)	6,7	6,0	1,0	1,7	1,4	0,9	0,7	0,6
	Índice Enzimático (I.E.)	1,15	1,13	2,80	1,97	2,21	2,67	2,57	2,33
72 horas	Halo de hidrólise (cm)	9,3	9,3	3,4	3,9	3,5	2,5	2,3	1,6
	Diâmetro da colônia (cm)	9,3	9,3	2,2	1,8	2,0	1,0	0,8	0,6
	Índice Enzimático (I.E.)	1,00	1,00	1,52	2,17	1,75	2,50	2,88	2,67

**Tabela 4 – Resultados de índice enzimático (I.E.) para todos os isolados (conclusão)**

PERÍODO	PARÂMETROS	A1	B1	A2	B2	C2	A3	B3	C3
96 horas	Halo de hidrólise (cm)	-	-	3,7	4,9	3,7	2,9	2,2	0,0
	Diâmetro da colônia (cm)	-	-	3,0	2,7	2,6	1,1	0,9	0,0
	Índice Enzimático (I.E.)	-	-	1,23	1,81	1,42	2,64	2,44	0,00
120 horas	Halo de hidrólise (cm)	-	-	4,5	6,1	4,7	3,2	2,7	1,7
	Diâmetro da colônia (cm)	-	-	3,7	4,7	3,5	1,2	0,8	0,7
	Índice Enzimático (I.E.)	-	-	1,20	1,30	1,34	2,67	3,38	2,43

**Fonte: Autoral (2018)**

**Notas:**

- (1) O crescimento das cepas A1 e B1 não pôde continuar sendo medido pois no terceiro dia as colônias fúngicas já tomavam toda a placa.  
 (2) Não foi observado crescimento do isolado C3 no primeiro e quarto dias.

Avaliando-se as cepas nas primeiras 24 horas, tem-se que 5 das 8 cepas selecionadas apresentaram valores de I.E.  $\geq 2,0$ , sendo que os maiores valores de I.E. foram representados pelos indivíduos C2 e A3, 3,14 e 3,00, respectivamente, enquadrando-os como bons microrganismos para aplicação em processos biotecnológicos (NOGUEIRA; CAVALCANTI, 1996). Não foi possível identificar crescimento do indivíduo C3 no primeiro dia. Com 48 horas de incubação, dos 5 indivíduos que tiveram I.E.  $> 2,0$  no primeiro dia, apenas o indivíduo B2 saiu da classificação, com um I.E. um pouco abaixo de 2,0 e o indivíduo C3 apresentou I.E. = 2,33. No terceiro dia, apenas metade dos indivíduos mantiveram I.E.  $> 2,0$  e no quarto, apenas as linhagens A3 e B3 continuaram apresentando valores acima de 2,0. Não foi possível identificar crescimento do indivíduo C3 nesse dia. E ao final de 120 horas, apenas as cepas A3 e B3 continuaram com os valores de I.E. altos, perfazendo 2,67 e 3,38, respectivamente. Além do indivíduo C3, que no quinto dia apresentou I.E. de 2,43.

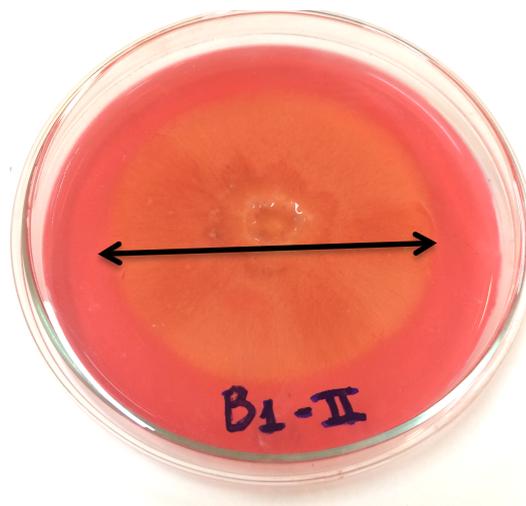
Analisando trabalhos presentes na bibliografia acerca de avaliação de índice enzimático pelo método do *cup plate*, tem-se que Silva et al., (2015), estudando a produção de enzimas extracelulares por fungos filamentosos isolados de materiais vegetais em riachos, obtiveram que de 100 linhagens isoladas, 69% apresentaram

atividade celulolítica, sendo 23% destas potenciais para aplicação em processos biotecnológicos com I.E. > 2. Quatro cepas apresentaram I.E. maior que 3, duas maior que 4, uma maior que 5 e uma maior que 8, constituindo bons produtores de celulasas. Facundes (2014), realizando o isolamento de fungos filamentosos na mata de galeria do cerrado Tocantinense, obteve que de 113 isolados, cerca de 61% mostraram resultados positivos para produção de celulasas e 22 destas tiveram resultados de I.E. acima de 1,5. Avaliando as atividades degradativas de celulose por fungos isolados de acículas de *Pinus taeda*, Auer et al. (2014) obtiveram resultados de I.E. acima de 1,5 para 3 fungos de um total de 8 avaliados, sendo estes pertencentes às espécies *Aspergillus sp.*, *Cladosporium sp.* e *Exophiala sp.* Já Heinz et al. (2014) obtiveram 5 cepas de um total de 24 fungos isolados de resíduos de processamento de papel com I.E. > 1,5.

Ao avaliar os resultados dos autores citados, estes realizaram o isolamento de linhagens fúngicas a partir de resíduos de biomassa vegetal ou do próprio meio ambiente, em locais onde a oferta de recursos específicos para o crescimento de microrganismos produtores de enzimas celulolíticas pode possibilitar sua seleção (BONFIM; RODRIGUES, 2015).

Assim, analisando os resultados obtidos, pode-se dizer que o depósito de resíduos de madeira a céu aberto onde foi realizada a coleta de amostras no presente trabalho se mostrou bastante favorável para o isolamento de microrganismos produtores de celulasas, já que foi possível isolar 8 microrganismos com resultados positivos para a presença das enzimas. Além disso, verificou-se que 62% do total são considerados potenciais para a utilização em processos biotecnológicos com valores de I.E. > 2,0 ao final de 24 horas de incubação à 30°C.

Pode-se observar também que, embora as linhagens A2, B2, C2, A3, B3 e C3 tenham apresentado os maiores índices enzimáticos, estas apresentaram também os menores diâmetros de colônia se comparados as linhagens A1 e B1, que obtiveram os maiores diâmetros de colônia em contrapartida. Resultados semelhantes também foram observados nos trabalhos de Auer et al. (2014), Braga et al. (2009) e Heinz et al., (2014), que estudaram a produção de celulasas por fungos isolados de acículas de *Pinus taeda*, por fungos do gênero *Fusarium* e por fungos isolados de resíduos da indústria papeleira, respectivamente.



**Fotografia 6 – Diâmetro da colônia do isolado B1 após 48 horas de incubação**  
**Fonte: Autoral (2018)**

Avaliando esses resultados, pode-se concluir que mesmo apresentando menor crescimento das colônias, o que indica uma produção baixa de biomassa, essas cepas possuem um elevado potencial de produção de enzimas celulolíticas. Partindo do pressuposto que o complexo enzimático celulolítico é composto por um consórcio de enzimas que atuam de forma sinérgica para a degradação da celulose, é de grande relevância realizar estudos acerca de quais enzimas estão presentes em cada complexo produzido afim de avaliar o potencial de aplicação de maneira mais específica.

Além disso, a técnica usada para avaliação do índice enzimático depende de muitos fatores que podem influenciar nos resultados finais, como temperatura, pH e tempo de incubação, sendo necessário uma análise posterior das melhores condições de cultivo para otimizar a produção enzimática (NOGUEIRA; CAVALCANTI, 1996; RUEGGER; TAU-K-TORNISIELO, 2004).

### 5.3 AVALIAÇÃO DAS TAXAS DE CRESCIMENTO

As taxas de crescimento ( $T_c$ ) das colônias fúngicas foram obtidas ao longo dos 5 dias de incubação à 30°C e os resultados estão expostos na Tabela 5 a seguir.

Os isolados A1 e B1 apresentaram as maiores taxas de crescimento, com médias de 0,12 cm/dia em ambos os casos. No terceiro dia de incubação as colônias já ocupavam toda a placa, não sendo possível continuar quantificando o crescimento das mesmas pelos próximos dois dias. As cepas A2, B2 e C2 apresentaram taxas médias de crescimento de 0,03 cm/dia, enquanto que as cepas A3, B3 e C3 obtiveram médias de 0,01 cm/dia. Não foi possível identificar o crescimento do indivíduo C3 no primeiro e quarto dias.

**Tabela 5 – Taxa de crescimento ( $T_c$ ) das colônias ao longo de 5 dias de incubação à 30°C**

ID	Taxa de crescimento da colônia (cm/dia)					Média
	Sexta-feira (24 horas)	Sábado (48 horas)	Domingo (72 horas)	Segunda-feira (96 horas)	Terça-feira (120 horas)	
A1	0.1042	0.1750	0.0875	-	-	0.1222
B1	0.1000	0.1500	0.1167	-	-	0.1222
A2	0.0417	0.0000	0.0500	0.0333	0.0292	0.0308
B2	0.0417	0.0292	0.0042	0.0375	0.0833	0.0392
C2	0.0292	0.0292	0.0250	0.0250	0.0375	0.0292
A3	0.0250	0.0125	0.0042	0.0042	0.0042	0.0100
B3	0.0208	0.0083	0.0042	0.0042	0.0000	0.0075
C3	-	0.0250	0.0000	-	0.0042	0.0097

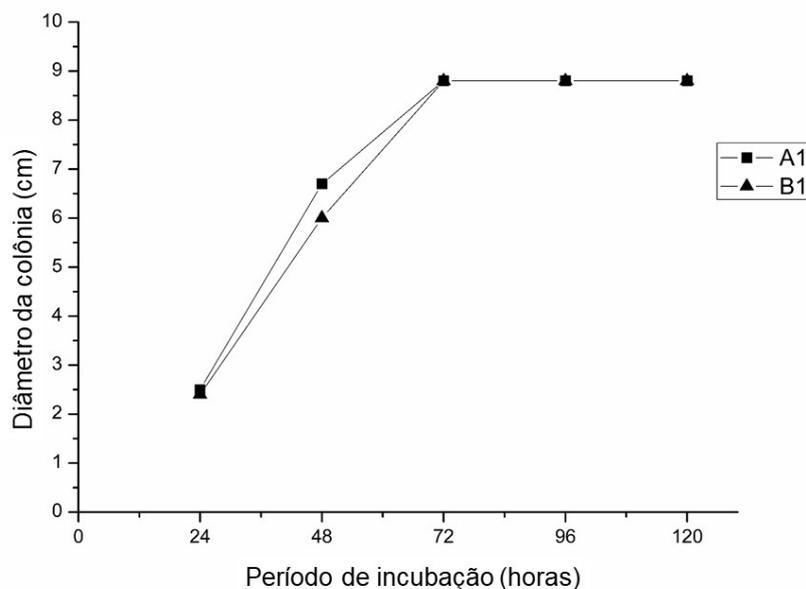
**Fonte: Autoral (2018)**

É interessante salientar que, previamente ao início dos experimentos, os isolados foram agrupados de acordo com as características de suas hifas e colorações nos grupos 1, 2 e 3. Os resultados obtidos corroboram com o exposto, pois os indivíduos pertencentes a um mesmo grupo apresentaram taxas de crescimento semelhantes.

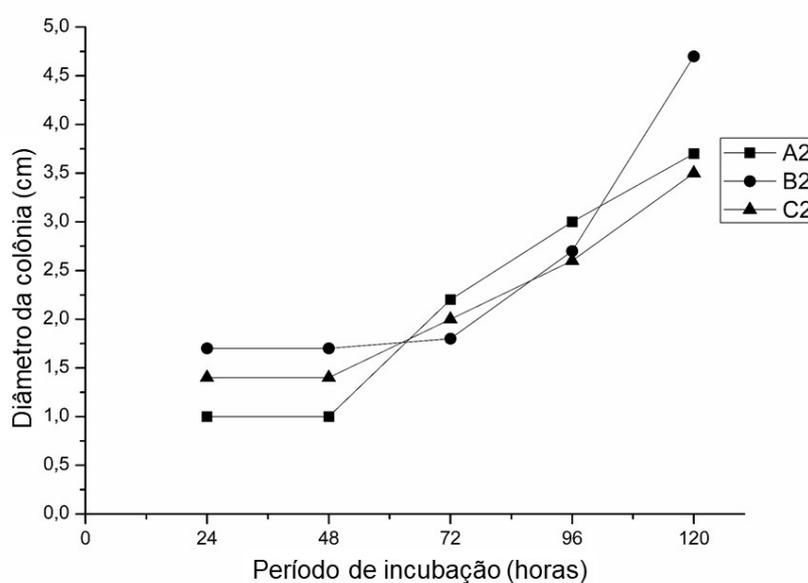
Analisando a Tabela 5 pode-se observar que o tempo de incubação constitui um parâmetro bastante importante no cultivo de microrganismos. Os indivíduos do grupo 1 (A1 e B1) apresentaram uma maior taxa de crescimento nas primeiras 48 horas de incubação, com 0,18 e 0,15 cm/dia, respectivamente, e apresentaram uma tendência de crescimento elevada nos dias em que foi possível realizar as medições; já o grupo 2 obteve um comportamento diferente para cada um dos seus indivíduos, A2 apresentou sua maior taxa de crescimento em 72 horas com 0,05 cm/dia, enquanto que B2 e C2 apresentaram suas maiores taxas, 0,08 e 0,04 cm/dia, após 5 dias de incubação; e os indivíduos A3 e B3 do grupo 3 apresentaram

as maiores taxas já no primeiro dia de incubação, ambos com 0,02 cm/dia. O indivíduo C3 apresentou maior taxa após 48 horas de crescimento, também 0,02 cm/dia.

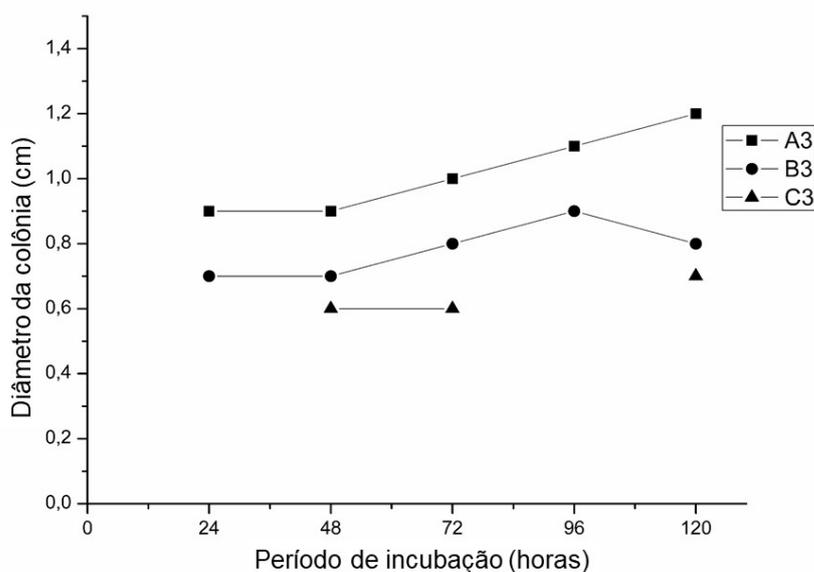
Os gráficos a seguir (Gráfico 1, 2 e 3) representam as taxas de crescimento de cada um dos indivíduos divididos em seus grupos.



**Gráfico 1 – Diâmetros das colônias A1 e B1 (Grupo 1) durante os 5 dias de incubação**  
Fonte: Autoral (2018)



**Gráfico 2 – Diâmetros das colônias A2, B2 e C2 (Grupo 2) durante os 5 dias de incubação**  
Fonte: Autoral (2018)



**Gráfico 3 – Diâmetros das colônias A3, B3 e C3 (Grupo 3) durante os 5 dias de incubação**

Fonte: Autoral (2018)

Fatores como temperatura, pH, composição do meio de cultivo e umidade influenciam diretamente na taxa de crescimento dos fungos, em geral cada microrganismo terá valores ótimos para cada um desses parâmetros. Na literatura, podem ser encontrados diferentes trabalhos nos quais são estudadas essas dependências.

A autora Negrão (2011), por exemplo, estudando fungos degradadores de madeira para aplicação na destoca biológica de *Eucalyptus spp.*, avaliou a influência da temperatura no crescimento micelial das espécies *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinus bertieri*, *Xylaria sp.*, *Lentinula edodes* e *Stereum ostrea*. Ela constatou que o fungo *Xylaria sp.* foi o único que apresentou uma queda no crescimento com o aumento da temperatura, tendo sua maior taxa de crescimento em 24°C. Já o restante dos fungos apresentaram crescimento acentuado em temperaturas de 27°C e elevação dessas taxas a 31°C. Com isto pode-se afirmar que o comportamento biológico dos microrganismos depende diretamente da temperatura a qual são submetidos.

Outro fator que promove elevada influência na taxa de crescimento dos microrganismos é a constituição e a suplementação do meio de cultivo. Facundes (2014) avaliou as taxas de crescimento de duas espécies fúngicas quando cultivadas em meios contendo bagaço de cana-de-açúcar, capim-elefante e uma

combinação de ambos, suplementados com farelo de trigo. A autora concluiu que as maiores taxas ocorreram quando os microrganismos foram cultivados no meio contendo somente bagaço de cana, com valores de 0,96 cm/dia para o fungo *P. ostreatus* e 1,01 cm/dia para o fungo *G. lucidium*.

No presente trabalho foram utilizados parâmetros para o cultivo de fungos em geral, pois o foco do mesmo estava em realizar o isolamento destes no meio ambiente. Para obtenção de dados mais significativos de taxas de crescimento, seria interessante identificar as espécies e realizar testes para determinar quais são os valores ótimos de pH, umidade e temperatura e qual a melhor suplementação do meio de cultivo afim de promover as melhores condições de crescimento para cada um deles.

## 6 CONCLUSÃO

De acordo com o exposto, pode-se afirmar que o isolamento e seleção de microrganismos realizado em um depósito de resíduos de madeira foi satisfatório uma vez que foi possível isolar 8 microrganismos com diferentes morfologias, os quais apresentaram resultados positivos para a produção de enzimas celulolíticas de acordo com a metodologia empregada. A Tabela 6 a seguir evidencia os principais resultados obtidos nos experimentos:

**Tabela 6 – Resultados de índice enzimático (I.E.) e taxas de crescimento (T.C.) para todos os isolados e pontos de amostragem onde foram obtidos**

GRUPOS	MORFOLOGIA	PONTO	PROFUNDIDADE (cm)	I.E. > 2,0 (24 horas)	I.E. > 2,0 (120 horas)	T.C. (cm/dia)
Grupo 1	A1	3.3	50	(-)	(-)	0,12
	B1	4.2	Superficial	(-)	(-)	0,12
Grupo 2	A2	3.3	50	(+)	(-)	0,03
	B2	2.1	10	(+)	(-)	0,04
	C2	2.1	10	(+)	(-)	0,03
Grupo 3	A3	2.1	10	(+)	(+)	0,01
	B3	2.1	10	(+)	(+)	0,01
	C3	3.3	50	ND	(+)	0,01

**Fonte: Autoral (2018)**

Não houve diferença significativa com relação a profundidade em que foram coletadas as amostras, já que observa-se bons resultados de I.E. tanto em 10 cm quanto em 50 cm. Sendo que a única cepa obtida a partir de uma amostra da superfície obteve um I.E. menor do que 2,0.

Dentre os isolados fúngicos tem-se que os indivíduos pertencentes aos Grupos 2 e 3 (A2, B2, C2, A3 e B3) apresentaram um I.E. > 2,0 já nas primeiras 24 horas de incubação a 30°C, com exceção da cepa C3 a qual não apresentou crescimento no primeiro dia. O que os caracteriza como microrganismos promissores para aplicações biotecnológicas, visto que apresentaram uma grande produção enzimática em pouco tempo.

Também foi observada a relação inversamente proporcional entre a taxa de crescimento das colônias e o índice enzimático, uma vez que os indivíduos A1 e B1 apresentaram as maiores taxas, em média 0,12 cm/dia, e os menores índices

enzimáticos, o que evidencia que nem sempre um maior crescimento micelial estará acompanhado de uma grande capacidade de secreção de enzimas celulolíticas.

Frente ao apresentado, faz-se necessário realizar a identificação taxonômica dos microrganismos isolados afim de obter um maior conhecimento acerca de suas características. Este conhecimento aliado a outros experimentos buscando a otimização dos parâmetros de cultivo possibilitarão a aplicação destes microrganismos tanto na destoca biológica como em novas aplicações.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABUD, A. K. DE S.; CRUZ JÚNIOR, N. **Isolamento E Seleção De Fungos Celulolíticos a Partir Da Casca De Coco Verde**. XX Simpósio Nacional de Bioprocessos. **Anais...**Fortaleza: 2015Disponível em: <<http://proceedings.galoa.com.br/proceedings/10/papers/33557>>
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. MECANISMOS ENVOLVIDOS NA BIODEGRADAÇÃO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS E APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS CORRELATAS. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729–1738, ago. 2011.
- ALMEIDA, M. C. D. O. **Indução de celulasas e xilanases por *Trichoderma reesei* e *Penicillium variable* em cultivo em estado sólido a partir de substratos lignocelulósicos**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.
- ALONSO, S. K. et al. Isolamento e seleção de fungos causadores da podridão-branca da madeira em florestas de *Eucalyptus* spp. com potencial de degradação de cepas e raízes. **Revista Árvore**, v. 31, n. 1, p. 145–155, 2007.
- ANDRADE, M. C. **BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS, PERFIL ENZIMÁTICO E UTILIZAÇÃO EM RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DE CAFÉ**. [s.l.] Universidade Federal de Lavras, 2015.
- 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, p. 1586–1595, jul. 2009.
- AUER, C. G. et al. ATIVIDADES DEGRADATIVAS DE CELULOSE E DE FENÓIS POR FUNGOS ISOLADOS DE ACÍCULAS DE *Pinus taeda*. **Floresta**, v. 44, n. 2, p. 179–184, 20 jan. 2014.
- BASSO, T. P. **Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e serapilheira em comparação com cepas de *Trichoderma reesei***. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2010.
- BERTONHA, L. C. et al. **Bioprospecção de Fungos Filamentosos Produtores de Enzimas Polissacaridasas Úteis Para Obtenção do Etanol Celulósico**. XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. **Anais...**2016Disponível em: <<https://www.uces.br/site/midia/arquivos/4401-enzitec2016.pdf>>. Acesso em: 8 abr. 2018
- BEZERRA, C. DE S. **CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE *Colletotrichum* spp. ISOLADOS DE *Paullinia cupana* Kunth. var. *sorbilis* (Mart.)**. [s.l.] Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2017.
- BONFIM, C. C. DE O.; RODRIGUES, J. H. **BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS**

**PRODUTORES DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS NA FURNA DO PASSO DO PUPO 1.** [s.l.] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015.

BRAGA, R. M. et al. **Avaliação da Produção de Celulase por Cepas de Fusarium.** XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos. **Anais...**Natal: 2009

CARVALHO, W. et al. UMA VISÃO SOBRE A ESTRUTURA, COMPOSIÇÃO E BIODEGRADAÇÃO DA MADEIRA. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2191–2195, 2009.

COSTA, L. G. DA. **SELEÇÃO DE FUNGOS COM CAPACIDADE DE DEGRADAÇÃO DE TOCOS DE Eucalyptus spp. PARA UTILIZAÇÃO NA DESTOCA BIOLÓGICA.** [s.l.] Universidade Federal do Espírito Santo, 2014.

FACUNDES, B. C. **FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE HOLOCELULASES PROSPECTADOS EM MATA DE GALERIA DO CERRADO TOCANTINENSE.** [s.l.] Universidade Federal do Tocantins, 2014.

FILHO, J. M. M. A. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2008.

FLORENCIO, C. **Microrganismos Produtores de Celulases: Seleção de Isolados de Trichoderma spp.** [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2011.

FOELKEL, C. O problema dos tocos residuais das florestas plantadas de eucaliptos. **Eucalyptus Newsletter**, v. 45, 2014.

HARGREAVES, P. I. **Bioprospecção de novas celulases de fungos provenientes da floresta amazônica e otimização de sua produção sobre celulignina de bagaço de cana.** [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

HEINZ, K. G. H. et al. Avaliação da atividade hidrolítica de micro-organismos isolados de resíduo do processamento de papel. **Revista de Estudos Ambientais**, v. 16, n. 2, p. 37–47, 2014.

KASANA, R. C. et al. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. **Current Microbiology**, v. 57, p. 503–507, 2008.

KLEMM, D. et al. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 2005.

KUMAR, A.; GAUTAM, A.; DUTT, D. Biotechnological Transformation of Lignocellulosic Biomass in to Industrial Products: An Overview. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 149–168, 2016.

LEE, H. V. et al. Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–20, 2014.

LUZ, B. D. S. et al. Bioprospecção de microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial realizada no Parque Estadual Serra do Ouro Branco, Brasil.

**Interbio**, v. 10, n. 1, p. 13–24, 2016.

MALLAGUTTI, V. H. **PRODUÇÃO DE CELULASES POR FUNGOS FILAMENTOSOS DA ANTÁRTICA: BUSCA POR NOVO RECURSO GENÉTICO PARA OBTENÇÃO DE BIOETANOL**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”, 2015.

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

MARTINS, L. F. **CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO CELULÁSICO DE *Penicillium echinulatum*** Disserta. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2005.

MARTINS, P. A. **Caracterização do secretoma de *Aspergillus niger* crescido em bagaço de cana e purificação de xilanases de interesse biotecnológico**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2012.

MCKENDRY, P. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 37–46, 2002.

MENEZES, F. P. **DEGRADAÇÃO DE BIODÓLIDO POR FUNGOS LIGNOCELULOLÍTICOS**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Maria, 2013.

MENEZES, C. R. DE; BARRETO, A. R. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos: Caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimático fúngico. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19, n. 2, p. 1365–1391, 2015.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. DO N. **Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática**. 3. ed. Goiânia: Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange, 2009. v. 3

NEGRÃO, D. R. **SELEÇÃO DE FUNGOS DEGRADADORES DE MADEIRA PARA USO NA DESTOCA BIOLÓGICA DE EUCALYPTUS SPP. DJANIRA**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2011.

NOGUEIRA, E. B. DA S.; CAVALCANTI, M. A. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. **Revista de Microbiologia**, v. 27, n. 1, p. 7–9, 1996.

OLIVEIRA, J. T. DE; TOMASELLO, M.; SILVA, J. DE C. RESISTÊNCIA NATURAL DA MADEIRA DE SETE ESPÉCIES DE EUCALIPTO AO APODRECIMENTO. **Revista Árvore**, v. 29, n. 6, p. 993–998, 2005.

OLIVEIRA, L. G. DE; MANTOVANI, S. M. TRANSFORMAÇÕES BIOLÓGICAS: CONTRIBUIÇÕES E PERSPECTIVAS. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 742–756, 2009.

ORLANDELLI, R. C. et al. ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL: PRODUÇÃO

POR FUNGOS E APLICAÇÕES. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 97–109, dez. 2012.

PÉREZ, J. et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview. **International Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53–63, 2002.

PINTO, F. F. **Degradação De Madeiras Por Fungos: Aspectos Biotecnológicos E De Biorremediação**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

PINTO, L. et al. **SÍNTESE DE CELULASE POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO: OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO**. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. **Anais...** Florianópolis: 2014 Disponível em: <<http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/0281-26213-162128.pdf>>. Acesso em: 8 abr. 2018

PIRES, S. R. **Enzimas Celulolíticas Fúngicas E Aplicação No Branqueamento De Polpa Kraft E Na Sacarificação De Biomassa Lignocelulósica**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2013.

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, p. 1606–1612, 2015.

PRASAD, S.; SINGH, A.; JOSHI, H. C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 50, n. 1, p. 1–39, 2007.

ROMANO, L. H. **Bioprospecção de Microrganismos Endofíticos Isolados de *Tabebuia* spp. e *Hymenaea courbaril* e Identificação da Produção de Metabólitos de Interesse Biotecnológico**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 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**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2014.

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

SALLES, H. O. et al. **Metodologia Científica: Ensaio Alternativo para Triagem de Extratos Proteicos com Atividade Celulolítica**. Sobral: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/880077/1/UMTCot112.pdf>>. Acesso em: 8 abr. 2018.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi.

**Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185–194, 2009.

SANTANA, M. D. F. et al. FENOLOXIDASE E BIODEGRADAÇÃO DO CORANTE TÊXTIL AZUL BRILHANTE DE REMAZOL R (RBBR) PARA TRÊS ESPÉCIES DE MACROFUNGOS COLETADAS NA AMAZÔNIA. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v. 11, n. 2, p. 53–60, 2016.

SANTOS, M. S. et al. **Bioprospecção de Fungo Endofítico Isolado de Passiflora sp. com potencial biotecnológico BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**. [s.l.: s.n.].

SANTOS, E. DOS. **UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS PRODUZIDAS POR Trichoderma reesei E Aspergillus niger NA EXTRAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2008.

SILVA, J. B. A. et al. Produção de enzimas extracelulares por fungos associados à decomposição de materiais vegetais em riachos. **Journal of bioenergy and food science**, v. 2, n. 4, p. 208–212, 22 dez. 2015.

SILVA, B. N. S. DA. **SELEÇÃO DE FUNGOS APODRECEDORES DE MADEIRA E CARACTERIZAÇÃO DE BASIDIOMICETOS ASSOCIADOS À PODRIDÃO DE TECIDOS DE ÁRVORES VIVAS**. [s.l.] Universidade Federal de Lavras, 2014.

SILVA, J. LÁZARO PINHEIRO DA. **Aproveitamento De Resíduos Da Indústria Madeireira Para Geração De Energia Elétrica – O Caso Da Empresa B. K. Energia Itacoatiara Ltda No Estado Do Amazonas**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2011.

SOUZA, I. DE F. **ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS NATURALMENTE OCORRENTES EM BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS HOLOCELULOLÍTICAS**. [s.l.] Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri, 2015.

SOUZA, H. Q. DE; OLIVEIRA, L. A. DE; ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 116–124, 2008.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F. Perdas de agrotóxicos. **Agência Embrapa**, 2013.

TEIXEIRA, M. F. S. et al. **Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada**. 1ª edição ed. Manaus: Editora da Universidade Federal do Amazonas, 2011.

TÍMAR-BALÁZSY, A.; EASTOP, D. **Chemical Principles of Textile Conservation**. Oxford: [s.n.].

TUOTO, M. **Levantamento sobre a geração de resíduos provenientes da atividade de madeireira e proposição de diretrizes para políticas, normas e condutas técnicas para promover o seu uso adequado**. Curitiba: [s.n.].

Disponível em:  
<[http://www.mma.gov.br/estruturas/164/\\_publicacao/164\\_publicacao10012011032535.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/164/_publicacao/164_publicacao10012011032535.pdf)>.

VIDAL, J. M. et al. PRESERVAÇÃO DE MADEIRAS NO BRASIL: HISTÓRICO, CENÁRIO ATUAL E TENDÊNCIAS. **Ciência Florestal**, v. 25, n. 1, p. 257–271, 2015.

WAGG, C. et al. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 14, p. 5266–5270, 2014.

WIECHETECK, M. **Aproveitamento de Resíduos e Subprodutos Florestais, Alternativas Tecnológicas e Propostas de Políticas ao uso de Resíduos Florestais para Fins Energéticos**. Curitiba: [s.n.].

YOSHIDA, S. et al. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). **Science**, v. 351, n. 6278, p. 1196–1199, 11 mar. 2016.