

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

**CAIO CESAR DE OLIVEIRA BONFIM  
JOHNATA HENRIQUE RODRIGUES**

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS NA  
FURNA DO PASSO DO PUPO 1**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**PONTA GROSSA**

**2015**

**CAIO CESAR DE OLIVEIRA BONFIM**

**JOHNATA HENRIQUE RODRIGUES**

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE ENZIMAS CELULOLÍTIICAS NA  
FURNA DO PASSO DO PUPO 1**

Pré-projeto de pesquisa apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr Marcio Silva

**PONTA GROSSA**

**2015**



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



Nome da Diretoria  
Nome da Coordenação  
Nome do Curso

---

### **TERMO DE APROVAÇÃO**

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS NA  
FURNA DO PASSO DO PUPO 1**

por

**CAIO CESAR DE OLIVEIRA BONFIM**

**JOHNATA HENRIQUE RODRIGUES**

Este Trabalho de Conclusão de Curso – TCC foi apresentado em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química. Os candidatos foram arguidos pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

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

---

Prof. Dr Luciano Fernandes  
Membro titular

---

Prof. Dr José Luiz Ferreira da Trindade  
Membro titular

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

Dedicamos este trabalho a nossa família  
que sempre estiveram do nosso lado.

## AGRADECIMENTOS

Certamente estes parágrafos não irão atender a todas as pessoas importantes que fizeram parte das nossas vidas. Portanto, desde já peço desculpas àquelas que não estão presentes entre essas palavras, mas certo da compreensão de todas, fiquem certas que fazem parte dos nossos pensamentos e da nossa eterna gratidão.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Marcio Silva, pela sabedoria com que me guiou nesta trajetória, paciência, carinho e extrema dedicação.

Aos nossos colegas de graduação.

Gostaria de agradecer primeiramente à minha família, meu pai (Josemar Martins Bonfim) e minha mãe (Reni de Oliveira Bonfim) e minha irmã (Débora Cristine de Oliveira Bonfim), pelo apoio incondicional durante esses longos 8 anos de universidade, os quais sem o apoio e suporte de cada um deles teria sido, sem dúvida alguma, mais difícil. Agradecer ao grande amor da minha vida Fanny Kovaleski, por todo o apoio, incentivos e conselhos fundamentais nas últimas etapas dessa caminhada. E agradecer também a todos os amigos e colegas que tive o prazer de conhecer nesta jornada. Por fim gostaria de dedicar este trabalho a duas pessoas e exemplos de vida incríveis que infelizmente me deixaram durante este período, minhas avós (Maria Judite Bonfim e Harilda Lopes de Oliveira), onde quer que estejam, sem dúvida estarão tão feliz quanto a mim mesmo por mais esta conquista. Por Caio Cesar.

Excepcionalmente, as pessoas que dividiram a maior parte desse período comigo: Annelise, Denis, Hebert, José, Klinsmann, Laisa, Ligia, Reyner, Yugo (em ordem alfabética), e em especial ao meu grande amigo de 7 anos de caminhada Bruno Rovere, obrigado por me fazerem sentir como em família. Gostaria de lembrar especialmente as pessoas maravilhosas que tive o privilégio de conhecer no início da minha vida acadêmica e que até hoje me acompanham (mesmo que somente em vibrações): Henrique, Paula, Thalita e Tardelli, vocês me marcaram. E ao eterno amor da minha vida Franceline L. Ribeiro. Não menos importante, gostaria de deixar registrado também, o meu reconhecimento e eterna gratidão a minha família, pois sou crente de que só consegui alcançar meus objetivos pelo amor incondicional, suporte constante e incentivo dados pela minha mãe (Telma Padilha de Novais) e meu pai (Pedro Roberto Rodrigues). Por Johnata Rodrigues.

Ao corpo docente do Departamento Acadêmico de Engenharia Química Bacharelado em Engenharia Química por todo conhecimento que compartilhamos.

Enfim, a todos os que por algum motivo contribuíram para a realização desta pesquisa, em especial ao Técnico de laboratórios Luciano Tozetto por todo o suporte e principalmente pela amizade.

A mente que se abre a uma nova ideia  
jamais voltará ao seu tamanho original.  
(EINSTEIN, Albert)

## RESUMO

BONFIM, C. C. de O.; RODRIGUES, J. H. Bioprospecção de Fungos Produtores de Enzimas Celulolíticas. 2015. 46 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, ano de 2015.

No cenário dinâmico do desenvolvimento tecnológico mundial, tem-se que processos contemporâneos são diariamente reformulados, onde novas práticas são adicionadas ou substituídas por opções mais econômicas e de melhores condições operacionais, nesse contexto o estudo a respeito da ação e a busca por novas fontes de enzimas, tais como a celulase, que têm um papel importante nesse processo de aperfeiçoamento devido a propriedade degradativa da celulose, podendo ser utilizada em diferentes seguimentos industriais. O presente trabalho tem como objetivo isolar estirpes de fungos filamentos capazes de hidrolisar a celulose a partir de uma bioprospecção na Furna do Passo do Pupo 1, localizada em Ponta Grossa – PR. Utilizando-se do meio de cultura composto pela Solução de Manachini ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $2\text{g.L}^{-1}$ ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $1\text{g.L}^{-1}$ ;  $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,1\text{g.L}^{-1}$ ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4.2\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,9\text{g.L}^{-1}$ ; extrato de levedura,  $1\text{g.L}^{-1}$ ), suplementada com carboximetilcelulose (CMCA) 0,5% (p/v), realizou-se a seleção qualitativa das melhores cepas a totalizando 7 colônias fungicas isoladas. Essas tiveram as atividades enzimáticas ( $I_E$ ) e taxas de crescimentos ( $T_C$ ) determinadas no decorrer de 5 dias de incubação a  $20^\circ\text{C}$  com ausência de luz, a partir da revelação diária dos halos de hidrolise com a solução de Vermelho do Congo 0,1% (p/v) medidos para o cálculo do  $I_E$  e  $T_C$ , dados pela razão entre diâmetro do halo (mm) pelo diâmetro do poço (mm) e razão do diâmetro do halo (mm) pelo tempo de incubação (dia), respectivamente. Todas as cepas caracterizaram-se como fungos com boa capacidade produtora de celulase, uma vez que todas apresentaram  $I_E \geq 2,0$ , 4 cepas (G0 (2), G0 (5), BE1 (9) e DE2 (10)) apresentaram valores inferiores a 6,0, variando o  $I_E$  de 3,6 a 5,78, e 7 cepas (CE2 (1), DE1 (3), G0 (4), DD2 (6), DE2(7), G0 (8) e BE1 (11)) apresentaram  $I_E \geq 6,0$ , variando o  $I_E$  de 6,16 a 7,17, resultados que as enquadram como excelentes produtoras de celulase, salientando que a estirpe DE2 (7), com maior  $I_E$ , apresentou o ápice da taxa de crescimento enzimático com aproximadamente 36 horas, destacando-se das demais que apresentaram o ápice da  $T_C$  a partir de 44 horas de incubação, fato de extrema importância para a indústria, que tem como foco a busca por processos cada vez mais eficientes. Os resultados mostram o potencial das cepas isoladas, expandindo assim a necessidade de identificar os indivíduos encontrados, devido à grande possibilidade desses serem endêmicos do local avaliado.

**Palavras-chave:** Bioprospecção. Fungos Filamentosos. Celulose. Celulase. Índice Enzimático.



## ABSTRACT

BONFIM, C. C. de O.; RODRIGUES, J. H. Bioprospecção de Fungos Produtores de Enzimas Celulolíticas. 2015. 46 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, ano de 2015.

In the dynamic landscape of global technological development, has that contemporary processes are redesigned every day, where new practices are added or replaced by more economical and better operating conditions options in this context the study about the action and the search for new sources of enzymes, such as cellulase, which play an important role in this process by improving the property of degradative cellulose, can be used in different industrial segments. This work aims to isolate strains filaments fungi able to hydrolyze cellulose from a bioprospecting in Furna do Passo do Pupo 1, located in Ponta Grossa - PR. Using the culture medium composed of Manachini solution ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2g.L<sup>-1</sup>;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1-1g.L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1g.L<sup>-1</sup>;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0, 9g.L<sup>-1</sup>, yeast extract, 1g.L<sup>-1</sup>), supplemented with carboxymethylcellulose (CMCA) 0.5% (w / v), there was a qualitative selection of the best strains to total 7 isolated fungal colonies. These had enzyme activities (IE) and growth rate (CT) determined in the course of 5 days of incubation at 20 ° C with no light, from the disclosure of daily hydrolysis halos with solution of Congo 0,1% (w / v) measured for the calculation of the IE and CT data by the ratio between the diameter of the halo (mm) by the well diameter (mm) and because of halo diameter (mm) with the incubation time (day) respectively. All the strains were characterized with good as fungi cellulase producing capability, since all showed  $\text{SI} \geq 2.0$ , 4 strains (G0 (2), G0 (5), BE1 (9) and DE2 (10)) showed values below 6.0 IE ranging from 3.6 to 5.78, and 7 strains (CE2 (1), DE1 (3), G0 (4), DD2 (6), DE2 (7) G0 ( 8) and BE1 (11)) presented  $\geq \text{IE } 6.0$ , IE ranging from 6.16 to 7.17, results that fall as excellent producing cellulase, noting that DE2 strain (7), with higher IE, presented the culmination of enzymatic growth rate of approximately 36 hours, standing out from the others presenting the apex of Tc from 44 hours of incubation, the fact of utmost importance for the industry, which focuses on the search for processes ever more efficient. The results show the potential of the isolated strains, thus expanding the need to identify individuals found, due to the high possibility of these being endemic of the rated site.

**Keywords:** Bioprospecting. Filamentous Fungi. Cellulose. Cellulase. Enzymatic Index.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Corte ilustrativo do sistema de camadas na parede das células de madeira.....	19
Figura 2 – Estrutura de um fragmento de celulose. ....	19
Figura 3 – Ação da hifa fungicas através lúmen da célula vegetal).....	23
Figura 4 – Localização das Dolinas Gêmeas .....	23
Figura 5 – Representação esquemática do perfil de coleta na Furna Passo do Pupo 1 (PR-035).....	25
Fotografia1 – Furna do Passo do Pupo 1.....	24
Fotografia 2 – Exemplo das cotas tomadas de uma cepa após a etapa de revelação.....	30
Fotografia 3 – Exemplo das estirpes isoladas após a etapa de revelação com a solução Vermelho do Congo 0,1% (p/v): DE2 (10-1) e G0 (10-1).....	31
Fotografia4 – Exemplo da avaliação do crescimento e da atividade enzimática da cepa 8 G0 no decorrer de 120 hora incubada a 26°C na ausência de luz.....	36
Gráfico 1 - Atividade enzimática das estirpes isoladas, cultivadas em meios sólidos suplementado com CMCA por 5 dias a 22 °C.....	34
Gráfico 10 - Taxa de Crescimento (cm/dia) da Colônia BE1 (9).....	37
Gráfico 11 - Taxa de Crescimento (cm/dia) da Colônia DE2 (10).....	37
Gráfico 12 - Taxa de Crescimento (cm/dia) da Colônia BE1 (11).....	38
Gráfico 2 - Taxa de Crescimento (cm/dia) da Colônia CE2 (1).....	38
Gráfico 3 - Taxa de Crescimento (cm/dia) da Colônia G0 (2).....	38
Gráfico 4- Taxa de Crescimento (cm/dia) da Colônia DE1 (3).....	38
Gráfico 5 -Taxa de Crescimento (cm/dia) da Colônia G0 (4).....	38
Gráfico 6 - Taxa de Crescimento (cm/dia) da Colônia G0 (5).....	39
Gráfico 7 - Taxa de Crescimento (cm/dia) da Colônia DD2 (6).....	39
Gráfico 8 - Taxa de Crescimento (cm/dia) da Colônia DE2 (7).....	39
Gráfico 9 - Taxa de Crescimento (cm/dia) da colônia G0 (8).....	39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do Meio de Cultura.....	24
Tabela 2 - Pontos isolados e ocorrência.....	31
Tabela 3 - Atividade enzimática das estirpes isoladas incubadas em meios sólidos suplementado com CMCA por 5 dias a 22 °C.....	32
Tabela 4 – Taxa de crescimento das colônias fungicas no período de incubação, a 22°C.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

### LISTA DE ABREVIATURAS

I <sub>E</sub>	Índice Enzimático
T <sub>c</sub>	Taxa de Crescimento das Colônias Fungica
CMCA	Carboximetilcelulose
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato Monopotássico
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de Amônio
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de Magnésio Heptahidratado
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	(Mono) Hidrogeno Fosfato de Sódio Bihidratado

### LISTA DE SIGLAS

CNC	Cadastro Nacional de Cavernas
SBE	Sociedade Brasileira de Espeleologia

### LISTA DE ACRÔNIMOS

GUPE	Grupo Universitário de Pesquisas Espeleológicas
------	---

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Bioprospecção Microrganismos .....	16
2.2 Reino Fungi.....	16
2.3 Fungos .....	16
2.4 Biomassa lignocelulósica.....	17
2.5 Celulose .....	18
2.6 Biodegradação de materiais lignocelulósicos .....	19
2.7 Aplicações biotecnológicas das celulases .....	20
2.8 Furnas Gêmeas.....	21
3. METODOLOGIA.....	22
3.1 Coleta das amostras de solo.....	22
3.2 Meio de crescimento.....	25
3.3 Preparação dos inóculos .....	25
3.4 Isolamento das estirpes produtoras de celulase .....	26
3.5 Suspensão de células fungicas .....	27
3.6 Estimativa qualitativa da atividade enzimática e taxa de crescimento dos fungos isolados.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
4.1 Estirpes isoladas .....	29
4.2 Avaliação e determinação da atividade enzimática.....	30
5. CONCLUSÃO .....	39
REFERÊNCIA.....	41

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas os avanços e inovações nos processos biotecnológicos vêm conquistando um lugar de destaque no desenvolvimento tecnológico mundial, principalmente por apresentar-se como uma alternativa mais econômica e de melhores condições operacionais em relação aos processos químicos convencionais, instigando assim o aumento nas pesquisas de tais processos e na descoberta de soluções para questões de interesse industrial (WANDERLEY; NEVES; ANDRADE, 2011).

Dentre as diferentes vertentes de pesquisa atuais da biotecnologia, as enzimas têm grande destaque, estes biocatalisadores já são hoje peças fundamentais em diferentes processos industriais, fato que os tornou um produto de altíssimo valor agregado (ARANTES; MILAGRES, 2009). Em consequência disso, as pesquisas que outrora estavam voltadas às aplicações, hoje priorizam o aperfeiçoamento das metodologias de síntese e extração de enzimas voltadas à indústria (CARDOSO, 2013).

Entre as diversas fontes microbiológicas de obtenção de enzimas com potencial de utilização em aplicações biotecnológicas, destacam-se os fungos e as bactérias. Isto se deve a dois importantes fatores: provável facilidade de purificação (quando a produção enzimática ocorre de forma extracelular) e possibilidade de produção recombinante (utilizando técnicas de clonagem gênica). De modo geral, as enzimas são utilizadas em uma grande variedade de indústrias, em diferentes segmentos, tais como: farmacêutica, alimentícia, têxtil, saponácea, papelaria, em processos de tratamentos de efluentes e resíduos industriais e na produção de biocombustíveis (THUMAR; SINGH, 2007; PEIXOTO-NOGUEIRA, 2009; WANDERLEY; NEVES; ANDRADE, 2011; BUTLER, 2004).

A celulase, proveniente de fungos, é uma das principais enzimas do grupo das lignocelulolíticas, sendo amplamente utilizada em diferentes ramos industriais. Atualmente em particular, tem atraído o interesse da indústria alcooleira, uma vez que atua como a principal enzima capaz de realizar a hidrólise enzimática da celulose,

promovendo a biodegradação desse polímero, convertendo o mesmo em açúcares menores, os quais são utilizados na fabricação de etanol. Com esta conversão, o que em outrora era resíduo, como o bagaço da cana de açúcar, rico em celulose, se torna matéria prima para a produção do chamado etanol de segunda geração (CASTRO; PEREIRA JÚNIOR, 2010).

A grande questão acerca da utilização de enzimas em qualquer processo industrial é quanto ao seu custo e sua obtenção. As enzimas comerciais possuem um elevado custo, o que por vezes tende a inviabilizar sua utilização por questões econômicas. Um grande exemplo é o processo de obtenção do etanol de segunda geração, processo no qual as enzimas utilizadas (onde uma das principais é a celulase) representam de 20 a 40 % do custo total de produção, quando o ideal seria que não ultrapassassem os 10% (MUZZATTO *et al.*, 2014).

Frente ao tema abordado, este trabalho vem com a proposta de isolar fungos com capacidade de produção endógena de celulase, explorando a vasta biodiversidade do reino Fungi, o qual se estima ter apenas 5% de um total aproximado de 1,5 milhões de espécies já classificadas (MUELLER; BILLS, 2004; ESPOSITO; AZEVEDO, 2010)

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Bioprospecção Microrganismos

Na procura por alternativas que possam reduzir custos e melhorar processos, muitos microrganismos foram identificados e introduzidos em diferentes ramos industriais, assim na busca por indivíduos mais eficientes e/ou com maior facilidade de obtenção, diferentes ecossistemas foram investigados com objetivos de explorar a biodiversidade da microbiota do mesmo (FACCHINI, 2010).

Segundo o inciso VII do artigo 7º da Medida Provisória n.º2.186-16/2001, bioprospecção é “qualquer atividade exploratória que visa identificar componente do patrimônio genético e informação sobre conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial” (BRASIL, 2011).

Assim como coloca Saccaro Júnior (2011) e Cardoso (2013) bioprospecção é a busca na natureza por organismos, voltado à procura de recursos genéticos e/ou bioquímicos, que possam ter um potencial econômico como produto ou na ação direta do processo.

### 2.2 Reino Fungi

O reino Fungi inclui os fungos, seres eucarióticos e heterotróficos, que podem apresentar reprodução assexuada, sexuada ou ainda realizar recombinação gênica. Os representantes deste reino abrangem uma expressiva gama de táxons, com ecologias, dinâmicas de ciclos de vida e morfologias variadas, qual vai desde indivíduos unicelulares a *Armillaria ostoyae* (maior espécie de fungo) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; LEITE et al., 2006).

### 2.3 Fungos

Os fungos desenvolvem um papel fundamental para a manutenção da vida na terra da forma como ocorre nos dias de hoje, uma vez que exercem atividades cruciais



como decomposição, ciclagem e transporte de nutrientes, sendo indispensáveis para o desenvolvimento sustentável, além do fato de algumas espécies serem necessariamente patógenas de plantas e animais, e outras realizarem simbioses obrigatórias com diversas espécies de plantas, algas, cianobactérias e animais (LEITE et al., 2006; ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

Como organismos eucariotos, os fungos diferem-se dos vegetais na forma de obtenção de nutrientes e pela composição de sua parede celular, a qual nos vegetais é composta basicamente por celulose e nos fungos por uma associação de quitina e glucana. Em comparação com os animais, tem-se que apesar de serem seres heterotróficos, os fungos realizam a digestão extracelular, pela ação de enzimas específicas, não possuindo estruturas digestoras específicas (JUNIOR; PEREIRA, 2007; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

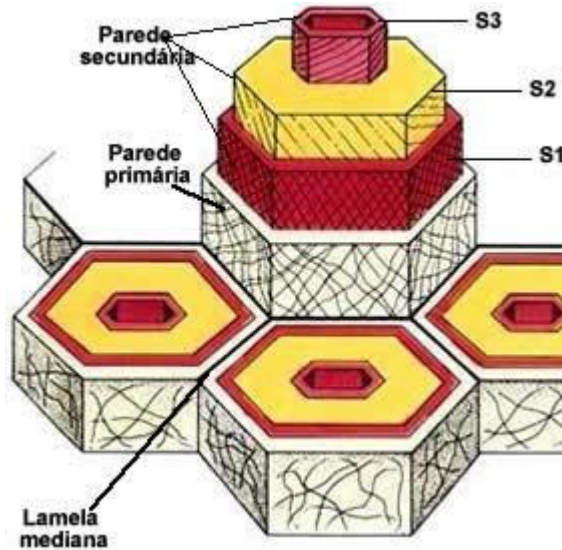
Abundantes em todo mundo, a maioria dos fungos passam despercebidos devido ao pequeno tamanho das suas estruturas somáticas, uma vez que de acordo com Tortora et al. (2012) os fungos podem obter os nutrientes necessários à existência por quimiorganotropia ao realizar a decomposição de matéria orgânica morta ou parasitismo, quando vive em associação com outro indivíduo.

Os fungos podem exercer efeitos positivos e negativos sobre as atividades humanas, no decorrer do desenvolvimento da criação tecnológica eles foram domesticados para uso na fabricação de cerveja, cozimento, fermentação industrial, farmacêutica, e indústrias de biotecnologia e outras espécies são cultivadas ou recolhidas para uso como alimento (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

## **2.4 Biomassa lignocelulósica**

De acordo com Carvalho et al. (2009) entende-se por biomassa lignocelulósica, estruturas constituídas por celulose, poliose (hemicelulose), lignina e pequenas quantidades de extrativos e sais minerais. Esses compostos associados e/ou ligados quimicamente constroem todo o complexo celular vegetal. A Figura 1 mostra um corte ilustrativo das camadas que compõem a parede celular, das quais se tem a celulose

como constituinte principal da parede primária (P) e as paredes secundárias (S1, S2 e S3).

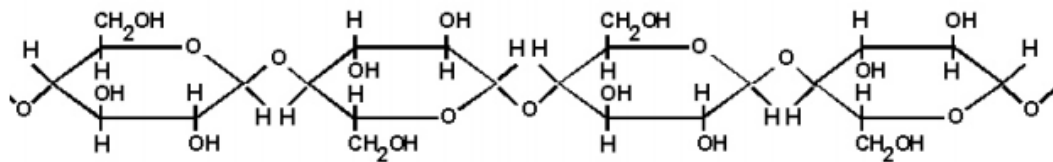


**Figura 1 – Corte ilustrativo do sistema de camadas na parede das células de madeira.**

Fonte: Raven; Evert; Eichhorn (2001)

## 2.5 Celulose

A celulose, de forma molecular mostrada na Figura 2, é o componente mais abundante entre os lignocelulósicos, como descreve Carvalho et al. (2009) e Luz, Gonçalves e Del'Arco Júnior (2006), trata-se de um homopolímero linear composto de unidades de glucose (parte amorfo e parte cristalino), unidas entre si através de ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), fato promove elasticidade um módulo de elasticidade alto.

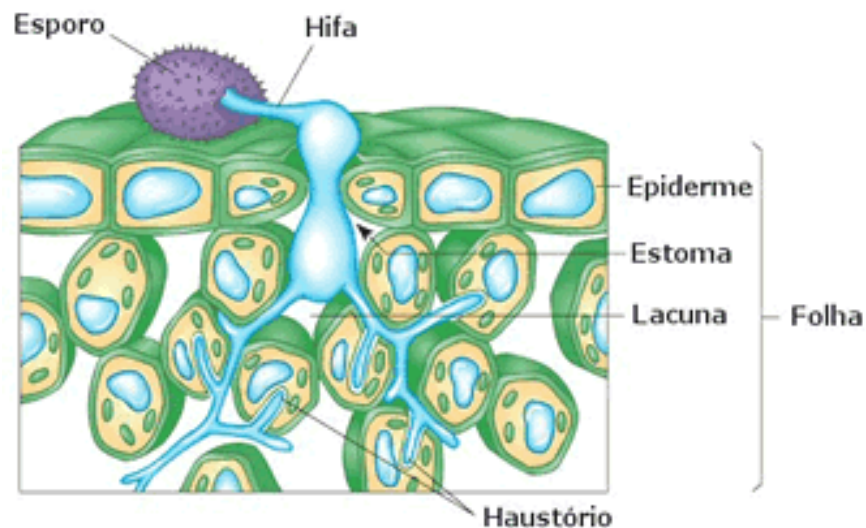


**Figura 2 – Estrutura de um fragmento de celulose.**

Fonte: Luz; Gonçalves; Del'Arco Jr (2006)

## 2.6 Biodegradação de materiais lignocelulósicos

O processo de biodegradação de materiais lignocelulósicos é iniciado com a penetração de filamentos celulares (hifas) dos fungos, através do lúmen da célula vegetal (PEIXOTO-NOGUEIRA, 2009). Para se estabelecer, como explica Bhat (2000) e Arantes e Milagres (2009), o fungo em contato com o meio favorável ao seu crescimento, inicia a secreção de diferentes enzimas e compostos de baixa massa molar, que promovem a despolimerização da parede celular vegetal em moléculas menores, tornando-as passíveis de serem transportadas pela membrana plasmática e de sofrerem metabolismo intracelular (Figura 3).



**Figura 3 – Ação da hifa fungica através lúmen da célula vegetal**  
**Fonte: Santos et al. (2013)**

Os micro-organismos mais efetivos na biodegradação dos materiais lignocelulósicos na natureza são os fungos de decomposição branca (white-rot fungi) e os de decomposição parda/castanha (brown-rot fungi). (CARVALHO et al. 2009).

Segundo Arantes e Milagres (2009) a degradação das estruturas lignocelulósicas é dada pela ação de grupos de enzimas que atuam sinergicamente. Esses grupos de enzimas compreendem as endo-1,4- $\beta$ -glucanase, 1,4- $\beta$ -glicosidase e exo-1,4- $\beta$ -

glucanase, as quais atuam nas regiões cristalinas da celulose realizando a quebra de ligações glicosídicas, resultando na liberação de glucose e celobiose.

As enzimas lignocelulolíticas são de elevada dimensão molecular, o que impede que essas penetrem com facilidade na parede celular da madeira, elevando assim o tempo necessário para ocorrer o processo de biodegradação. Este fato expressa a presença de outros agentes não enzimáticos de baixa massa molecular ligados à degradação da celulose, dentre os quais: ácidos carboxílicos (ácido oxálico), peptídeos e compostos fenólicos redutores de  $Fe^{+3}$  (BHAT, 2000; PEIXOTO-NOGUEIRA, 2009).

## **2.7 Aplicações biotecnológicas das celulasas**

As celulasas são utilizadas em diversas aplicações biotecnológicas. Na indústria têxtil, essas enzimas são usadas para melhorar o acabamento aos tecidos, atuando na degradação das fibras da superfície do tecido, compostas basicamente por celulose. Este tipo de enzima também é utilizada no processo de envelhecimento do jeans, através da remoção parcial do corante índigo (LIMA et al., 2005).

Utilizadas na indústria de bebidas para produção de sucos de frutas e nos processos de vinificação. As celulasas facilitam o rompimento da rede celulose, responsável por reter o líquido das células vegetais, contribuindo para a extração de sucos e a maceração para produção de néctares de frutas. Na produção de vinhos, as enzimas celulolíticas degradam compostos de sabor desagradável, liberando substâncias flavorizantes, melhorando o aroma e o sabor do vinho (CASTRO; PEREIRA JÚNIOR, 2010).

As celulasas também exercem papel importante na nutrição animal, uma vez que ao serem incorporadas à ração animal, essas enzimas artificiais juntamente com as celulasas produzidas pelos próprio microorganismos presentes no rúmen do animal, atuam na degradação celulósica de maneira mais abrangente facilitando a digestão das fibras da parede celular vegetal, melhorando as taxas de absorção nutrientes dos animais (MARTINS et al. 2008)

Na fabricação de detergentes, as celulases geram uma melhor limpeza e menor desgaste dos tecidos, e na indústria de polpa e papel, melhoram a qualidade do papel, tornando-o mais branco e liso, além de melhorar o rendimento da poupa (LIMA et al., 2005).

Entretanto, segundo Castro e Pereira Júnior (2010), o interesse por essas enzimas tem aumentado muito devido a sua utilização no processo de produção de etanol a partir de biomassa residual de origem vegetal como bagaço e palha de cana, talos, sabugo e palha de milho, cascas de arroz e demais grãos, além de restos de madeiras, chamados materiais lignocelulósicos. O estudo e aplicação de enzimas celulolíticas na produção de etanol foi o responsável pelo surgimento do chamado “Etanol de segunda geração”, o biocombustível produzido através da fermentação dos açúcares obtidos pela decomposição da parede celular vegetal promovida pela ação catalítica das celuloses, transformando o que outrora era um resíduo da agroindústria em matéria prima.

## **2.8 Furnas Gêmeas**

Popularmente conhecidas como Furnas Gêmeas, estas duas dolinas localizadas a poucos quilômetros da região central do município de Ponta Grossa recebem os nomes de Furna Passo do Pupo 1 e Furna Passo do Pupo 2, áreas pertencentes ao Parque Nacional dos Campos Gerais segundo Cadastro Nacional de Cavernas (CNC) e da Sociedade Brasileira de Espeleologia (SBE) (FLÜGEL, GUIMARÃES e PONTES, 2011).

Devido à maior facilidade de acesso ao seu interior, a furna escolhida para coleta das amostras será a Furna Passo do Pupo 1. Com diâmetro variando entre 47 e 93 metros, e uma profundidade total de aproximadamente 38 metros, esta dolina conta com pouco mais de um hectare de área coberta por solo vegetal, sendo o restante de sua área interna total, coberto por rochas (PONTES et al., 2012).

Estas áreas contam com a vegetação característica do estado do Paraná, a Mata das Araucárias, e por serem áreas que não sofreram grandes alterações antrópicas,

sendo a área de plantação mais próxima presente a uma distância superior a 100m, possuem sua biodiversidade microbiana praticamente intacta. Assim, por ser um tipo de solo jovem que sofreu baixa ação antrópica, trata-se de um campo único de exploração, ideal para realização da bioprospecção microbiológica (FLÜGEL, GUIMARÃES e PONTES, 2011; SACCARRO JÚNIOR, 2011; CARDOSO, 2013).

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Coleta das amostras de solo

As coletas das amostras de solo foram realizadas em 14 de abril de 2015, data que de acordo com Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) apresentou desvios de precipitações (80 mm) e de temperatura (-0,5 °C) abaixo das médias históricas, na Furna do Passo do Pupo 1 – coordenadas: 25°08'49"S 49°57'22"W, temperatura média 23°C e altitude: 1037m – a aproximadamente 23 km do centro do município de Ponta Grossa – PR (Figura 4).



**Figura 4 – Localização das Dolinas Gêmeas**  
**Fonte: Google Earth, 2015.**

Localizada sobre a região denominada de Geossítio do Sumidouro Córrego das Fendas, que consiste de um sistema subterrâneo localizado no Segundo Planalto Paranaense desenvolvido em rochas da Formação Furnas (Siluriano/Devoniano). A referida unidade é constituída predominantemente por arenitos de granulometria média



a grossa, com grãos angulosos e subangulosos e intercalações de níveis síltico-argilosos, apresentando estratificação cruzada planar, tangencial na base ou acanalada. A gênese das feições que caracterizam esses tipos de estruturas geológicas está relacionada com os processos intempéricos e erosivos na rocha (erosão química, física e biológica) (Fotografia 1) (FRANTZ, CARREIRO E SILVA, 2011).



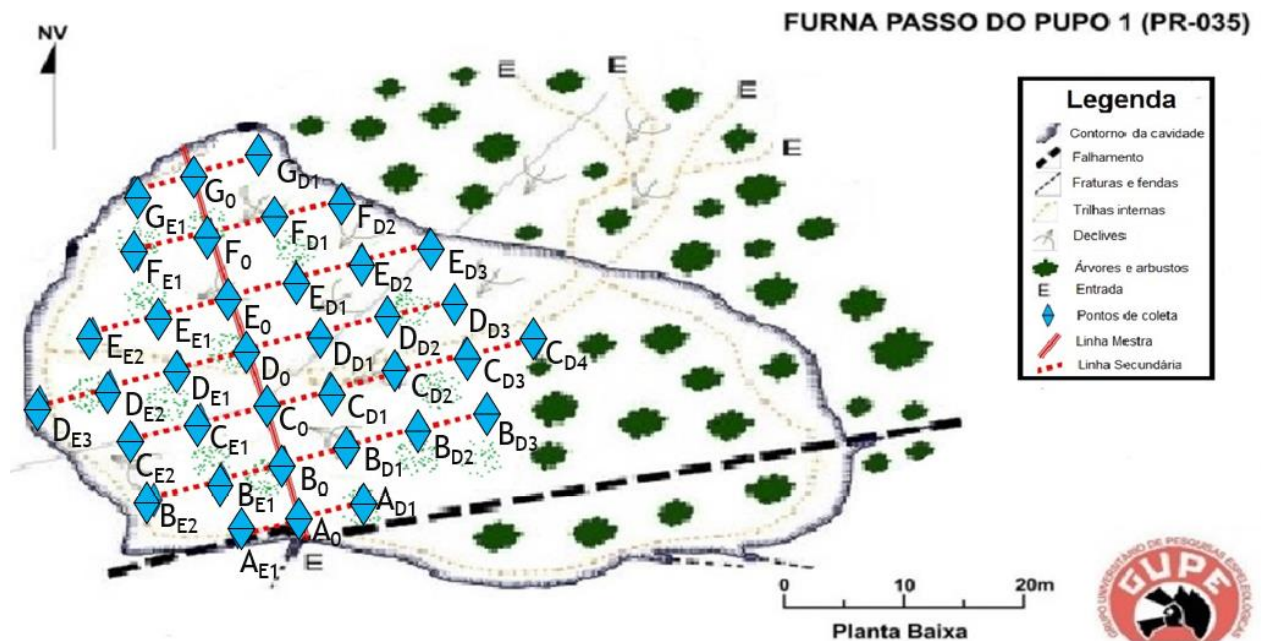
**Fotografia 1 – Furna do Passo do Pupo 1**  
**Fonte: Autoral, 2015.**

A partir da adaptação da metodologia de coleta sugerida por Teixeira et al. (2011), o qual relata que em métodos clássicos de pesquisa voltadas a apresentação de um perfil aproximado dos fungos geofílicos ou transitórios da área avaliada é previsto a delimitação de 30 pontos de amostragem para cada 1.000 m<sup>2</sup> de área. Assim, a partir de uma estimativa *in loco* da área real de coleta de aproximadamente 1216 m<sup>2</sup>, levando em consideração as limitações singulares de conformação geológicas encontradas na furna, fez-se um total de 36 pontos de coleta, esses quais tiveram a temperatura aferida individualmente no momento da coleta para a estimativa da temperatura média de incubação para isolamento das estirpes promissoras.

Efetivou-se a coleta das amostras utilizando-se de espátulas esterilizadas, transportadas em tubos falcom de 50 mL também estéreis com o auxílio de uma caixa térmica higienizada para o traslado entre a Furna do Passo do Pupo 1 e a Universidade Tecnológica Federal do Paraná campus Ponta Grossa, assim alocadas

em uma estufa com temperatura controlada a 20°C, temperatura média do solo nos pontos de coleta aferidas logo após efetuar o procedimento, com ausência de luz.

O perfil de coleta das 36 amostras foi estimado com objetivo de cobrir toda a área real de coleta, para isso estimou-se qual seria o maior diâmetro real da furna – aproximadamente 60 m –, denominando-o de *Linha Mestra*, essa dividida em 7 pontos dos quais, adaptando-se as particularidades do terreno, ramificaram-se os pontos subsequentes de acordo com a Figura 5.



**Figura 5 – Representação esquemática do perfil de coleta na Furna Passo do Pupo 1 (PR-035)**

**Fonte: Adaptação de Frantz, Carreiro e Silva (2011)**

Cada amostra foi coletada a aproximadamente 10 cm de profundidade, utilizando-se de espátulas metálicas e tubos Falcon de 50 mL, ambos esterilizados de forma a evitar a contaminação das amostras (Teixeira et al., 2011). Com o objetivo de garantir a coleta de mínimo 1g de solo foi determinado de acordo com um teste de realizado em bancada, anteriormente a coleta, que seria coletada uma quantidade suficiente para completar no mínimo a metade do tubo Falcon.



### 3.2 Meio de crescimento

Com o objetivo de avaliar o crescimento das possíveis linhagens fúngicas presentes nas amostras de solo coletadas utilizou-se o meio de cultura composto pela Solução de Manachini (MANACHINI; FOTINA; PARINI, 1987), de acordo com a composição apresentada na Tabela 1 para 1000 mL de solução, suplementada com carboximetilcelulose (CMCA) 0,5% (p/v) (SOUZA et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2011; SANTOS et al., 2013).

Tabela 1 - Composição do Meio de Cultura

Composto	Quantidade
Fosfato monopotássico - $\text{KH}_2\text{PO}_4$	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 fostato 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
Agar	18,0 g

Fez-se o preparo do meio de cultura a partir da solubilização de todos os compostos apresentados na Tabela 1, utilizando-se de aquecimento e agitação elétrica padronizado a um pH 5,0 a partir de uma solução tampão de acetato de sódio e assim esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos (TEIXEIRA et al., 2011).

Com o meio de cultura esterilizado utilizando-se da Câmara de Fluxo Laminar Vertical para adicionar 8 mL da solução às Placas de Petri, suficiente para se obter uma lamina de 8 mm, deixando-as resfriar até a temperatura ambiente e assim acondicionando-as fechadas em uma estufa à 26°C, temperatura sugerida por Teixeira et al (2011) para estimular a produção enzimática de fungos geófilos e/ou de liteira, com ausência de luz para a incubação.

### 3.3 Preparação dos inóculos

A preparação dos inóculos foi efetuado após 24 horas a coleta das amostras em campo, onde utilizou-se das amostras coletadas para realização da Técnica de Diluição

Sucessiva do substrato a  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ , sugerida por Teixeira et al. (2011) para isolar fungos geófilos e/ou de liteiras, onde fez-se o preparo das diluições dentro da Câmara de Fluxo Laminar Vertical com o objetivo de obter um ambiente para manipulação das amostras estéreo.

Para a diluição  $10^{-1}$  utilizou-se 1g de substrato e 9 mL de água destilada esterilizada. Dessa retirou-se 1mL de solução e acrescentou-se 9 mL de água destilada para obter-se a diluição  $10^{-2}$ , ambas agitada por 10 minutos em um Agitador Vortex (TEIXEIRA et al., 2011).

Utilizando-se das diluições preparadas, fez-se a inoculação nos meios de cultura – previamente preparados como descrito anteriormente – com a adição de 1 mL das diluições, realizando o espalhamento por toda a superfície da placa de Petri com o auxílio de uma Alça de Drigalsk, perfazendo-se assim os inoculos primários que foram utilizados posteriormente para o isolamento das estirpes produtoras de celulase

As placas inoculadas foram incubas por 7 dias a  $20^{\circ}\text{C}$  em estufa com ausência de luz para sucessiva observação do crescimento microbiano e isolamento das estirpes produtoras de celulase (TEIXEIRA et al., 2011; AUER et al., 2014)

### **3.4 Isolamento das estirpes produtoras de celulase**

Após 7 dias da primeira inoculação das soluções diluídas inarciar-se-á o processo de isolamento das colônias fungicas, que consistirá na revelação dos halos de hidrólise, seleção dos fragmentos significativos e a transferência para a superfície do meio de cultivo sólido, o mesmo utilizado no inoculo primário, mantendo as mesmas exigências nutricionais e de acondicionamento (Teixeira et al., 2011).

Fez-se a revelação dos halos de hidrólise dentro da Câmara de Fluxo Laminar a partir da Técnica de revelação da Atividade Enzimática, sugerida por Kasana et al (2008) voltada a expressão da atividade enzimática da celulase, assim adicionou-se 8mL da solução de Vermelho do Congo 0,1% (p/v) ao meio de cultura, deixada em

repouso por 20 minutos. Descartou-se essa e lavando-a com uma solução de NaCl 1M, também deixada em repouso por 20 minutos.

A constatação da presença de colônias fungicas produtoras de enzimas celulolíticas fez-se pelo contraste da coloração vermelha no meio sólido, observada pela formação de halos translúcidos formados ao redor das colônias. Essas quais utilizando-se da adaptação da Técnica de Semeadura por Estrias, também denominada de Técnica de Esgotamento de Alça, fez-se a transferência das colônias reveladas a partir da coleta de uma pequena quantidade de amostra, estriando o material de uma borda a outra da placa de Petri percorrendo o fio de platina continuamente (DROVAL; LIMA; HABU, 2001; TEIXEIRA et al., 2011).

Os meios incubados foram devidamente identificados e incubadas novamente por 7 dias em estufa com ausência de luz a temperatura de 20°C, procedimento denominado de Repique, esse procedimento foi efetuado sucessivas vezes, onde as amostras que foram replicadas respeitaram critérios de seleção, tais como: tamanho aparente do halo, integridade e singularidade da colônia até resultar em um meio de cultura que fosse possível identificar visualmente a presença de somente uma colônia fungica isolada.

### **3.5 Suspensão de células fungicas**

A partir das estirpes isoladas, utilizou-se da adaptação da metodologia de preparo de suspensões de esporos, sugerida por Alvez e Faria (2010), para garantir a melhor homogeneização do número de células fungicas, posteriormente inoculadas no meio sólido para avaliação da atividade enzimática através do crescimento do microrganismo.

O procedimento, efetuado dentro da Câmara de Fluxo Laminar Vertical, consistiu-se da raspagem por meio de espátulas esterilizadas da superfície dos meios de culturas isolados, buscando não danificar o gel e o transplante de todo o material celular para

micro tubos Eppendorf de 2mL esterilizados, completados com água ultrapura milli-q até 1,5mL e agitados por meio de Agitador de tubo tipo Vortex por 2 minutos.

### 3.6 Estimativa qualitativa da atividade enzimática e taxa de crescimento dos fungos isolados

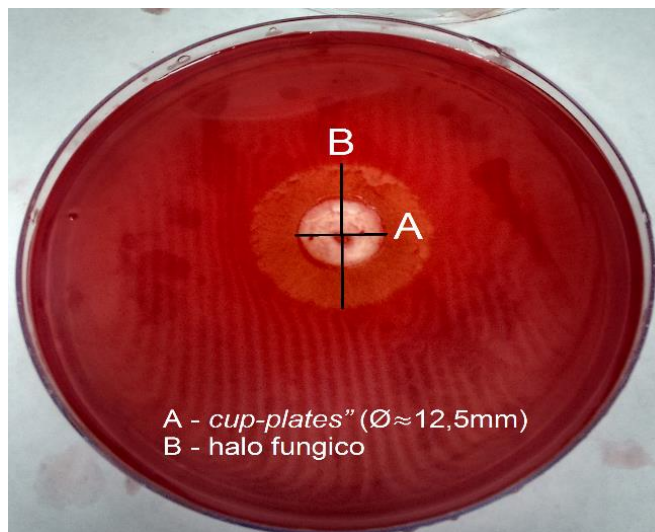
A avaliação da atividade enzimática fez-se qualitativamente através do monitoramento e registro do crescimento do microrganismo em meio sólido, em que a inoculação do fragmento fungico foi feita a partir da suspensão de células fungicas, possibilitando a determinação do índice enzimático ( $I_E$ ) de cada estirpe conforme Teixeira *et al.* (2011) pela formula:

$$I_E = \frac{\text{Diâmetro do halo (mm)}}{\text{Diâmetro do poço (mm)}}$$

A metodologia utilizada consistiu-se da inoculação em “*cup-plates*” ( $\varnothing \approx 12,5\text{mm}$ ) de 0,2mL da suspensão de esporos de cada amostra a cinco meios de culturas com a mesma composição, esses identificados e incubados a 26°C. Como o processo de incubação foi efetuado excepcionalmente em um domingo, fez-se a identificação dos meios de cultura seguindo os dias que sucederiam as revelações (segunda (Se), terça (Tr), quarta (Qr), quinta (Qi) e sexta (Sx)) no decorrer de 120 horas, sendo assim a cada 24 horas fez-se a avaliação do crescimento da colônia e da atividade enzimática (FOTOGRAFIA4), utilizando-se da mesma Técnica de revelação da Atividade Enzimática descrita posteriormente, fez-se o registro dos diâmetro dos halos translúcidos de hidrólise e dos poços com auxílio de um paquímetro (Teixeira *et al.*, 2011).

Com o registro do diâmetro dos halos translúcidos, fez-se a determinação da taxa de crescimento das colônias fungica ( $T_c$ ) a partir da razão entre o crescimento dos halos fungicos pelo tempo de incubação (24, 48, 72, 96 e 120 horas) de acordo com a formula abaixo, em que o diâmetro do halo fungico somente foi considerado como positivo, se fosse evidenciado na etapa de revelação que esse ultrapassou o limite da borda do “*cup-plates*, como na Fotografia 2.

$$T_c = \frac{\text{Diâmetro do halo (cm)}}{\text{Tempo de incubação (dia)}}$$



**Fotografia 2 – Exemplo das cotas tomadas de uma cepa após a etapa de revelação**

**Fonte: Autotal, 2015.**

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

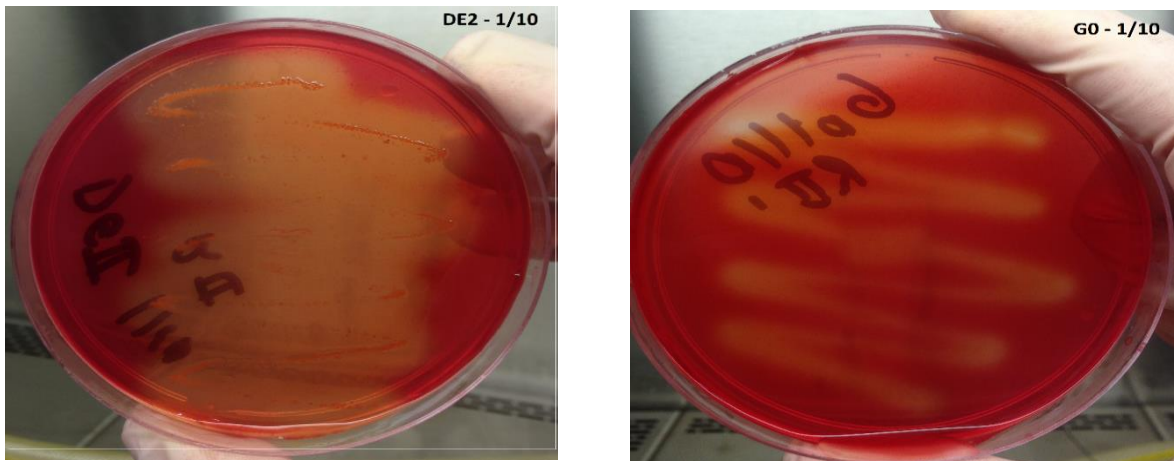
### 4.1 Estirpes isoladas

Seguindo os critérios anteriormente descritos para segregação das estirpes produtoras de celulase, obteve-se um total de 11 estirpes isoladas, as quais derivaram de 5 pontos distintos, apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2 - Pontos isolados e ocorrência**

N°	Ponto	N° de isolados	Ocorrência no ponto (%)
11 e 9	BE1	2	18,18
1	CE2	1	9,09
6	DD2	1	9,09
3	DE1	1	9,09
7 e 10	DE2	2	18,18
2, 4, 5 e 8	Go	4	36,36

Importante salientar que todas as estirpes selecionadas foram derivadas de inoculos feitos a partir da diluição  $10^{-2}$  (Fotografia 3), uma vez que de acordo com os critérios de segregação todas as amostras provenientes da inoculação de diluição  $10^{-1}$  foram descartadas no 3º Repique devido à grande contaminação de fungos do gênero *Penicillium sp.*, fato que inviabilizava o repique das amostras sem o arraste do contaminante.



**Fotografia 3 – Exemplo das estirpes isoladas após a etapa de revelação com a solução Vermelho do Congo 0,1% (p/v): DE2 ( $10^{-1}$ ) e G0 ( $10^{-1}$ )  
Fonte: Autoral, 2015**

#### **4.2 Avaliação e determinação da atividade enzimática**

Existem diferentes metodologias voltadas à avaliação e determinação da atividade enzimática por difusão radial em meio sólido (STAMFORD, ARAÚJO & STAMFORD (1998); FRANTZ, CARREIRO & SILVA (2014); AUER et al. (2014)). Os fatores determinantes que viabilizam esta seleção incluem a correlação direta entre o tamanho do halo com a capacidade degradativa dos microrganismos, em que Teixeira et al. (2011), Lima (2006) e Soares et al. (2010) recomendam um valor do índice de atividade enzimática (IE)  $\geq 2,0$  como demonstrativo da capacidade do microrganismo em degradar a celulose em meio sólido devido a secreção enzimática extracelular. A Tabela 3 apresenta a atividade enzimática das cepas isoladas avaliadas no decorrer de cinco dias, de acordo com as condições de acondicionamento descritas anteriormente.

**Tabela 3 - Atividade enzimática das estirpes isoladas incubadas em meios sólidos suplementado com CMCA por 5 dias a 22 °C na ausência de luz.**

ID	Segunda-feira			Terça-feira			Quarta-feira			Quinta-feira			Sexta-feira		
	Halo (cm)	Poço (cm)	Índice Enzimático (I <sub>E</sub> )	Halo (cm)	Poço (cm)	Índice Enzimático (I <sub>E</sub> )	Halo (cm)	Poço (cm)	Índice Enzimático (I <sub>E</sub> )	Halo (cm)	Poço (cm)	Índice Enzimático (I <sub>E</sub> )	Halo (cm)	Poço (cm)	Índice Enzimático (I <sub>E</sub> )
1 CE2	2,39	1,19	2,01	3,2	1,29	2,48	5,7	1,3	4,38	7,1	1,25	5,68	8,15	1,25	6,52
2 G0	0	1,21	0	0	1,29	0	3,2	1,3	2,46	5,6	1,25	4,48	6,35	1,25	5,08
3 DE1	2,49	1,21	2,06	4,4	1,29	3,41	5,75	1,2	4,79	7	1,25	5,6	8,15	1,25	6,52
4 G0	2,7	1,25	2,16	3,9	1,2	3,25	5,1	1,25	4,08	7,7	1,25	6,16	7,7	1,25	6,16
5 G0	2,4	1,21	1,98	4,35	1,25	3,48	6,1	1,3	4,69	6,6	1,25	5,28	7,2	1,25	5,76
6 DD2	2,5	1,25	2	4,5	1,25	3,6	4,5	1,3	3,46	6,75	1,25	5,4	7,5	1,2	6,25
7 DE2	2,58	1,29	2	4,61	1,3	3,55	6,05	1,25	4,84	6,65	1,25	5,32	8,6	1,25	6,88
8 G0	2,75	1,29	2,13	4,48	1,2	3,73	6,1	1,3	4,69	7,65	1,3	5,88	8,6	1,2	7,17
9 BE1	2,09	1,19	1,76	3,5	1,25	2,8	4,2	1,3	3,23	4,25	1,25	3,4	4,5	1,25	3,6
10 DE2	2,38	1,29	1,84	3,8	1,25	3,04	4,1	1,29	3,18	5,75	1,3	4,42	6	1,25	4,8
11 BE1	2,7	1,29	2,09	4,55	1,25	3,64	6,55	1,29	5,08	6,6	1,3	5,08	8,6	1,25	6,88

Como já foi citado, na literatura pode-se encontrar inúmeros trabalhos voltados a avaliação da capacidade de fungos de diferentes gêneros em produzir celulase, esses quais provenientes das mais diferenciadas fontes. Para que um microrganismo se firme e se desenvolva em um determinado local, este necessariamente precisa ser capaz de utilizar dos recursos a sua disposição para prover a sua existência. Assim pode-se estabelecer que de acordo com a disponibilidade de um recurso específico no meio, maior será o número de indivíduos que podem ser encontrados nesse local que compartilham da mesma dependência por esse insumo.

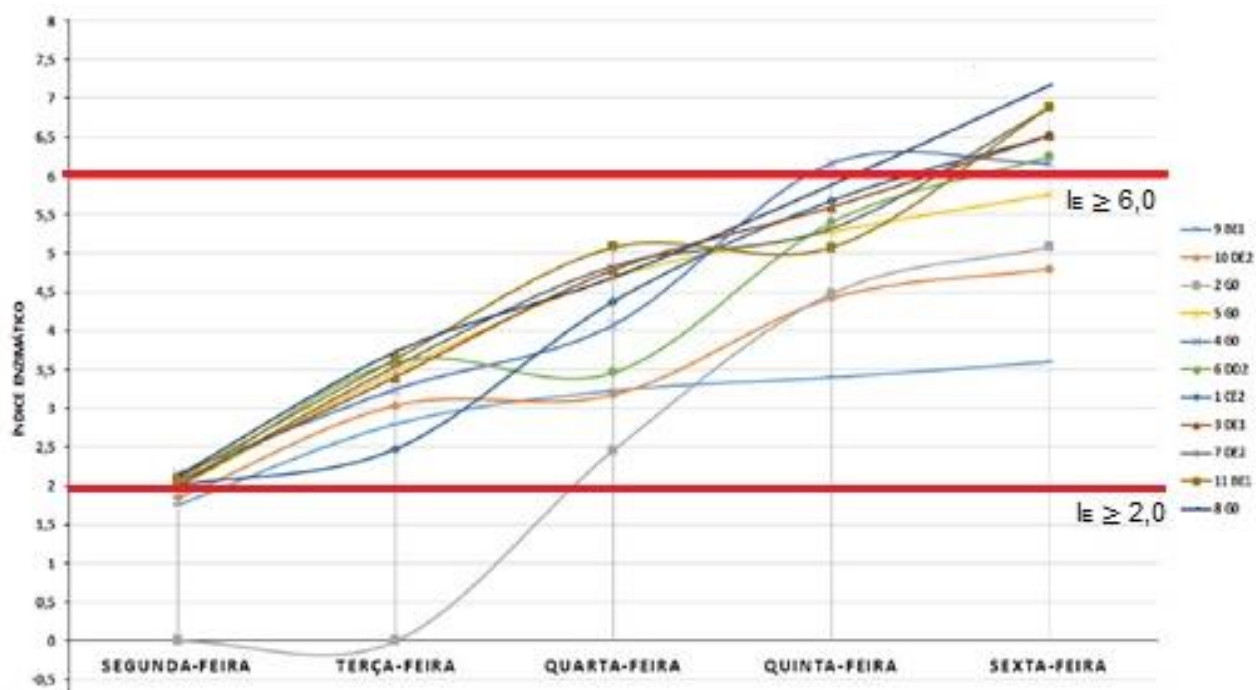
Neste contexto temos Fernandes (2009), que avaliou 24 cepas de fungos isolados de diferentes fontes alimentícias (amendoim, embutido de carne, pães e câmara de maturação de queijos) a respeito da capacidade dessas em produzir celulase, obteve 6 que apresentaram  $I_E \geq 2,0$  (25% das cepas analisadas) com o maior valor encontrado de 5,83. Herculano et al. (2011) encontrou 56 cepas de fungos capazes de produzir celulase de 189 cepas obtidas de resíduos de mamona, em que destes somente 15 apresentaram  $I_E \geq 2,0$  (28,5% das cepas analisadas), sendo que o maior índice encontrado foi de 6,0. Já Ruegger e Tauk-Tomisielo (2004) após testar 80 fungos de solo, obteve 36 indivíduos com  $I_E \geq 2,0$  (45% dos indivíduos analisados) com  $I_E$  máximo de 6,0 e Frantz, Carreiro & Silva (2014) ao analisarem 89 cepas provenientes de folhas em decomposição – fonte abundante de celulose – encontraram 65 cepas capazes de produzir celulase (65,7% das cepas analisadas), com índices enzimáticos que chegaram a 8,57, confirmando a relação existente entre a disponibilidade de um recurso específico, no caso a celulose, com a provável ocorrência de indivíduos tenham expressado a capacidade de hidrolisar esse polissacarídeo presente no meio.

Outro exemplo que pode ser encontrado na literatura é o trabalho de Duncan et al (2008), os quais avaliaram a atividade enzimática de fungos encontrados na Antártica – local com menor disponibilidade de celulose quando comparado com a serapilheira de uma vegetação da Mata Atlântica – em que a ocorrência de fungos capazes de expressar a produção de celulase foi de 11% das cepas analisadas,



mas em contraponto foi nesse ambiente em que foi encontrado cepas os maiores índices enzimáticos, com  $I_E \approx 11,0$ , fato que aponta uma provável seleção natural por indivíduos que apresentam um processo mais eficiente devido à escassez do recurso no local.

Quando comparamos os valores encontrados nesse trabalho com a literatura, observamos que todas 11 estirpes isoladas caracterizaram-se como fungos com boa capacidade produtora de celulase, uma vez que todas apresentaram  $I_E \geq 2,0$  após os cinco dias de incubação com ausência de luz a 20°C. Em que 4 cepas (G0 (2), G0 (5), BE1 (9) e DE2 (10)) apresentaram valores inferiores a 6,0, variando o  $I_E$  de 3,6 a 5,78, e 7 cepas (CE2 (1), DE1 (3), G0 (4), DD2 (6), DE2(7), G0 (8) e BE1 (11)) apresentaram  $I_E \geq 6,0$ , variando o  $I_E$  de 6,16 a 7,17, resultados que as enquadram como excelente produtoras de celulase de acordo com Frantz, Carreiro & Silva (2014), Auer et al. (2014) e Frantz, Carreiro & Silva (2014) (GRÁFICO 1).



**Gráfico 1 - Atividade enzimática das estirpes isoladas, cultivadas em meios sólidos suplementado com CMCA por 5 dias a 22 °C.**

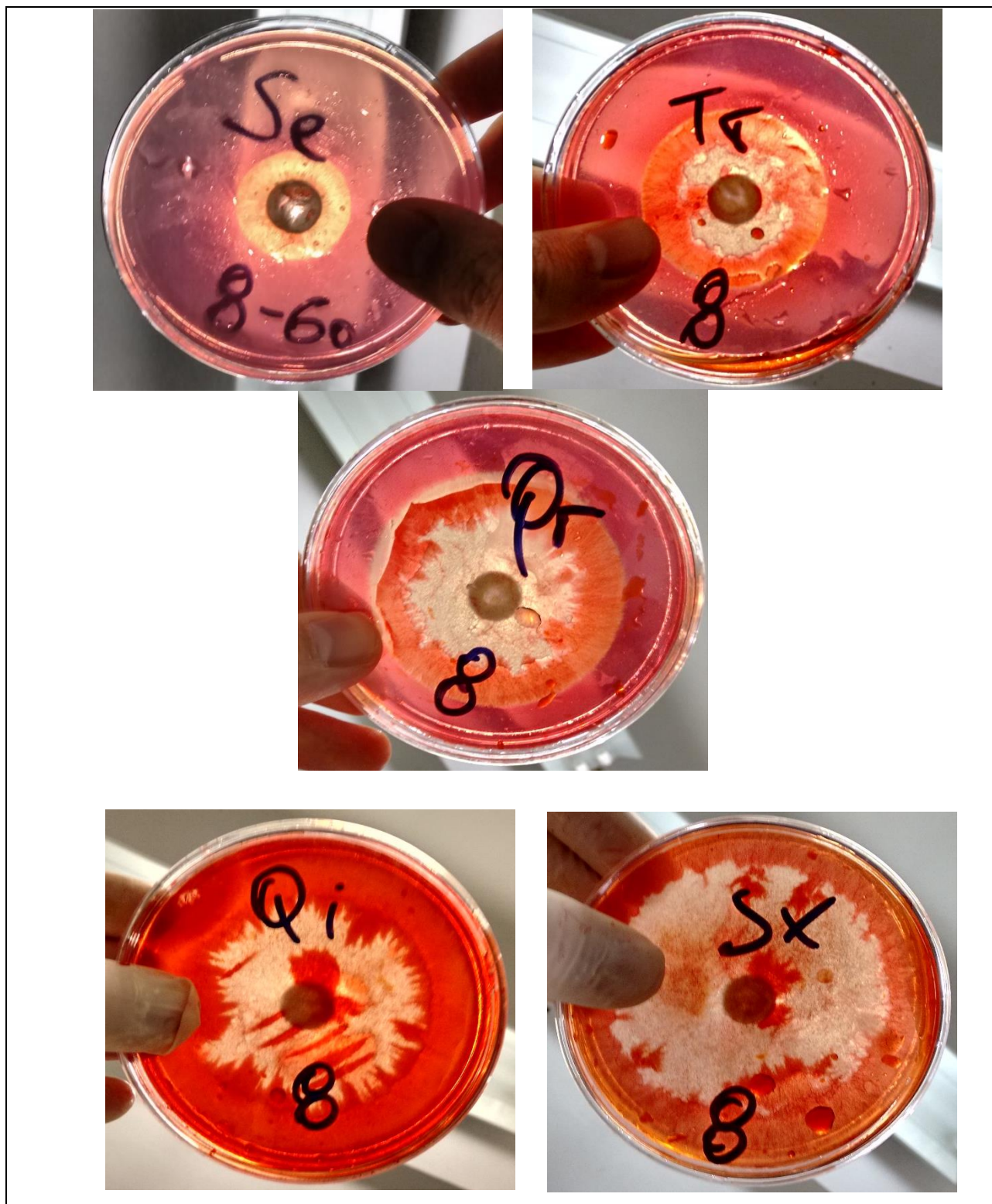
Importante colocar que a avaliação da atividade enzimática das amostras G0 (8), DE2 (7) e BE1 (11), as quais apresentaram os maiores  $I_E$  7,17, 6,88 e 6,88

respectivamente, sofreram uma limitação metodológica devido ao fato que essas cepas apresentaram no final do 5º dia de monitoramento o diâmetro do halo fungico com o mesmo diâmetro placa de Petri.

A taxa de crescimento das colônias fungicas foi estimada juntamente com a atividade enzimática, a Tabela 4 apresenta as Taxas de crescimento das colônias ( $T_c$ ), no decorrer de 5 dias a 26°C na ausência de luz (Fotografia 3), dada em cm/dia.

**Tabela 4 – Taxa de crescimento das colônias fungicas no período de incubação, a 22°C no decorrer de 5 dias.**

ID	Segunda-feira	Terça-feira	Quarta-feira	Quinta-feira	Sexta-feira
	Taxa de crescimento da colônia (cm/dia)	Taxa de crescimento da colônia (cm/dia)	Taxa de crescimento da colônia (cm/dia)	Taxa de crescimento da colônia (cm/dia)	Taxa de crescimento da colônia (cm/dia)
1 CE2	0,12	0,107	0,143	0,142	0,136
2 G0	0	0	0,08	0,112	0,106
3 DE1	0,125	0,147	0,144	0,14	0,136
4 G0	0,135	0,13	0,128	0,154	0,128
5 G0	0,12	0,145	0,153	0,132	0,12
6 DD2	0,125	0,15	0,113	0,135	0,125
7 DE2	0,129	0,154	0,151	0,133	0,143
8 G0	0,138	0,149	0,153	0,153	0,143
9 BE1	0,105	0,117	0,105	0,085	0,075
10 DE2	0,119	0,127	0,103	0,115	0,1
11 BE1	0,135	0,152	0,164	0,132	0,143



Fotografia4 – Exemplo da avaliação do crescimento e da atividade enzimática da cepa 8 G0 no decorrer de 120 hora incubada a 26°C na ausência de luz  
Fonte: Autoral, 2015.

Avaliando as taxas de crescimento das colônias fungicas encontradas nesse trabalho, dada em cm/dia, temos que algumas cepas apresentaram perfis de crescimento similares com variações dos ápices e declínio das taxas de crescimento, em que as amostras DE1 (3), DD2 (6), DE2 (7), BE1 (9) e DE2 (10) (GRÁFICO 4, 7, 8, 10 e 11 respectivamente) apresentaram o ápice da taxa de crescimento no 2º dia de avaliação, CE2 (1), G0 (5), CE2 (11) (Gráfico 2, 6 e 12 respectivamente) no 3º dia e G0 (4) e G0 (8) (Gráfico 5 e 9 respectivamente) no 4º dia.

Partindo do princípio de que todas as cepas foram submetidas as mesmas condições de incubação, tem-se a cepa G0 (2) que apresentou o início do crescimento da colônia fungica somente depois das primeiras 48 horas (Gráfico 3), evidenciado pela taxa de crescimento igual a zero, fato ligado ao maior período de aclimatação dos indivíduos que compõem essa estirpe.

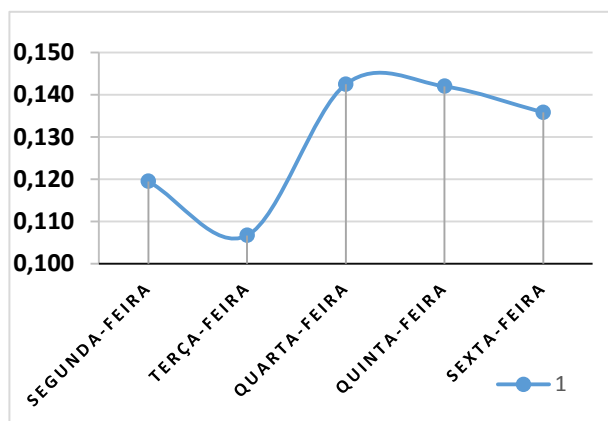


Gráfico 2 - Taxa de Crescimento (cm/dia) da Colônia CE2 (1)

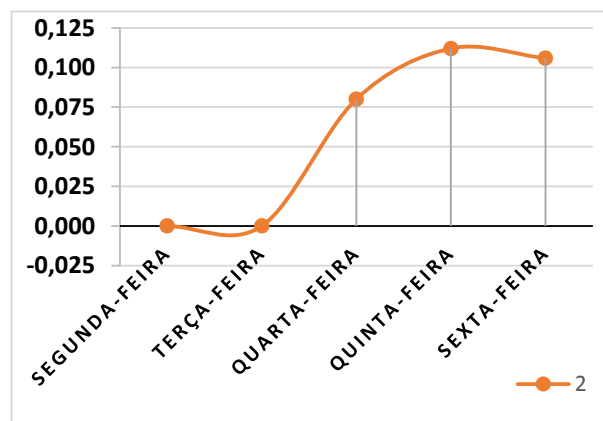


Gráfico 3 - Taxa de Crescimento (cm/dia) da Colônia G0 (2)

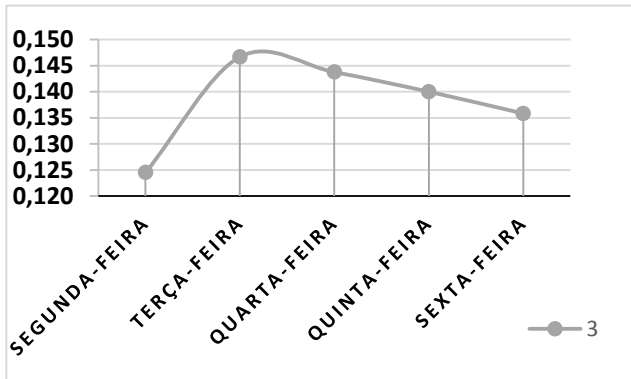


Gráfico 4- Taxa de Crescimento (cm/dia) da Colônia DE1 (3)

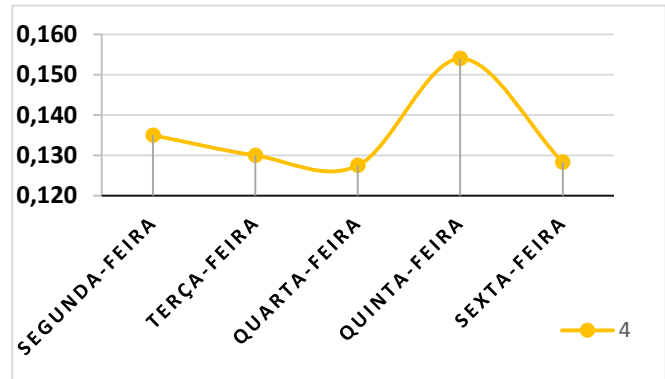


Gráfico 5 -Taxa de Crescimento (cm/dia) da Colônia G0(4)

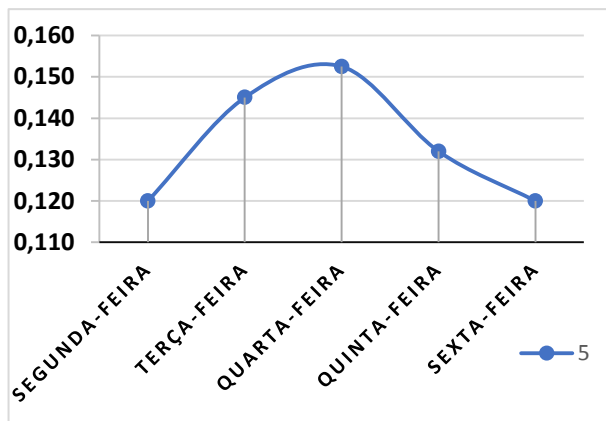


Gráfico 6 - Taxa de Crescimento (cm/dia) da Colônia G0 (5)

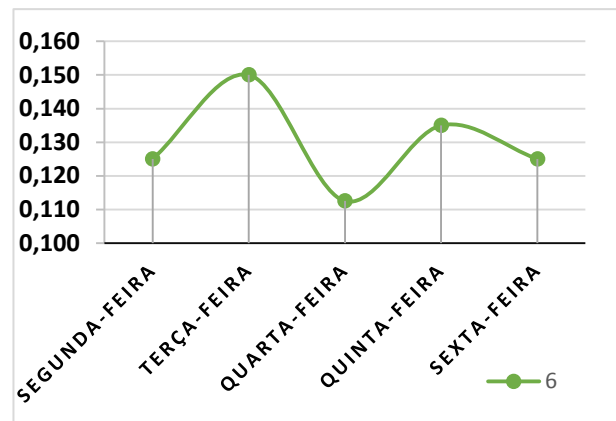


Gráfico 7 - Taxa de Crescimento (cm/dia) da Colônia DD2 (6)

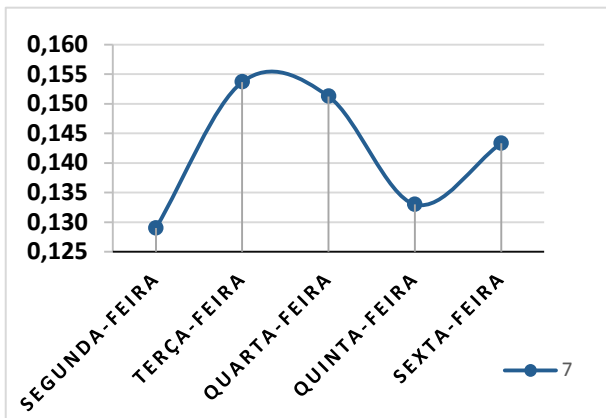


Gráfico 8 - Taxa de Crescimento (cm/dia) da Colônia DE2 (7)

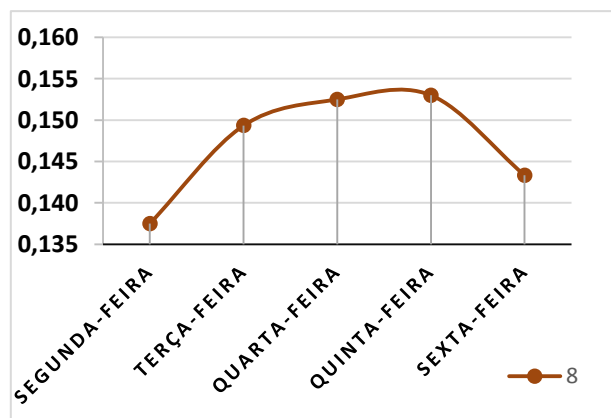


Gráfico 9 - Taxa de Crescimento (cm/dia) da Colônia G0 (8)

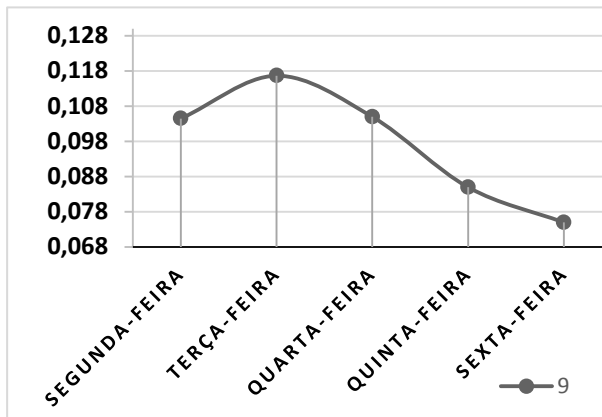


Gráfico 10 - Taxa de Crescimento (cm/dia) da Colônia BE1 (9)

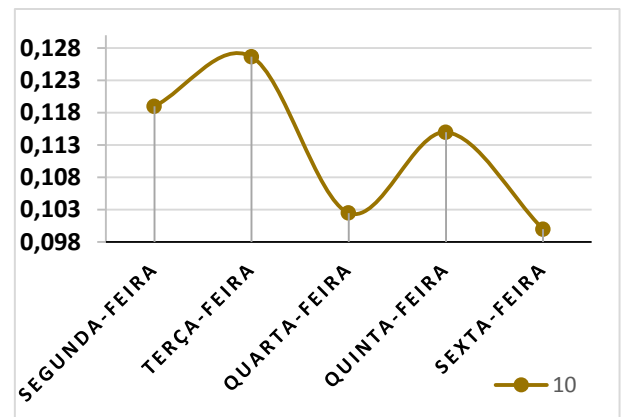


Gráfico 11 - Taxa de Crescimento (cm/dia) da Colônia DE2 (10)

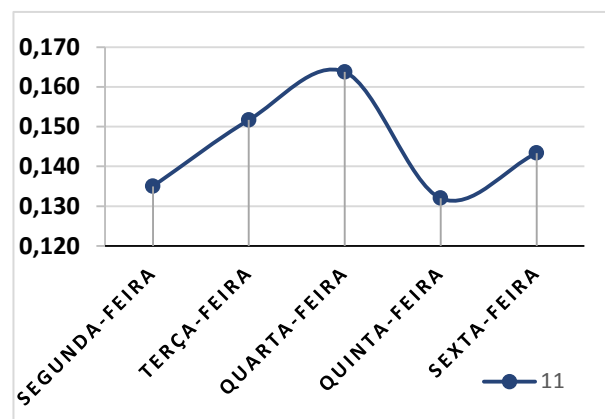


Gráfico 12 - Taxa de Crescimento (cm/dia) da Colônia BE1 (11)

As variações encontradas entre os ápices e declínios das taxas de crescimento de colônia fungica no decorrer do período de avaliação não está ligado ao aumento ou diminuição do número de células no meio, mas sim a variação do aumento de células no decorrer do tempo de incubação.

## 5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho temos que as 11 cepas isoladas apresentaram Índice Enzimático  $\geq 2,0$ , enquadrando-as como fungos com boa capacidade de realizar a degradação da celulose em meio sólido devido a secreção enzimática extracelular de celulase, em que entre essas, 7 cepas (G0 (4), DD2 (6), CE2 (1), DE1 (3), DE2 (7) BE1 (11) G0 (8)) destacaram-se por apresentar IE  $\geq 6,0$ , variando de 6,16 a 7,17, fato que as caracteriza como excelentes estirpes produtoras de celulase, mostrando que esses indivíduos são promissores a serem estudados como nova fonte microbiana de celulase para as diferentes indústrias que tenham a dependência dessa enzima em alguma etapa de seu processo produtivo.

Importante colocar que dentre as três cepas que apresentaram os maiores índices enzimáticos (DE2 (7), G0 (8) e BE1 (11)) a estirpe que poderíamos apontar como a melhor seria a DE2 (7), pois além de apresentar o maior IE no final do período de incubação dentre todas as cepas analisadas, essa apresentou o ápice da Tc com aproximadamente 36 horas, destacando-se das demais que apresentaram o ápice da Tc com 94 horas para G0 (8) e 70 horas para BE1 (11), fato de extrema importância para a indústria, que tem como foco a busca por processos cada vez mais eficientes.

A bioprospecção trata-se de uma metodologia de exploração não exata, uma vez que é impossível afirmar que na área analisada efetivamente irá conter indivíduos que apresentem as características específicas colocadas em teste, sendo assim não havia certeza a respeito da presença de fungos filamentosos produtores de celulase na Furna do Passo do Pupo 1. Assim por se tratar de um local com baixa atividade antrópica, caracterizada por apresentar uma formação geológica e biodiversidade singular, e apresentando de acordo com o esse trabalho indivíduos isolados que se enquadram como excelentes produtores de celulase, surge a necessidade de se efetuar a identificação das estirpes isoladas até o nível de espécie para aferir se os indivíduos isolados são endêmicos deste local.

Devido as variações encontradas a respeito da taxa de crescimento da colônia fungica, tem-se a necessidade de aprofundar na avaliação da interferência dos parâmetros ligados ao crescimento do microrganismo na busca por estabelecer pH, temperatura e tempo ótimo de incubação para o crescimento do microrganismo, bem como a influência do fornecimento de luz para o crescimento das colônias fungicas com o objetivo de avaliar a interferência desses parâmetros na produção enzimática para cada indivíduo.



## REFERÊNCIA

AGUIAR, André; FERRAZ, André. Mecanismos Envolvidos na Biodegradação de Materiais Lignocelulósicos e Aplicações Tecnológicas Correlatas. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 10, p. 1729-1738, ago. 2011.

ALVES, Roberto Teixeira; FARIA, Marcos. Pequeno Manual sobre Fungos Entomopatogênicos. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/884758>>. Acesso em: 20 de Agosto de 2015.

ARANTES, Valdeir; MILAGRES, Adriane F. Relevância de Compostos de Baixa Massa Molar Produzidos Por Fungos e Envolvidos na Biodegradação da Madeira. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p.1586-1595, jul. 2009.

AUER, Celso Garcia; AMARO, Tania; PIMENTEL, Ida Chapaval. ATIVIDADES DEGRADATIVAS DE CELULOSE E DE FENÓIS POR FUNGOS ISOLADOS DE ACÍCULAS DE *Pinus taeda*. **Revista Florestal**, Curitiba, v. 44, n. 2, p.179-184, 20 abr. 2014.

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

BRASIL, **Cadastro Nacional de Cavernas**, Disponível em <http://cnc.cavernas.org.br/>. Acesso em 20/09/2015.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004.

CARDOSO, Alexander M. Bioprospecção de Novos Genes para a Indústria Usando Metagenoma e Bioinformática. **ACTA Scientie & Technicae**, Rio de Janeiro – RJ, v.1, n.1, fev. 2013.

CARVALHO, Walter; *et al.* Uma Visão Sobre a Estrutura, Composição e Biodegradação da Madeira. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 8, p. 2191-2195, set. 2009.

CASTRO, Aline M.; PEREIRA JÚNIOR, Nei. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 181-188, nov. 2010.

DAMETTO, A. C. **Bioprospecção em *Eugenia jambolana* (Myrtaceae)**.131 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

DROVAL, A. A.; LIMA, D. P.; HABU, S. Manual Prático de Microbiologia de Alimentos. Curso de Microbiologia de Alimentos, Manual do Participante. CEFET/PR – Unidade de Medianeira, 2001.

DUNCAN, S.M.; MINASAKI, R.; FARRELL, R.L.; THWAITES, J.M.; HELD, B.W.; ARENZ, B.E.; JURGENS, J.A. and BLANHETTE, R.A. (2008). Screening fungi isolated from historic Discovery Hut on Ross Island, Antarctica for cellulose degradation. **Antarctic Science**, vol. 20, no. 5, p. 463-470.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos**: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 2. ed. Caxias do Sul: Ed. UCS, 2010.

FACCHINI, F. D. A. **Bioprospecção e Produção de Enzimas Fibrolíticas Por *Aspergillus Japonicus* com Potencial para Aplicação em Nutrição de Ruminantes**. 2010. 189 f. Dissertação ( Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Imunologia , Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

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

FLÜGEL FILHO, João Carlos; GUIMARÃES, Gilson Burigo; PONTES, Henrique Simão. GEOSSÍTIO SUMIDOURO CÓRREGO DAS FENDAS, PONTA GROSSA - PARANÁ.

In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPELEOLOGIA, 31º., 2011, Ponta Grossa. **Anais...** . Ponta Grossa: Sbe, 2011. p. 81 - 85.

FRANTZ, Suélen Caroline; CARREIRO, Solange Cristina; SILVA, Jéssica Barros Aguiar. PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS POR FUNGOS ISOLADOS DE FOLHAS EM DECOMPOSIÇÃO. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFT, 10º., 2014, Palmas. **Anais...** . Palmas, 2014. p. 56 - 61.

HERCULANO, P. N. et al. Isolation of cellulolytic fungi from waste of castor (*Ricinus communis* L.). **Current Microbiology**, New York, v. 62, n. 5, 9 1416-1422, 2011.

KASANA, R. C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. **Current Microbiology**, v.54, p. 503 -507, 2008.

KUMAR, Vijay; *et al.* Screening of actinomycetes from earthworm castings for their antimicrobial activity and industrial enzymes. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 205-214, jan./mar. 2012.

LEITE, Clarice. L.; *et al.* A Particularidade de Ser Um Fungo – I. Constituintes Celulares. **Biotemas**, Florianópolis, v. 19, n. 2, p. 17-27, jun. 2006.

LIMA, A. L. G.; NASCIMENTO, R. P.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. R. Streptomyces drozdowiczii cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 272-277, 2005.

LUZ, S. M.; GONÇALVES, A. R.; DEL'ARCO JÚNIOR, A.P. Mechanical behavior and microstructural analysis of sugarcane bagasse fibers reinforced polypropylene composites. **Applied Science and Manufacturing**, São Paulo, v. 38, p.1455-1461, 2006.

MANACHINI P. L.; FORTINA, M. G.; PARINI C. Purification and Properties of an Endopolygalacturonase Produced by *Rhizopus Stolonifer*. **Biotechnology Letters**, Milão, v. 9, n. 3, p.219-224, fev. 1987.

MARTINS, A. S.; VIEIRA, P. F.; BERCHIELLI, T. T.; PRADO, I. N. Degradabilidade de volumosos utilizando enzimas fibrolíticas. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, v. 30, n. 4, p. 435-442, 2008.

MUELLER, G. M.; BILLS, G.F. Biodiversity of Fungi – Inventory and monitoring methods. **Elsevier.Academic Press**. Amsterdam, v. 25, n.3, p.159-163, 2004.

MUSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas: Poderosa Ferramenta na Indústria. **Ciência Hoje**, v.41, n.242. p. 28-33, 2014.

NASCIMENTO, Rodrigo P. *et al.* Brewer's spent grain and corn steep liquor as substrates for cellulolytic enzymes production by *Streptomyces malaysiensis*. **Letter in Applied Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 529-535, mar./mai. 2009.

PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C. Produção, propriedades bioquímicas e funcionais do sistema xilanolítico de *Aspergilli* e aplicação biotecnológica no branqueamento da polpa de celulose e em ração animal. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - FMRP - USP, Ribeirão Preto, 2009.

PONTES, H. S. *et al.* Mapeamento morfoestrutural e características gerais das Furnas Gêmeas, Município de Ponta Grossa, Campos Gerais do Paraná. SIMPÓSIO NACIONAL DE GEOMORFOLOGIA, 9., 2012, Rio de Janeiro. **Anais eletrônicos...** Rio de Janeiro: SINAGEO, 2012. Disponível em: <<http://www.sinageo.org.br/2012/trabalhos/3/3-488-133.html>>. Acesso em: 22 jul. 2014.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F. & EICHCHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 724 p.

RUGGER, 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 de botânica**. vol.27 no.2 São Paulo Apr./June 2004

SACCARO JUNIOR, Nilo L. A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil. **Ambiente & Sociedade**. São Paulo, v.14, n. 1, p. 229-244, jan./jun. 2011.

SANTOS, Mariana S. *et al.* Bioprospecção de fungo endofítico de *Passiflora sp.* com potencial biotecnológico. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, Londrina, v. 2, n. 3, p.130-133, ago. 2013.

SILVA, Lucas A. D. **Produção e Caracterização de Enzimas Celulásicas por *Aspergillus Phoenicis***. 2008. 119 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Ciências Biológicas, UFRGS, Porto Alegre, 2008.

SOARES, I. A. *et al.* Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. *Ciencia e Tecnologia Alimentos* [online]. 2010, v. 10, n. 3, p 700-705.

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

SOUZA, Helenires Q.; OLIVEIRA, Luiz A.; ANDRADE, Jerusa S. Seleção de *Basidiomycetes* da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28,p. 116-124, dez. 2008.

TEIXEIRA, Maria F. S. *et al.*(org.) **Fungos da Amazônia: Uma riqueza inexplorada**. 1. ed., Manaus: Editora da Universidade Federal do Amazonas, 2011. 255 p.

Thumar, J.T.; Singh, S.P. Secretion of an alkaline protease from a salt- tolerant and alkaliphilic, *Streptomyces clavuligerus* strain MIT-1. **Braz. J. Microbiol.** 38, 766-772, 2007.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 10. ed. São Paulo: Artmed, 2012. 934 p.

WANDERLEY, Marcel D.; NEVES, Etney; ANDRADE, Cristiano J. Aspectos da produção industrial de enzimas. **Ciência, Tecnologia, Inovação e Oportunidade**, Joinville, v. 1, n. 1, p.44-50, out-dez. 2011.