



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE BRASÍLIA**

CAMPUS PLANALTINA

CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM AGROECOLOGIA

PAULO VICTOR DOS SANTOS PEREIRA

**ISOLAMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS DE SOLOS DE SISTEMAS
AGROFLORESTAIS DO INSTITUTO FEDERAL DE BRASÍLIA, CAMPUS
PLANALTINA E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS
HIDROLÍTICAS**

Planaltina - DF

2018



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE BRASÍLIA**

CAMPUS PLANALTINA

CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM AGROECOLOGIA

**ISOLAMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS DE SOLOS DE SISTEMAS
AGROFLORESTAIS DO INSTITUTO FEDERAL DE BRASÍLIA, CAMPUS
PLANALTINA E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS
HIDROLÍTICAS**

PAULO VICTOR DOS SANTOS PEREIRA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte das exigências para a obtenção do grau de Tecnólogo em Agroecologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Brasília – IFB, *Campus* Planaltina.

Orientadora: Profa. Dra. Edilsa Rosa da Silva

Planaltina – DF

2018

Dedico este trabalho a Deus e a minha família

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço primeiramente a Deus por sempre está comigo me guiando me dando forças e saúde para poder completar mais essa jornada na minha vida.

Agradeço aos meus pais Lucivan e Marli, que palavras não bastam para descrever a importância em minha vida. Agradeço também as minhas irmãs Julia e Victoria. Obrigado por todo incentivo, amor e apoio.

Um agradecimento especial a Profa. Dra. Edilsa Rosa da Silva por toda sua dedicação, apoio e seus ensinamentos. Muito obrigado por suas análises minuciosas e sugestões de grande valia para a conclusão deste trabalho.

A minha namorada Sarah Dayane por estar ao meu lado compartilhando momentos de alegria e por sempre me apoiar.

Aos meus amigos que conheci no Instituto Federal de Brasília, em especial Luciene Aparecida, Mauricio Pablo, Dayanny Rocha, Lays Silva. E a toda turma obrigado por todo o companheirismo e amizade. Esta caminhada não seria a mesma sem vocês. Agradeço também aos meus amigos Erick Lucas, Gustavo Magref, Alan Loos, Rhuan Reis e Josaphar Lopes obrigado por todos estes anos de amizade, nunca esquecerei os momentos que passamos juntos.

Agradeço também aos professores participantes da banca examinadora, Prof. Ms. Heloísa Alves de Figueiredo Sousa ao Prof. Dr. Vinícius Machado dos Santos, obrigado pela disponibilidade em participar e também pelas considerações que guiaram a elaboração final deste trabalho.

Às funcionárias da Agroindústria, Ivonete e Rose, aos estagiários e bolsistas pela colaboração e amizade.

Um enorme obrigado a todos os docentes do curso, por toda a troca de conhecimentos e de experiências que foram importantes para a minha vida acadêmica e pessoal.

Ao Instituto Federal de Brasília pela oportunidade de concluir este curso e a todos que diretamente ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muitíssimo obrigado.

Epígrafe

“Feliz é a pessoa que acha a sabedoria e que consegue compreender as coisas, pois isso é melhor do que a prata e tem mais valor do que o ouro” (Provérbios 03; 13).

RESUMO

PAULO VICTOR DOS SANTOS PEREIRA (2018). Isolamento de fungos filamentosos de solos de sistemas agroflorestais do Instituto Federal de Brasília, Campus Planaltina e avaliação da capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. Monografia apresentada ao Instituto Federal de Brasília – *Campus Planaltina*, como parte dos requisitos para a graduação em Tecnologia em Agroecologia.

Os Sistemas Agroflorestais (Safs) referem-se a uma ampla variedade de formas de uso da terra, onde árvores e arbustos são cultivados de forma interativa com cultivos agrícolas, pastagens e/ou animais, visando a múltiplos propósitos, que interagem de forma econômica e ecologicamente e se constituem numa opção viável de manejo sustentado da terra. O objetivo do presente projeto foi efetuar o isolamento de fungos filamentosos de solos de sistemas agroflorestais da do Instituto Federal de Brasília, Campus Planaltina, e avaliado a sua capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. Foram coletadas 20 amostras do solo selecionado, em 5 pontos aleatórios, cada um constituído por 4 sub-amostras. Foram isolados 35 fungos filamentosos das amostras de solo e aproximadamente 15 colônias fúngicas foram selecionadas, submetidas a um processo de purificação e transferidas para meios específicos em placas de Petri. Posteriormente, foram selecionadas 5 colônias para serem avaliadas quanto a produção das enzimas hidrolíticas amilase e celulase. Foi possível detectar a capacidade de produção da enzima amilase apenas em dois isolados fúngicos (P1/A3/10-2 e P1/A5/10-2). A produção da enzima celulase não foi verificada nos isolados fúngicos testados. A não detecção das atividades das enzimas amilases e celulases em grande parte dos isolados fúngicos testados, pode ser considerada apenas no contexto da metodologia de análise utilizada. Recomenda-se que novas metodologias sejam avaliadas para a verificação da capacidade hidrolítica dos fungos isolados. Também recomenda-se um criterioso processo de purificação e identificação das colônias fúngicas isoladas. A utilização de Safs é uma opção viável que concorre para melhor utilização do solo, o seu conhecimento e uso ainda são limitados. Isto representa uma oportunidade para o desenvolvimento de maiores ações de pesquisa.

PALAVRAS - CHAVE: Enzimas hidrolíticas, fungos filamentosos, sistemas agroflorestais.

ABSTRACT

PAULO VICTOR DOS SANTOS PEREIRA (2018). Isolation of filamentous fungi from soils of agroforestry systems of the Federal Institute of Brasília, Planaltina Campus and evaluation of the production capacity of hydrolytic enzymes. Monograph presented to the Federal Institute of Brasília - Campus Planaltina, as part of the requirements for the graduation in Technology in Agroecology.

Agroforestry Systems (Safs) refer to a wide variety of land-use forms, where trees and shrubs are grown interactively with agricultural crops, pastures and / or animals, for multiple purposes, interacting economically and are a viable option for sustainable land management. The objective of the present project was to isolate filamentous fungi from soils of agroforestry systems of the Federal Institute of Brasilia, Campus Planaltina, and evaluated their capacity for the production of hydrolytic enzymes. Twenty samples of the selected soil were collected at 5 random points, each consisting of 4 sub-samples. 35 filamentous fungi were isolated from the soil samples and approximately 15 fungal colonies were selected, submitted to a purification process and transferred to specific media in Petri dishes. Subsequently, 5 colonies were selected to be evaluated for the production of amylase and cellulase hydrolytic enzymes. It was possible to detect the production capacity of the amylase enzyme in only two fungal isolates (P1 / A3 / 10-2 and P1 / A5 / 10-2). The production of the enzyme cellulose was not verified in the fungal isolates tested. The lack of detection of the activities of the enzymes amylases and cellulases in most of the fungal isolates tested can only be considered in the context of the analysis methodology used. It is recommended that new methodologies be evaluated for the hydrolytic capacity of isolated fungi. It is also recommended a careful process of purification and identification of isolated fungal colonies. The use of Safs is a viable option that competes for better land use, their knowledge and use are still limited. This represents an opportunity for the development of larger research actions.

KEY WORDS: Agroforestry Systems, filamentous fungi, hydrolytic enzymes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferenciação de hifas, septadas e cenocíticas.	16
Figura 2. Sistema Agroflorestal da agroecologia (NEA).	19
Figura 3. Amostras de solo SAF/NEA.	20
Figura 4. A, B, C e D: Placas de Petri com Ágar Sabouraud contendo colônias fúngicas isoladas da Amostra 5 (A) P1/A5/10 ⁻¹ , (B) P2/A5/10 ⁻¹ , (C) P1/A5/10 ⁻² , (D) P2/A5/10 ⁻² do solo coletado no SAF/NEA.	24
Figura 5. A, B, C e D: Placas de Petri com Ágar Sabouraud contendo colônias fúngicas isoladas da Amostra 3 (A) P1/A3/10 ⁻¹ , (B) P2/A3/10 ⁻¹ , (C) P1/A3/10 ⁻² , (D) P2/A3/10 ⁻² do solo coletado no SAF/NEA.	25
Figura 6. A, B, C e D: Placas de Petri com PDA contendo colônias fúngicas, (A) P2/A1/10 ⁻² , (B) P2/A4/10 ⁻² , (C) P1/A3/10 ⁻¹ , (D) P1/A4/10 ⁻² do solo coletado no SAF/NEA.	26
Figura 7. A, A. B. C. D. Microscopia de fungos isolados. (A) amostra P1/A3/10 ⁻¹ , apresentando hifas aéreas (corpos de frutificação) com esporos reprodutivos, objetiva 10x. (B) amostra P1/A5/10 ⁻¹ , hifa cenocítica (não septada) com coloração, objetiva 40x. (C) amostra P1/A4/10 ⁻² , hifa septada, objetiva 40x. (D) amostra P1/A5/10 ⁻² , esporos reprodutivos, com coloração, objetiva 40x.	27
Figura 8. A: Hifas aéreas, mostrando os esporos reprodutivos (corpos de frutificação) de <i>Aspergillus</i> sp. B: Hifas cenocíticas (não septadas) de <i>Aspergillus flavus</i> .	28
Figura 9. A, B: Teste semi-quantitativo de produção da enzima amilase após revelação com solução de iodo 0,1%: P1/A5/10 ⁻² (A) e P1/A3/10 ⁻² (B).	29
Figura 10. A, B: Teste semi-quantitativo de produção da enzima amilase após revelação com solução vermelho Congo 0,1%: P2/A5/10 ⁻² (A) e P1/A3/10 ⁻¹ (B).	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. JUSTIFICATIVA	12
3. OBJETIVOS	13
3.1. Objetivo Geral	13
3.2. Objetivos específicos	13
4. REVISÃO DE LITERATURA	14
4.1. Caracterização de Sistemas Agroflorestais (SAFs).....	14
4.2. Caracterização de fungos filamentosos	15
4.3. Caracterização das enzimas hidrolíticas produzidas pelos fungos e seu potencial de aplicação.....	17
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
5.1. Seleção da área contendo solos de sistemas agroflorestais (SAFs) do Instituto Federal de Brasília, Campus Planaltina para o isolamento de fungos filamentosos.....	19
5.2. Isolamento e seleção de fungos filamentosos do Sistemas Agroflorestais.	20
5.3. Caracterização morfológica macroscópica e microscópica dos fungos selecionados.	20
5.4. Determinação da produção de enzimas hidrolíticas (amilases, celulasas) dos fungos selecionados.	21
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
6.1. Isolamento, seleção e caracterização dos fungos filamentosos isolados do Sistemas Agroflorestais.....	22
6.2. Determinação da produção de enzimas hidrolíticas de cinco colônias fúngicas selecionadas.	28
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
8. REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

Sistemas agroflorestais (SAFs) são uma alternativa de produção agropecuária, imitando o ambiente natural pela consorciação de várias espécies dentro de uma área, abrangendo a diversidade do ecossistema assim aproveitando as interações benéficas entre as plantas de diferentes ciclos, portes e funções (CARVALHO; GOEDERT; ARMANDO, 2004).

Os SAFs, embora não restaurem as comunidades florestais ao seu estado de origem, como estrutura e biodiversidade quando bem planejadas podem aproximar-se ecologicamente dessas comunidades, readquirindo funções para a sustentabilidade, a ciclagem de nutrientes, além de fornecerem alguma renda ou produção de subsistência ao produtor rural (ARATO; MARTINS; FERRARI, 2003).

A utilização do SAFs na recuperação de áreas degradadas tem apresentado resultados que contribuem significativamente para a melhoria das propriedades físico-químicas dos solos, assim como propiciam condições mais favoráveis para o estímulo da atividade dos microrganismos, resultado este do grande aporte de matéria orgânica ao solo encontrado em sistemas agroflorestais (PEZARICO et al., 2013).

Os microrganismos apresentam alta diversidade genética e desempenham funções essenciais na manutenção dos ecossistemas como componentes fundamentais de cadeias alimentares, e ciclos biogeoquímicos, como decompositores e transformadores da matéria e agentes simbióticos com outros organismos (DE MATOS; WEBER, 2009).

Nos microrganismos os fungos filamentosos se destacam por sua facilidade de cultivo, pelas enzimas que são secretadas diretamente no meio em que se encontram, não precisando de ruptura celular para sua liberação. Apresentam elevados níveis de produção enzimática, com grande potencial para diferentes aplicações industriais (STROPARO et al., 2012).

Enzimas são proteínas que atuam como catalisadoras de reações químicas, sendo essenciais para o sistema metabólico de todos os organismos vivos e possuem um papel fundamental na degradação da matéria orgânica (ORLANDELLI et al., 2012). As enzimas de origem microbiana proporcionam maior interesse, do ponto de vista da sua aplicação industrial, por serem mais facilmente produzidas em larga escala, maior variedade da atividade catalítica, fácil manipulação genética e pela enorme diversidade microbiana existente que oferece ilimitadas possibilidades dos modos de atuação e rápido crescimento em meio de cultura (FERNANDES, 2009; apud COELHO; NASCIMENTO, 2008).

Em processos industriais as enzimas são de grande interesse, em especial devido à facilidade de obtenção por biotecnologia e às vantagens em relação aos catalisadores químicos,

como maior especificidade, menor consumo energético e maior velocidade de reação (MUSSATTO; FERNANDES; MILAGRES, 2007).

Os maiores consumidores do mercado de enzimas são as indústrias de: detergentes, alimentos e rações, papel e celulose, fármacos, seguidas de perto pela indústria têxtil e de manufatura de couros (SENA et al., 2006).

As enzimas são denominadas de acordo com o substrato sobre o qual atuam, portanto, o termo amilase indica a ação sobre o amido. O amido é encontrado principalmente em sementes de cereais como milho, trigo, cevada e arroz e em tubérculos como batata e mandioca. Estas enzimas apresentam grande importância biotecnológica como nas indústrias têxtil, de papéis, de couro, de detergentes, na indústria de bebidas como cervejas e bebidas destiladas, na indústria alimentícia, liquefação e sacarificação do amido, indústria química e farmacêutica e na produção de ração animal (BARATTO et al., 2012).

A celulose, dentre os materiais naturais, é o biopolímero mais abundante do mundo. A hidrólise da celulose por celulasas resulta na produção final de glicose, essa enzima pode ser utilizada na indústria têxtil em que são usadas para dar melhor acabamento aos tecidos, na indústria de bebidas para produção de sucos de frutas e nos processos de vinificação, na fabricação de detergentes, e na indústria de polpa e papel (ZANCHETTA, 2012).

2. JUSTIFICATIVA

O projeto teve como objetivo fazer o isolamento de fungos filamentosos de solos de sistemas agroflorestais e avaliação da capacidade de produção de enzimas hidrolíticas.

Os fungos filamentosos compõem o grupo microbiano com maior número de espécies apresentando uma imensa variedade e isso tem propiciado ao homem explorar racionalmente algumas linhagens fúngicas que, sob condições adequadas e controladas, sejam capazes de produzir substâncias como as enzimas ou sendo capazes de provocar alterações desejáveis em outras, resultando em produtos ou processos comerciais.

Enzimas hidrolíticas estão entre os principais alvos da pesquisa biotecnológica, pelo grande potencial de aplicação no setor industrial. Sendo as enzimas de origem microbianas como as mais requisitadas nos processos biotecnológicos industriais, em razão dos vários fatores como: produção em larga escala, grande variedade da atividade catalítica, fácil manipulação genética e ambiental.

Os fungos filamentosos que serão isolados são provenientes do solo do sistema agroflorestal (SAFs) localizado no núcleo de estudos de agroecologia (NEA) do Instituto Federal de Brasília, Campus Planaltina. Os SAFs possuem uma grande diversidade da comunidade microbiológica do solo, auxiliando na decomposição da matéria orgânica, na mineralização ou na fixação de nutriente, tudo isso se deve o fator dos sistemas agroflorestais terem a inclusão de componentes arbóreos que podem manter ou aumentar a produtividade de determinado local, fazendo também que o ambiente alcance um equilíbrio ecológico que não é possível se alcançar com a prática do monocultivo.

Isso mostra que os SAFs apresentam uma boa oportunidade para o desenvolvimento de maiores ações de pesquisa, sendo na área microbiológica do solo ou nas outras diversas áreas que os Safs possam a vim contribuir para a comunidade local.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Efetuar o isolamento de fungos filamentosos de solos de sistemas agroflorestais do Instituto Federal de Brasília, Campus Planaltina e avaliar a capacidade de produção de enzimas hidrolíticas.

3.2. Objetivos específicos

- Selecionar da área contendo solos de sistemas agroflorestais do Instituto Federal de Brasília, Campus Planaltina para o isolamento dos fungos filamentosos;
- Realizar o isolamento e seleção de aproximadamente 15 fungos filamentosos do SAFs;
- Efetuar a caracterização morfológica macroscópica e microscópica dos fungos selecionados;
- Realizar a determinação da produção de enzimas hidrolíticas (amilases e celulasas) dos fungos selecionados.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Caracterização de Sistemas Agroflorestais (SAFs)

Sistema agroflorestal (SAFs) é um sistema de manejo sustentado da terra que aumenta o rendimento da mesma, combinando a produção de cultivos agrícolas com plantas florestais e/ou animais, simultânea ou consecutivamente, de forma deliberada, na mesma unidade de terreno, envolvendo práticas de manejo de acordo com a população local (MEDRADO, 2000).

Segundo Nair (1983), os SAFs são muito utilizados em regiões tropicais e subtropicais, onde os produtores há muito plantam árvores junto com outras culturas agrícolas e animais para ajudar a satisfazer as necessidades básicas de alimentos, madeira, lenha e forragem, e para ajudar a conservar e proteger seus recursos frequentemente limitados. Além de reduzir os impactos ambientais negativos das práticas agrícolas (PRADE, 2007).

A utilização dos SAFs tem o objetivo de se aproximar da estrutura e dinâmica de uma vegetação natural sendo avaliados capazes de aumentar a produtividade vegetal, através do melhoramento do solo e do acréscimo na disponibilidade de nutrientes (COSTA, 2010).

Acredita-se que os sistemas agroflorestais promovam uma ciclagem de nutrientes maior que aquelas que ocorrem nas lavouras e pastagens tradicionais sem árvores. Essa teoria baseia-se, parcialmente, em estudos que foram realizados em ecossistemas de florestas naturais e na suposição de que as árvores nos SAFs irão transferir de maneira semelhante os nutrientes para as culturas que estão associadas (RIBASKI; MONTOYA; RODIGHERI, 2001).

A inclusão de componentes arbóreos pode manter ou aumentar a produtividade de determinado local, devido a processos que aumentem a entrada ou reduzem perdas no solo, como matéria orgânica, nutrientes e água, além de melhorar as propriedades físicas e químicas e beneficiar processos microbiológicos do solo (YOUNG, 1994 *apud* ANGELINI et al., 2011).

Um aspecto que determina a sustentabilidade desses sistemas é a presença das árvores, que têm a capacidade de capturar nutrientes de camadas mais profundas do solo, reciclando-os eficientemente e proporcionando maior cobertura e conservação dos recursos edáficos (SILVA JÚNIOR, 2006).

A mata nativa ou sistemas similares como os sistemas agroflorestais são responsáveis por promover maior produção de biomassa aérea e subterrânea, assim como a cobertura do solo, favorecendo o acúmulo de carbono e a manutenção da fertilidade do solo por meio de uma ciclagem mais eficiente de nutrientes e da redução de perdas por lixiviação e erosão (GAMA-RODRIGUES et al., 2008; PORTUGAL et al., 2008 *apud* PEZARICO et al., 2013).

A perda da diversidade microbiana dos solos é prejudicial à conservação do ambiente, isso ocorre ocasionalmente em áreas onde não se tem uma grande diversidade de plantas e árvores, pois os microrganismos têm a capacidade de mineralizar compostos organoclorados e constituem um recurso genético que pode ser usado para biorremediação ou biorrecuperação de solos contaminados por agrotóxicos (MATTOS, 2015).

4.2. Caracterização de fungos filamentosos

O solo define-se como sendo uma camada superficial da crosta terrestre, que se compõem por fatores climáticos, biológicos e por atividades antropogênicas, o solo pode estar nas fases sólida, líquida e gasosa (OLIVEIRA et al., 2008).

Um dos fatores que contribuem para qualidade do solo é a sua comunidade microbiana que atua diretamente na fertilidade dos solos, sendo na decomposição da matéria orgânica, na mineralização ou na fixação de nutrientes, assim influenciando as propriedades químicas e físicas do solo (RECH et al., 2013).

O conhecimento da microbiota do solo, além de fundamental para o levantamento taxonômico das populações que ali se encontram, pode levar ao descobrimento de processos metabólicos utilizados por estes organismos tornando-se importantes para as interações ambientais e em aplicações biotecnológicas (RUEGGER; TAUK-TORNISIELO, 2004).

Como o solo é normalmente um ambiente estressante, limitado por nutrientes, somente 15% a 30% das bactérias e 10% dos fungos encontram-se em estado ativo. Os componentes microbianos vivos do solo são também denominados de biomassa microbiana e as bactérias e fungos respondem por cerca de 90% da atividade microbiana do solo (SILVEIRA; FREITAS, 2007).

Os fungos são microrganismos que fazem do solo um dos seus principais habitats. São bastante diversos e tem a habilidade de degradar materiais naturais com maior eficiência que as bactérias sob condições estressantes, como por exemplo, em condições ambientais com meios pobres em nutrientes, com baixos valores de pH e com baixa atividade de água (NEVES; PIRES, 2011 *apud* OLIVEIRA et al., 2008).

Geralmente em solos com maior biodiversidade microbiana, tem se a possibilidade de encontrar microrganismos que atuem em processos de degradação de agrotóxicos e da manutenção dos processos microbiológicos (PEREIRA et al., 2007, *apud* RECH et al., 2013).

Os fungos podem ser divididos em unicelulares (leveduras) e multicelulares ou filamentosos (bolores ou mofos).

Os fungos filamentosos são organismos eucarióticos quimioheterótrofos, não possuem clorofila. Geralmente são filamentosos, ramificados ou multicelulares (5 a 10 μm dimensão transversal) com estruturas reprodutivas diferenciadas das vegetativas, tem sua reprodução por meio de esporos e são aeróbios estritos. Constituídas por elementos multicelulares em forma de tubo chamadas de hifas. O conjunto de hifas, ramificadas ou não, denomina-se micélio, o qual pode ser visualizado a olho nu, como um emaranhado de fios delgados que pode variar do hialino (incolor) ao colorido, ao microscópio óptico é possível distinguir hifas com duas morfologias, umas com paredes transversais (septos) e outras que não as apresentam (aseptados ou cenocíticos) como na figura 1. Em uma das fases do ciclo de vida do fungo filamentosos, as hifas podem se ramificar atingindo o ar, nessas ramificações aéreas é que são formados os esporos, que são as estruturas de dispersão e resistência dos fungos. Dependendo da espécie as colônias podem ter características pulverulentas, aveludadas ou algodonosas. Esse fungo consegue viver em pH mais elevado, variando entre 1,5 e 11 (LOGUERCIO-LEITE, 2006).

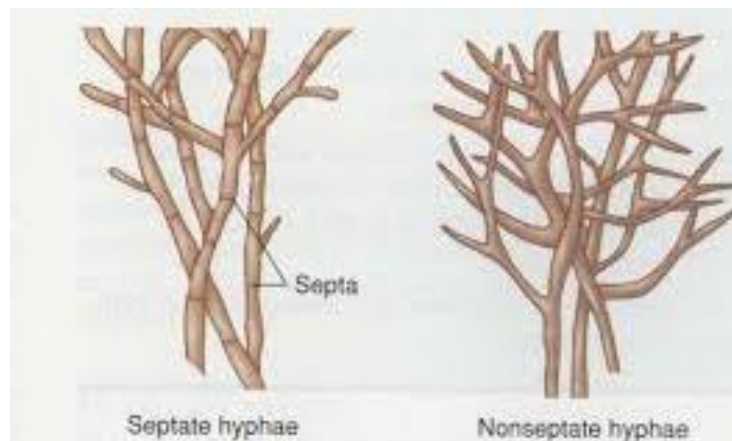


Figura 1. Diferenciação de hifas, septadas e cenocíticas. Fonte: <http://paginapessoal.utfpr.edu.br/geraldo/microbiologia/Morfologiadofungos.pdf>

Os fungos filamentosos compõem o grupo microbiano com maior número de espécies e apresentam imensa variedade quanto à morfologia e quanto aos atributos fisiológicos e bioquímicos. Essa diversidade tem propiciado ao homem explorar racionalmente algumas linhagens fúngicas que, sob condições adequadas e controladas, sejam capazes de produzir substâncias ou capazes de provocar alterações desejáveis em outras, resultando em produtos ou processos comerciais (COLEN, 2006).

4.3. Caracterização das enzimas hidrolíticas produzidas pelos fungos e seu potencial de aplicação.

Enzimas são biocatalisadoras de estrutura protéica globular terciária ou quaternária, termolábeis e não dialisáveis, que aceleram a velocidade de uma reação química, isto é, atuam reduzindo a barreira energética destas reações. As enzimas ocorrem em todos os organismos vivos, desde os mais simples, como formas unicelulares até plantas e animais (GOYTACAZES; AGOSTO, 2009).

O mercado mundial de enzimas industriais é estimado hoje em US\$ 2,3 bilhões anuais e tem três segmentos: enzimas técnicas (destinadas a indústrias de tecidos e de produtos de limpeza), enzimas para alimentos e bebidas e enzimas para ração animal (MUSSATTO, 2007).

Atualmente, as enzimas hidrolíticas são as mais utilizadas nos processos industriais, sendo aplicadas na degradação de várias substâncias naturais. De forma geral, elas são usadas em grande escala nas indústrias têxteis (amilase, celulase, pectinase, oxidoredutases), de detergentes (celulase, lipase, protease, oxidoredutases), alimentícia (celulase, lactase, lipase, pectinase, protease, oxidoredutases), de papel (lipase, oxidoredutases, xilanasas), e de couro (lipase, protease) (OLIVEIRA et al., 2006).

As enzimas de origem microbiana vêm sendo mais aplicadas nos processos biotecnológicos industriais, em razão dos vários fatores como: produção em larga escala, grande variedade da atividade catalítica, fácil manipulação genética e ambiental (FERNANDES, 2009).

As enzimas microbianas ocorrem nas mesmas condições em que se produz o crescimento máximo dos microrganismos. As enzimas microbianas podem ser extracelulares (enzimas eliminadas ao meio) ou intracelulares (enzimas retidas no interior das células microbianas) (SPIER, 2005).

A seleção de microrganismos com potencial para a produção de enzimas pode ser feita com o uso de meios de cultura sólidos ou líquidos. Os microrganismos devem apresentar bom rendimento na produção da enzima, ser de fácil cultivo, fácil manipulação (FERNANDES, 2009).

As enzimas são denominadas de acordo com o substrato sobre o qual atuam, portanto, o termo amilase indica a ação sobre o amido. As amilases são as mais antigas na indústria de enzimas e fazem parte da classe das hidrolases. Podem ser derivadas de diversas fontes como animais, plantas e microrganismos. No entanto, as fontes microbianas são as mais utilizadas devido à produção em larga escala (FERNANDES., 2009 *apud* GUPTA et al., 2003).

Estas enzimas apresentam grande importância biotecnológica como nas indústrias têxtil, de papéis, de couro, de detergentes, na indústria de bebidas como cervejas e bebidas destiladas, na indústria alimentícia, pães, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, indústria química e farmacêutica e na produção de ração animal (BARATTO et al., 2012).

Atualmente grandes quantidades de amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e têm aplicação quase completa na hidrólise do amido em indústrias de processamento do amido (SPIER, 2005).

A celulose, dentre os materiais naturais, é o biopolímero mais abundante do mundo. A hidrólise da celulose por celulasas resulta na produção final de glicose. Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulasas; apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural.

Em geral, os fungos que decompõem substâncias celulósicas ocorrem no solo, colonizando vegetais, suas raízes e resíduos, com importante função na reciclagem de nutrientes. A celulose é bastante utilizada nas aplicações biotecnológicas e industriais alimentícias. Grande parte da produção industrial de celulasas é realizada com o emprego de alguns fungos filamentosos, os quais são eficientes produtores de enzimas hidrolíticas (GOMES, 2011).

Na indústria têxtil, essas enzimas são usadas para dar melhor acabamento aos tecidos, tornando-os mais lisos, macios e com melhor caimento, elas atuam degradando as fibras da superfície do tecido, compostas basicamente por celulose. Na fabricação de detergentes, proporcionam maior limpeza e menor degradação dos tecidos e na indústria de polpa e papel, tornam o papel mais branco e liso, mas o aumento da utilização dessa enzima veio do processo de produção de etanol a partir de resíduos vegetais como bagaço e palha de cana, talos, sabugo e palha de milho, cascas de arroz e demais grãos, além de restos de madeiras, os chamados materiais lignocelulósicos (ZANCHETTA, 2012).

As celulasas também são utilizadas na indústria de bebidas para produção de sucos de frutas e nos processos de vinificação. Essas enzimas facilitam a extração de sucos e a maceração para produção de néctares de frutas por romperem a rede de celulose que ajuda reter o líquido nas células vegetais (ZANCHETTA, 2012).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Seleção da área contendo solos de sistemas agroflorestais (SAFs) do Instituto Federal de Brasília, Campus Planaltina para o isolamento de fungos filamentosos.

Foram coletadas 20 amostras de solo, em 5 pontos aleatórios cada um constituído por 4 sub-amostras do sistema agroflorestal (figura 2), com aproximadamente 1.500 m², localizado no núcleo de estudos de agroecologia (NEA) do IFB Campus Planaltina, 15°39'36.9" de latitude sul e 47°41'23.6" de longitude oeste. O SAF, apresenta predominantemente fruteiras tropicais como banana, mamão e cultivares agrícolas como milho, feijão, abóbora, mandioca e crotalária juncea, além das gliricídias. As amostras foram obtidas no dia 10/04/2018, observando a profundidade a partir de 20 cm da camada do solo. Em cada ponto foi retirado 200 gramas de solo coletado com auxílio de uma pá de jardinagem e armazenado em sacos plásticos devidamente etiquetados. As amostras do solo (figura 3) coletado foram encaminhadas para o laboratório de Microbiologia Geral, localizado no núcleo da agroindústria, do Instituto Federal de Brasília, Campus Planaltina.



Figura 2. Sistema agroflorestal da agroecologia do núcleo de estudos de agroecologia (NEA).
Fonte: Paulo Victor dos Santos (2018).

5.2. Isolamento e seleção de fungos filamentosos do Sistemas Agroflorestais.

Foram isolados 35 fungos filamentosos de amostras de solo da SAF localizado na Agroecologia do Campus Planaltina. Para o isolamento das amostras fúngicas, o sedimento de cada ponto foi suspenso e plaqueado, com o seguinte procedimento: 10g de cada amostra do sedimento foi suspensa em 90ml solução salina. Após a agitação, 1ml foi retirado e feita diluições até 10^{-2} em tubos com 9ml com solução salina. Onde 1 ml foi retirado e semeado em placas de Petri em duas réplicas com uma alça de Drigalski contendo Agar Sabouraud + cloranfenicol (100mg/L). As placas permaneceram em temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e o crescimento das colônias foi acompanhado por 7 dias. As melhores colônias fúngicas foram selecionadas e transferidas para meios específicos batata dextrose ágar-BDA (PDA) em placas de Petri.



Figura 3. Amostras de solo SAF/NEA. Fonte: Paulo Victor dos Santos (2018).

5.3. Caracterização morfológica macroscópica e microscópica dos fungos selecionados.

Foi feita a caracterização morfológica macroscópica dos fungos nas placas de Petri com crescimento fúngico e anotando as características observadas (por exemplo: cor da colônia fúngica, aparência cotonosa ou aveludada, crescimento intenso, moderado ou pequeno) e observando o número de colônias por placa. Já na observação microscópica foram utilizadas objetivas de aumento de 4, 10 e 40 vezes, preparo de lâmina à fresco com coloração e sem coloração suas microestruturas.

5.4.Determinação da produção de enzimas hidrolíticas (amilases, celulasas) dos fungos selecionados.

A produção das enzimas hidrolíticas extracelulares amilase e celulase foi avaliada em placas de Petri contendo meio de cultura específico para cada enzima. Discos (5 mm diâmetro) de micélio dos 5 fungos filamentosos cultivados em PDA por sete dias, foram transferidos para o centro de placas de Petri e incubados em estufa a temperatura de $(28\pm 2^\circ\text{C})$ e avaliados por sete dias contendo o meio de cultura da enzima específica:

Amilase (ágar 1,8%, amido 1% e solução salina 700ml.

Celulase (ágar 1,8%, carboximetilcelulase 1% e 700 ml de solução salina).

Para a amilase, foi utilizada a solução reveladora de iodo a 0,1%, os resultados das reações enzimáticas positivas foram identificados pela formação de um halo translúcido para o teste enzimático da celulase foi utilizado a solução reveladora vermelho Congo 0,1%, os resultados das reações enzimáticas positivas foram identificados pela formação de um halo amarelo claro em contraste com o meio de cultura vermelho após a adição da solução reveladora (FERNANDES, 2009).

A determinação enzimática foi expressa como índice enzimático (IE), mediante a relação do diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia(FERNANDES, 2009).

$$\text{IE} = \frac{\text{diâmetro do halo}}{\text{diâmetro da colônia}}$$

O experimento foi realizado em triplicata em cada meio, sendo a unidade controle constituída por uma placa de Petri contendo um disco de micélio do fungo filamentoso em PDA.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Isolamento, seleção e caracterização dos fungos filamentosos isolados do Sistemas Agroflorestais

O isolamento e seleção de fungos filamentosos do SAF do IFB, Campus Planaltina foi realizado de acordo com a metodologia descrita no item 5.2 de material e métodos.

Aproximadamente, 35 colônias fúngicas foram isoladas e submetidas a análise macroscópica, quanto às características coloniais, como registrado na tabela 01 e figuras 4 e 5.

A partir das 35 colônias inicialmente isoladas foi realizada uma primeira seleção de 15 colônias fúngicas, com base na observação do crescimento vigoroso das mesmas em placa e características culturais bem definidas como registrado na figura 6.

Tabela 01. Características morfológicas culturais das colônias fúngicas selecionadas a partir do solo coletado no SAF/NEA.

Amostra	N° UFC/ Placa	Formas Das colônias	Tamanho das colônias	Textura	Pigmentação da colônia
P1/A1/10 ⁻¹	1	Circular	89 mm	Aveludada	Verde e branca
P2/A1/10 ⁻¹	17	Circulares	32 mm a 7 mm	Aveludada com superfície rugosa	Cor predominante branca
P1/A1/10 ⁻²	3	Circulares	89 mm a 7 mm	Aveludada e algodonosa	Cores verde, branca e rosa
P2/A1/10 ⁻²	6	Circulares	1mm a 3 mm	Enrugada	Cor preta
P1/A2/10 ⁻¹	14	Circulares	80 mm a 1 mm	Algodonosa	Cor verde
P2/A2/10 ⁻¹	Incontáveis colônias	Circulares, irregulares	48 mm a 1 mm	Aveludada	Cor verde e branca
P1/A2/10 ⁻²	23	Circulares	37 mm a 4 mm	Algodonosa e aveludada	Cor verde e branca

P2/A2/10 ⁻²	32	Circulares	50 mm a 1 mm	Aveludada com superfície enrugada	Cor verde, branca e cinza
P1/A3/10 ⁻¹	35	Arredondadas	32 mm a 2 mm	Algodonosa com superfície lisa	Cor preta e branca
P2/A3/10 ⁻¹	36	Circulares e irregulares	57 mm a 2 mm	Esponjosa	Cor verde
P1/A3/10 ⁻²	13	Circulares	28 mm a 2 mm	Algodonosa	Cor branca
P2/A3/10 ⁻²	21	Circulares	55 mm a 1 mm	Esponjosa	Cor verde
P1/A4/10 ⁻¹	22	Arredondada	18 mm a 4 mm	Algodonosa	Cor verde, branca e rosa
P2/A4/10 ⁻¹	29	Circulares	14 mm a 5 mm	Algodonosa	Cor verde e branca
P1/A4/10 ⁻²	4	Circulares	90 mm a 7 mm	Algodonosa	Cor branca
P2/A4/10 ⁻²	5	Circulares	21 mm a 9 mm	Algodonosa e esponjosa	Cor verde
P1/A5/10 ⁻¹	23	Irregulares e circulares	68 mm a 4 mm	Algodonosa	Cor preta
P2/A5/10 ⁻¹	29	Circulares	24 mm a 1 mm	Algodonosa e aveludada	Cor preta, amarela e cinza
P1/A5/10 ⁻²	20	Circulares	45 mm a 1 mm	Aveludada	Cor branca, cinza e amarela
P2/A5/10 ⁻²	13	Circulares	55 mm a 1 mm	Algodonosa com superfície enrugada	Cor branca e cinza



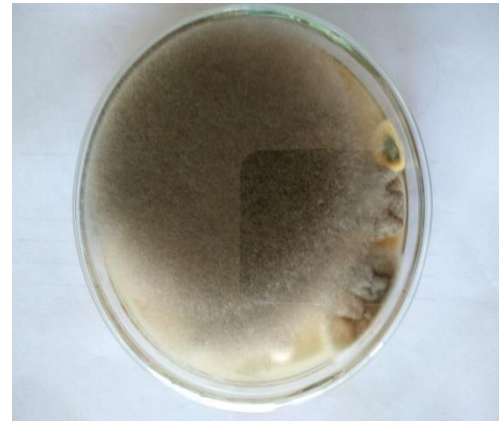
A



B



C



D

Figura 4. A, B, C e D: Placas de Petri com Ágar Sabouraud contendo colônias fúngicas isoladas da Amostra 5 (A) P1/A5/10⁻¹, (B) P2/A5/10⁻¹, (C) P1/A5/10⁻², (D) P2/A5/10⁻² do solo coletado no SAF/NEA. Fonte: Paulo Victor dos Santos (2018).



A



B



C



D

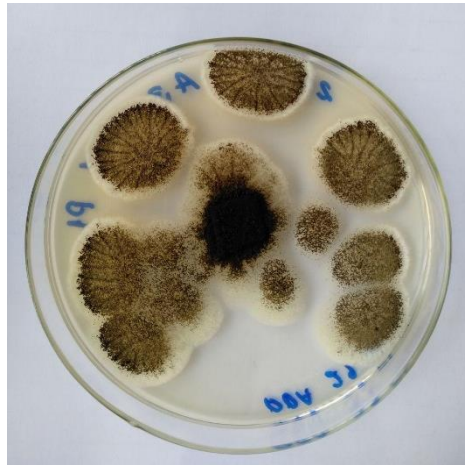
Figura 5. A, B, C e D: Placas de Petri com Ágar Sabouraud contendo colônias fúngicas isoladas da Amostra 3 (A) P1/A3/10⁻¹, (B) P2/A3/10⁻¹, (C) P1/A3/10⁻², (D) P2/A3/10⁻² do solo coletado no SAF/NEA. Fonte: Paulo Victor dos Santos (2018).



A



B



C



D

Figura 6. A, B, C e D: Placas de Petri com PDA contendo colônias fúngicas, (A) $P2/A1/10^{-2}$, (B) $P2/A4/10^{-2}$, (C) $P1/A3/10^{-1}$, (D) $P1/A4/10^{-2}$ do solo coletado no SAF/NEA. Fonte: Paulo Victor dos Santos (2018).

A partir das colônias isoladas foram preparadas lâminas com coloração simples (azul de metileno) e sem coloração para que fosse avaliado algumas características microscópicas dos isolados. A figura 7 ilustra as principais características observadas.

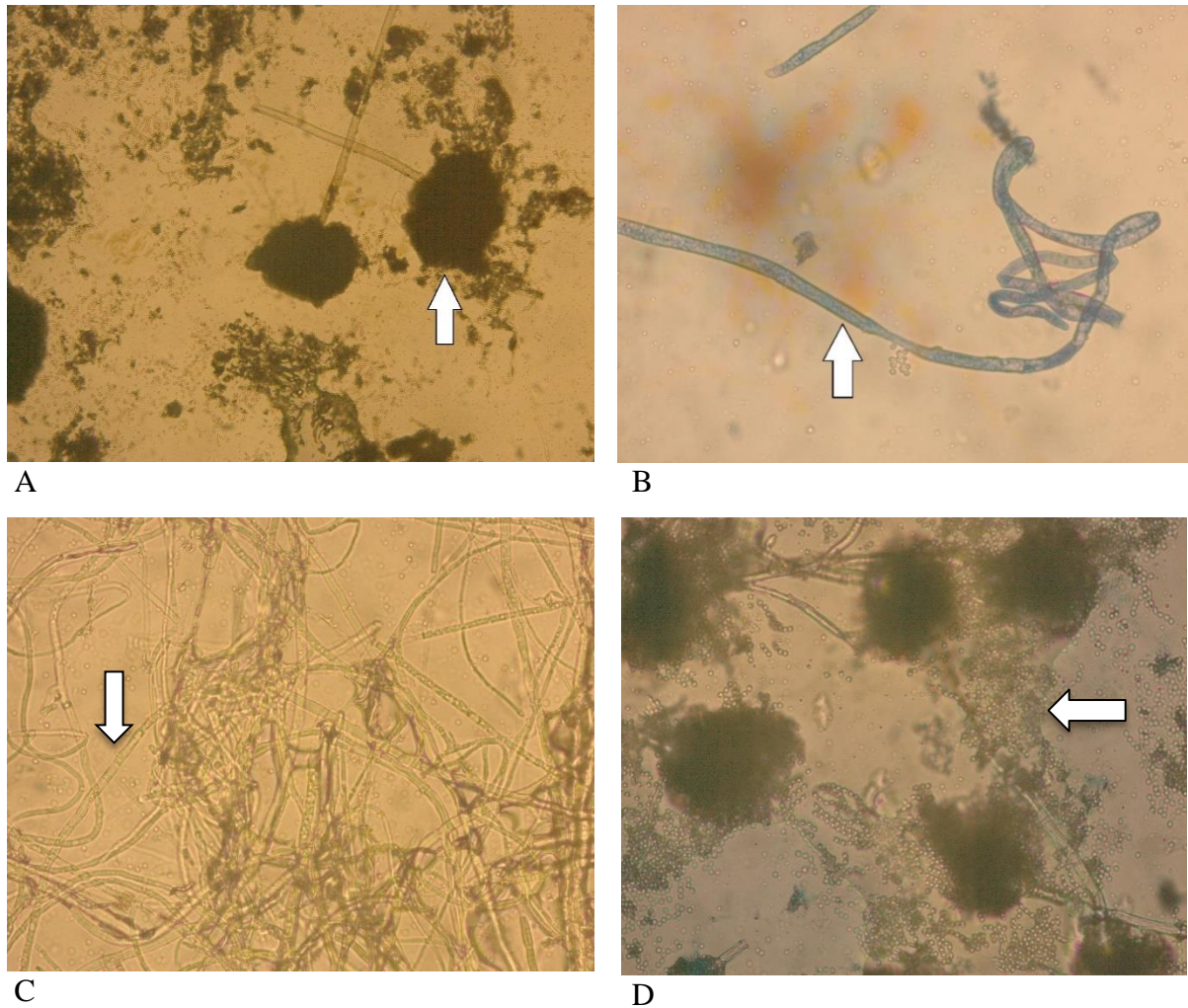


Figura 7. A. B. C. D. Microscopia de fungos isolados. (A) amostra P1/A3/10⁻¹, apresentando hifas aéreas (corpos de frutificação) com esporos reprodutivos, objetiva 10x. (B) amostra P1/A5/10⁻¹, hifa cenocítica (não septada) com coloração, objetiva 40x. (C) amostra P1/A4/10⁻², hifa septada, objetiva 40x. (D) amostra P1/A5/10⁻², esporos reprodutivos, com coloração, objetiva 40x. Fonte: Paulo Victor dos Santos (2018).

Na figura 7A é possível observar um corpo de frutificação de um isolado fúngico da amostra A3 10⁻¹ placa 1. Este corpo de frutificação pode ser observado nos fungos do gênero *Aspergillus*, como ilustrado na Figura 8A.

Na figura 7B é possível observar uma hifa cenocítica (sem septo) de um isolado fúngico da amostra A5 10⁻¹ placa 1.

Os fungos filamentosos são caracterizados por filamentos longos de células conectadas. Esses filamentos são denominados hifas. As hifas podem apresentar paredes cruzadas denominadas septos, sendo assim chamadas de hifas septadas (figura 7C). Em contrapartida, alguns fungos apresentam hifas sem septos e se apresentam como longas e contínuas células, com muitos núcleos, assim denominadas hifas cenocíticas (figura 8B).

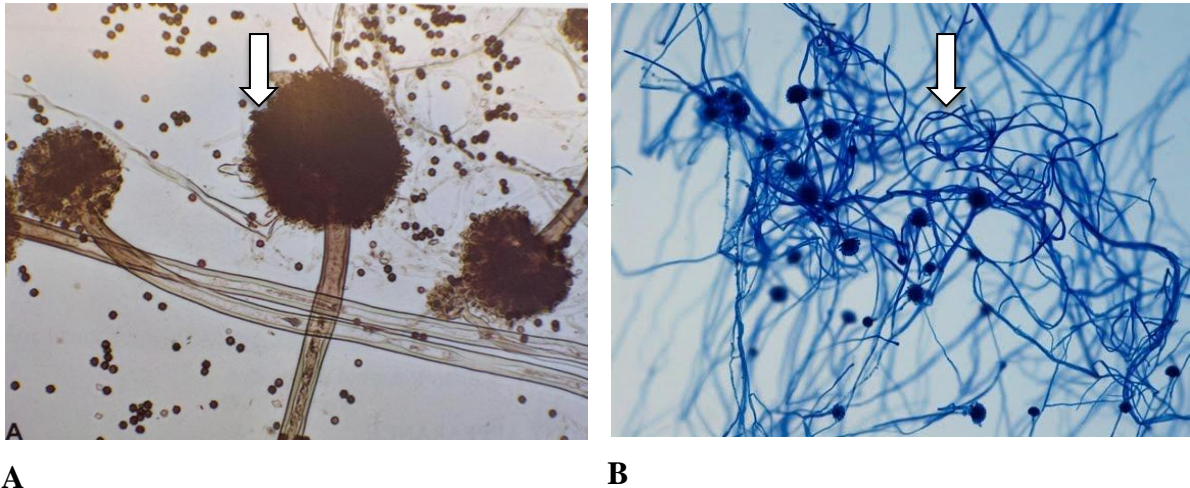


Figura 8. A: Hifas aéreas, mostrando os esporos reprodutivos (corpos de frutificação) de *Aspergillus* sp. B: Hifas cenocíticas (não septadas) de *Aspergillus flavus*. Fonte: A: <https://www.drthrasher.org/aspergillus>; B: [Aspergillus. Junglekey.com.](http://www.junglekey.com) <http://www.junglekey.fr>.

6.2.Determinação da produção de enzimas hidrolíticas de cinco colônias fúngicas selecionadas.

Para a avaliação do potencial de produção de amilases e celulases foram selecionados cinco fungos, de acordo com o item 5.2 de material e métodos, em placa de Petri, cujos resultados encontram-se apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Produção de enzimas hidrolíticas de isolados fúngicos de solo de SAF/NEA.

Amostra	Amilase	Celulase
P1/A3/10 ⁻²	+	-
P2/A3/10 ⁻²	-	-
P1/A5/10 ⁻¹	-	-
P1/A5/10 ⁻²	+	-
P2/A5/10 ⁻²	-	-

+: resultado positivo para a presença de halo de degradação; -: resultado negativo para ausência de halo.

Na figura 9, encontram-se ilustrados os resultados dos testes em placa de Petri para amilases, referente a dois fungos isolados das amostras selecionadas.

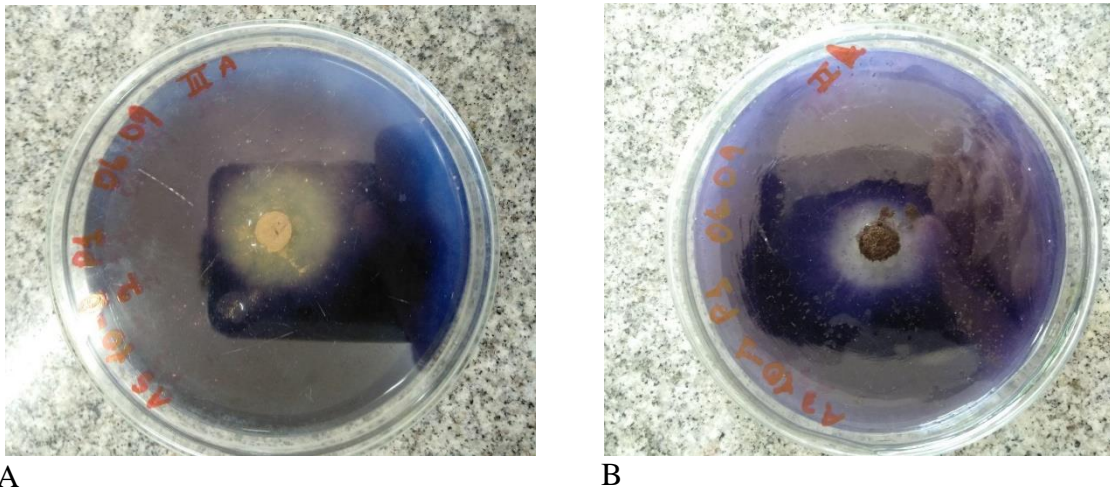


Figura 9. A, B: Teste semi-quantitativo de produção da enzima amilase após revelação com solução de iodo 0,1%: P1/A5/10⁻² (A) e P1/A3/10⁻²(B). Fonte: Paulo Victor dos Santos (2018).

Conforme resultados da Tabela 2, pode-se observar que as amostras P1/A5/10⁻² e P1/A3/10⁻² apresentaram resultados positivos para a presença de halo de degradação de amilase sendo que estes fungos apresentaram potenciais produtores de amilases, pois apresentaram índices enzimáticos (IE) $\geq 2,00$ (Oliveira, 2006) conforme mostra a Tabela 3.

Terra (2008) isolou fungos de cavernas e relatou que os fungos considerados como potencialmente produtores de enzimas amilolíticas corresponderam a 12,87% dos isolados fúngicos testados. O isolado *Aspergillus terreus*, apresentou o maior valor de índice enzimático (3,57), sendo que as espécies consideradas como potencialmente produtoras pertencem aos gêneros de *Aspergillus* e *Penicillium*.

Fernandes (2009) obteve resultados da espécie de *Penicillium verrucosum* obtida de frutos de café, se destacou como um fungo produtor da enzima amilase, apresentando um índice enzimático de 4,25. Stroparo et al. (2012) avaliou que alguns dos fungos não foram capazes de produzir enzimas, como *P. verrucosum*, cuja atividade amilásica não foi detectada.

Silva et al. (2011) observou que fungos isolados do solo do gênero *Fusarium* não apresentaram capacidade de degradar o amido.

Tabela 3. Atividades semi-quantitativas de amilase produzida por isolados fúngicos de solo da SAF/NEA.

Amostra	Diâmetro do halo de degradação (mm) ¹	Diâmetro do halo da colônia (mm) ¹	Índice Enzimático (IE) ²
P1/A5/10 ⁻²	24 mm	5 mm	4,8
P1/A3/10 ⁻²	13 mm	5 mm	2,6

¹ Médias de triplicata. ² Os valores dos índices enzimáticos (IE) representam a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia.

Na figura abaixo, encontram-se ilustrados os resultados dos testes para celulase.

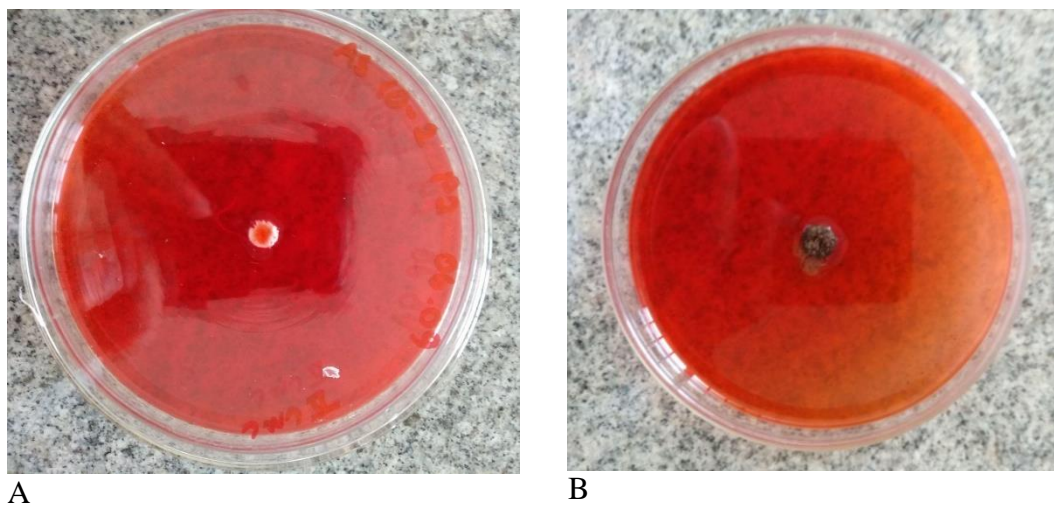


Figura 10. A, B: Teste semi-quantitativo de produção da enzima amilase após revelação com solução vermelho Congo 0,1%: P2/A5/10⁻² (A) e P1/A3/10⁻¹(B). Fonte: Paulo Victor dos Santos (2018).

Conforme resultados da Tabela 2, pode-se observar que as cinco amostras apresentaram resultados negativo para a presença de halo de degradação da celulase, sendo que estes fungos não apresentaram potenciais produtores de celulase de acordo com a metodologia utilizada.

Gomes (2007) observou que a atividade da celulase depende, não somente das espécies, mas das técnicas utilizadas para a presença do halo de degradação.

Segundo Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004), os fungos que decompõem substâncias celulósicas geralmente ocorrem no solo, colonizando vegetais, suas raízes e resíduos, com importante função de reciclagem de nutrientes.

Silva et al. (2011) concluiu que fungos isolados de solo de sistemas agroflorestais apresentaram os maiores índices enzimáticos para celulase e, entre estes, as espécies que se

destacaram foram *Cladosporium cladosporioides* e *P. chrysogenum*, sendo indicadas para estudos de produção em meio líquido.

Analisando a atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia – Itatins, São Paulo, Ruegger e Tauk – Tornisielo (2004) mostrou que a visualização do halo depende de vários fatores, além da composição do meio de cultura mas que cultivadas em ágar carboximetilcelulose apresentaram crescimento esse resultado mostrou a importância do controle dos fatores ambientais de crescimento, como a presença de aminoácidos e/ou fontes orgânicas de nitrogênio, além de que a utilização do ágar carboximetilcelulose contendo baixas concentrações de asparagina e extrato de leveduras foi fator importante para a produção da celulase nesses fungos.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o desenvolvimento do presente trabalho foi possível realizar o isolamento de aproximadamente 35 colônias fúngicas, que apresentaram uma grande diversidade de formatos, texturas e pigmentos.

Posteriormente foram selecionadas cinco colônias fúngicas, devidamente purificadas e submetidas à avaliação de produção das enzimas amilases e celulasas.

Foi possível detectar a capacidade de produção da enzima amilase apenas em dois isolados fúngicos (P1/A3/10-2 e P1/A5/10-2). A produção da enzima celulase não foi verificada nos isolados fúngicos testados.

A capacidade de síntese de enzimas extracelulares torna os fungos os principais decompositores de matéria vegetal, sobretudo as partes ricas em celulose, que não são digeridas por outros seres vivos.

A não detecção das atividades das enzimas amilases e celulasas em grande parte dos isolados fúngicos testados, pode ser considerada apenas no contexto da metodologia de análise utilizada. Recomenda-se que novas metodologias sejam avaliadas para a verificação da capacidade hidrolítica dos fungos isolados.

Também recomenda-se um criterioso processo de purificação e identificação das colônias fúngicas isoladas.

A utilização de Safs é uma opção viável que concorre para melhor utilização do solo, para reverter os processos de degradação dos recursos produtivos, de alimentos e de serviços ambientais, mas apesar do reconhecimento dos benefícios dos Safs, o seu conhecimento e uso ainda são limitados. Isto representa uma oportunidade para o desenvolvimento de maiores ações de pesquisa, para a valorização dos benefícios ambientais e de maiores incentivos econômicos que venham a estimular sua implantação.

8. REFERÊNCIAS

- ANGELINI, Guilherme Augusto Robles et al. 11337 - Atividade microbiana do solo sob agrofloresta e pastagem em área de manejo agroecológico, em Seropédica, RJ. **Cadernos de Agroecologia**, [S.l.], v. 6, n. 2, jan. 2012. ISSN 2236-7934. Disponível em: <<http://revistas.aba-agroecologia.org.br/index.php/cad/article/view/11337>>. Acesso em: 21 oct. 2018.
- ARATO, Helga Dias; MARTINS, Sebastião Venâncio; FERRARI, Silvia Helena de Souza. Produção e decomposição de serapilheira em um sistema agroflorestal implantado para recuperação de área degradada em Viçosa-MG. **Rev. Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 5, p. 715-721, Oct. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-67622003000500014&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 20 out. 2018
- ASSIS JUNIOR, Sebastião Lourenço de et al. Atividade microbiana do solo em sistemas agroflorestais, monoculturas, mata natural e área desmatada. **Rev. Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 35-41, feb. 2003. ISSN 0100-6762. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-67622003000100005&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 21 out. 2018.
- BARATTO, César Milton et al. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência - Ciência e Biotecnologia**, [S.l.], v. 11, n. 2, p. 15-28, jun. 2012. ISSN 2236-6059. Disponível em: <<https://editora.unoesc.edu.br/index.php/evidencia/article/view/1689>>. Acesso em: 20 out. 2018.
- CARVALHO, Rodrigo; GOEDERT, Wenceslau J.; ARMANDO, Marcio Silveira. Atributos físicos da qualidade de um solo sob sistema agroflorestal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 11, p. 1153-1155, Nov, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2004001100015&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 20 out. 2018.
- COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 2006. 160p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- COSTA, Rogério Sebastião Corrêa da et al. **Micorrizas arbusculares em sistemas agroflorestais em duas comunidades rurais do Amazonas**. 2010. 155p. Tese (Doutorado

em Biotecnologia para área agroflorestal) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.

DE MATOS, E. P. N. B.; WEBER, O. B. Metabolismo e densidade populacional de bactérias, fungos filamentosos e actinomicetos de agrossistemas no Ceará. In: **Embrapa Agroindústria Tropical-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 9, 2009, São Lourenço. Anais. São Lourenço: Sociedade de Ecologia do Brasil, 2009.

FEITOSA, C.I. **Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactérias isoladas de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa**. 2009.105p. (Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos) - UNIT-Universidade Tiradentes, Aracaju, 2009.

FERNANDES, A. P. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes**. 2009. 55p. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras, Lavras.

GOMES, D. M. F; CAVALCANTI, M. A. de Q; PASSAVANTE, J. Z. de O. Fungos filamentosos isolados de sedimento do manguezal de Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil. *Tropical Oceanography*, Recife, v. 39, n. 1, p. 36-45, 2011.

GOMES, Daniela Neto Ferreira. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco**. 2007. 115p. Tese de Doutorado. Dissertação (Pós-graduação em Biologia de Fungos). Universidade de Pernambuco, Pernambuco. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/670>>. Acesso em 13 out.2018.

GUPTA, R; MOHAPATRA, H; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial α -Amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, London, v. 38, n. 11, p. 1-18, jan. 2003. Disponível em <https://www.academia.edu/2565251/Microbial_%CE%B1-amylases_a_biotechnological_perspective>. Acesso em 21 out.2018.

LOGUERCIO-LEITE, Clarice et al. A particularidade de ser um fungo – I. Constituintes celulares. **Biotemas**, Florianópolis, v. 19, n. 2, p. 17-27, jan. 2006. ISSN 2175-7925. Disponível em: <<https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/21201/19172>>. Acesso em: 29 out. 2018.

MATTOS, Maria Laura Turino. Microbiologia do solo. In: NUNES, Ramom Rachide; REZENDE, Maria Olímpia Oliveira. **Recurso solo: propriedades e usos**. São Carlos: Editora Cubo, 2015, p. 250-272.

MEDRADO, M. J. S. Sistemas agroflorestais: aspectos básicos e indicações. In: Galvão, A.P.M. **Reflorestamento de Propriedades Rurais Para Fins Produtivos e Ambientais**. Brasília: EMBRAPA, 2000, p. 269-312.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, Marcela; MILAGRES, Adriane M. F. Enzimas-Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, v. 41, p. 28-33, 2007.

NAIR, P.K.R. **Soil productivity aspects of agroforestry: science and practice in agroforestry**. ICRAF/ Kluwer Academic Publishers.1984. 96p.

NEVES, Aline Abreu. **Biodegradação de materiais poliméricos por fungos filamentosos**. 2011.87p. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Engenharia Ambiental) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia, São Paulo. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/120174>>. Acesso em: 20 out. 2018.

OLIVEIRA, A. N. et al. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de Rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.

OLIVEIRA, S. D.; LEMOS, J. L. S.; BARROS, C. A.; LEITE, S. G. F. Emprego de Fungos Filamentosos na Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo: **Estado da Arte. Série Tecnologia Ambiental**, n. 45. 67 p. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008.

ORLANDELLI, Ravelly Casarotti et al. ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL: PRODUÇÃO POR FUNGOS E APLICAÇÕES. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, [S.l.], v. 7, n. 3, dez. 2012. ISSN 1980-0002. Disponível em: <<http://revista2.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios2/article/view/1346>>. Acesso em: 21 out. 2018.

PEZARICO, Carmen Regina et al. Indicadores de qualidade do solo em sistemas agroflorestais. **Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 56, n. 1, p. 40-47, 2013. Disponível em: <<http://btcc.ufra.edu.br/index.php/ajaes/article/view/612>>. Acesso em: 21 out. 2018.

PRADE, C. A. et al. Diversidade de fungos do solo em sistemas agroflorestais de Citrus com diferentes tipos de manejo no município de Roca Sales, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.15, n.1, p.73-81, 2007. Disponível em: <<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fabio/article/view/256>>. Acesso em: 25 out. 2018

RECH, Morgana et al. Microbiota do solo em vinhedos agroecológico e convencional e sob vegetação nativa em Caxias do Sul, RS. **Revista Brasileira de Agroecologia**, [S.l.], v. 8, n. 3, dec. 2013. ISSN 1980-9735. Disponível em:<<http://revistas.aba-agroecologia.org.br/index.php/rbagroecologia/article/view/13264>>. Acesso em: 21 out. 2018.

RIBASKI, J.; MONTOYA, L.J.; RODIGHERI, H. R. Sistemas agroflorestais: aspectos ambientais e socioeconômicos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, V.22, n. 212. P. 61-67, 2001.

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 de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84042004000200001&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 21 out. 2018.

SENA, A. R.; KOBLITZ, M. G. B.; GÓES NETO, A.; UETANABARO, A. P. T. Seleção de fungos do semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. **Sitientibus**, n. 35, p. 91-98, 2006.

SILVA, D. C. V. et al. Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do Município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 34, p. 607-610, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84042011000400014&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 29 out.2018.

SILVA JUNIOR, José Pereira da; CARDOSO, Elke Jurandy Bran Nogueira. Micorriza arbuscular em cupuaçu e pupunha cultivados em sistema agroflorestral e em monocultivo na Amazônia Central. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 41, n. 5, p. 819-825, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2006000500014&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 21 out.2018.

SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Instituto Agronômico. Campinas, 2007. 312 p.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 178p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

STROPARO, Erivelton César et al. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v. 33, n. 6, p. 2267-2278. 2012. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445744116020>> Acessado em: 29 de outubro de 2018.

TERRA, M. F. **Atividade enzimática de fungos filamentosos isolados de cavernas da caatinga brasileira**. 2008. 60p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ZANCHETTA, Ariane. **Produção de celulasas fúngicas por fermentação em estado sólido e submersa utilizando biomassa lignocelulósica**. 2012. 88 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2012. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/94858>>. Acesso em: 21 out. 2018.