

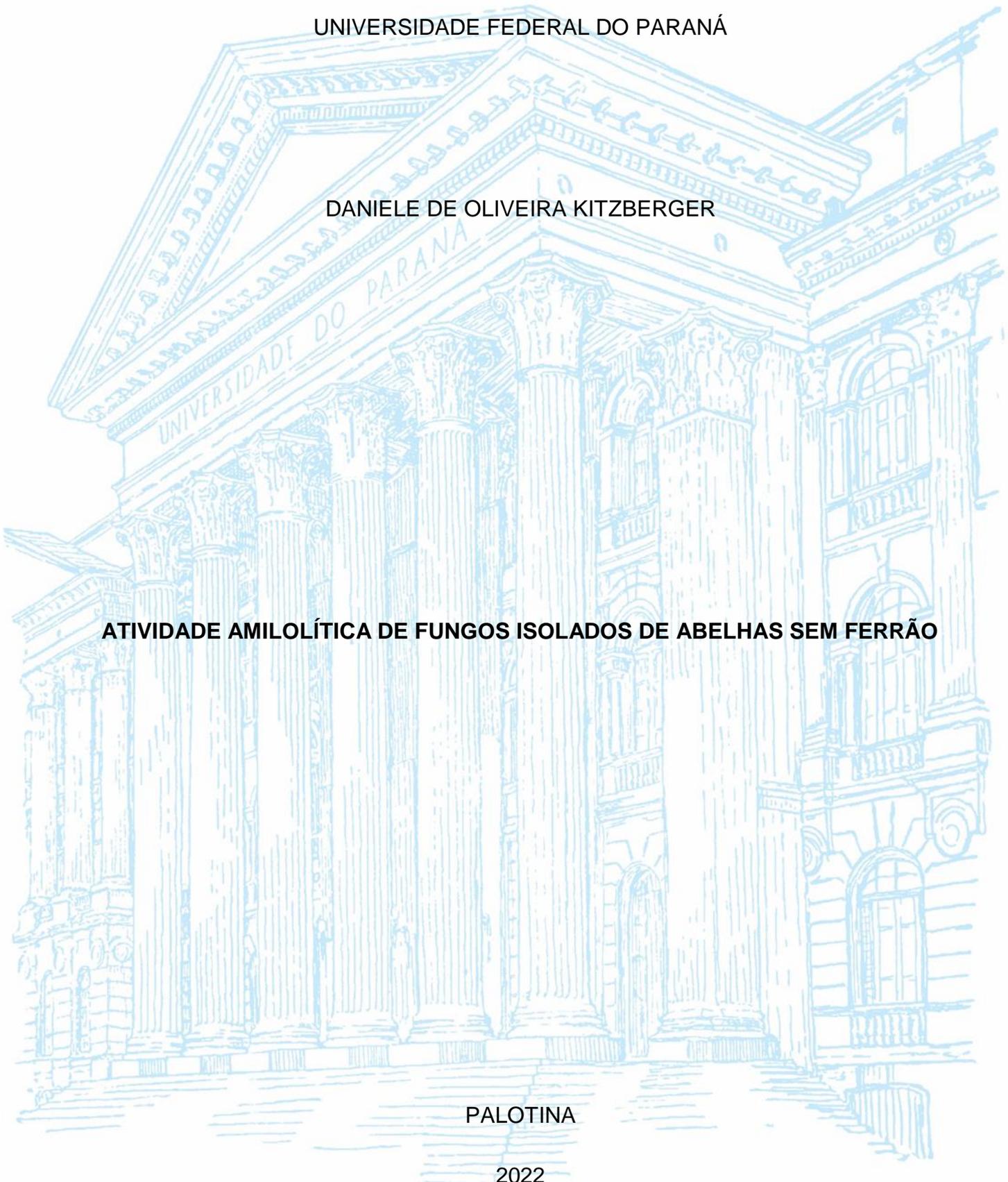
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIELE DE OLIVEIRA KITZBERGER

**ATIVIDADE AMIOLÍTICA DE FUNGOS ISOLADOS DE ABELHAS SEM FERRÃO**

PALOTINA

2022



DANIELE DE OLIVEIRA KITZBERGER

**ATIVIDADE AMILOLÍTICA DE FUNGOS ISOLADOS DE ABELHAS SEM FERRÃO**

TCC apresentado ao curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheira em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Adriana Fiorini Rosado

PALOTINA

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO DE BIOCÊNCIAS  
Rua Pioneiro, 2153, - - Bairro Jardim Dallas, Palotina/PR, CEP 85950-000  
Telefone: 3360-5000 - <http://www.ufpr.br/>

## ATA DE REUNIÃO

Aos dezesseis dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte e três, às dezesseis horas, de forma remota através da plataforma digital Microsoft Teams (<https://teams.microsoft.com//meetup-join/19:dXHWYwsg6K0tuQ85s3QfM2lp9RE-h9kvX1UZHY9oDsl1@thread.tacv2/1674764997943?context=%7B%22Tid%22:%22c37b37a3-e9e2-42f9-bc67-4b9b738e1df0%22,%22Oid%22:%228e0aa77d-3c20-43c0-9a68-7744ee6c8a7a%22%7D>), Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, realizou-se a Defesa Pública e Oral do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Atividade amilolítica de fungos isolados de abelhas sem ferrão" apresentado pela discente Daniele de Oliveira Kitzberger, orientado pela Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado, como um dos requisitos obrigatórios para conclusão do curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Iniciados os trabalhos, a orientadora e Presidente da Banca concedeu a palavra à discente, para exposição do seu trabalho. A seguir, foi concedida a palavra em ordem sucessiva aos membros da Banca de Exame, os quais passaram a arguir o discente. Ultimada a defesa, que se desenvolveu nos termos normativos, a Banca de Exame, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído ao discente as seguintes notas: Profa. Dra. Raquel Stroher, nota: 90 (noventa), Prof. Dr. Fabio Rogério Rosado, nota: 90 (noventa) e Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado, nota: 90 (noventa). A nota final do discente, após a média aritmética dos três membros da banca de exame, foi 90 (noventa). As considerações e sugestões feitas pela Banca de Exame deverão ser atendidas pela discente sob acompanhamento de sua orientadora. Nada mais havendo a tratar foi lavrada a presente ata, que, lida e aprovada, vai por todos assinada eletronicamente.



Documento assinado eletronicamente por **ADRIANA FIORINI ROSADO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 16/02/2023, às 17:55, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **FABIO ROGERIO ROSADO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 16/02/2023, às 17:57, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **RAQUEL STROHER, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 16/02/2023, às 20:53, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **5303809** e o código CRC **835C90A3**.

Dedico essa vitória aos meus pais, amigos, irmão e aos meus avós, a trajetória foi difícil  
mas cheguei até a reta final.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, a Deus e a Nossa Senhora Aparecida por todo o discernimento, fé, força e coragem para enfrentar essa longa caminhada.

Agradeço imensamente aos meus pais Antonia e Evaldo, por todo apoio antes e durante a faculdade. Ao meu irmão Danilo, que sempre esteve ao meu lado mesmo estando a distância.

As amizades que conquistei em Palotina, em especial ao Acacio Batista, Ana Carolina Bertoni, Denise Festner, Francielli Assis, Erik Aguiar, Gabriel Rodrigues, Giovana Martins, Maria Leite, Matheus Vigo, Pedro Mattiuzzi e Stefani Moretto, por me darem suporte e proporcionar momentos incríveis. E demais amigos que ao longo desses anos se tornaram especiais em minha vida.

Agradeço a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriana Fiorini por ser essa professora e pessoa incrível, a qual pude ter o privilégio de ter como orientadora de pesquisa e estágio, muito obrigada por cada ensinamento, cada hora no laboratório, cada risada e apoio.

A todos os professores que de uma forma ou outra esteve presente nesta jornada, alguns mais tempo, outros menos, mas de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Ao Prof. Dr. Fabio Rogério Rosado e a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Raquel Ströher por aceitarem fazer parte da banca e por se disponibilizarem a avaliar esse trabalho.

## RESUMO

As amilases produzidas por microrganismos têm recebido considerável atenção da indústria têxtil, alimentícia, bioetanol, detergente e afins por possuírem características importantes como estabilidade à temperatura e ao pH. Os fungos filamentosos são importantes fontes de amilases. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial amilolítico, através da medida dos halos de hidrólise do amido, em meio sólido e verificar os efeitos do pH e tempo de cultivo dos fungos. Foram utilizados treze isolados de fungos filamentosos, proveniente de um projeto de bioprospecção de fungos de abelhas sem ferrão. Os fungos foram primeiramente caracterizados quanto aos aspectos macro e microscópicos e o potencial amilolítico avaliado em meio Czapek-Dox Agar (CDA) com amido. Entre os isolados, sete apresentaram halo de hidrólise do amido em pH 4.5 sendo *Alternaria alternata*, *Aspergillus oryzae*, *Curvularia lunata*, *Drechslera* sp. e três isolados de *Fusarium* spp. Dentre esses, os três isolados de *Fusarium* apresenta-se com maior potencial de hidrólise do amido. O tempo de cultivo de três dias foi considerado melhor que cinco dias, quando as colônias se espalharam pela placa de cultivo, impossibilitando a medida dos halos. Os resultados obtidos nesse trabalho são importantes pois contribuem para a prospecção de fungos com potencial biotecnológico isolados da região e fornecem informações que servirão de base para pesquisas futuras envolvendo o estudo da atividade enzimática.

**Palavras-chave:** atividade amilolítica, bioprospecção, degradação do amido, fungos filamentosos.

## ABSTRACT

Amylases produced by microorganisms have received considerable attention from the textile, food, bioethanol, detergent, and other industries since they have important characteristics such as stability at temperature and pH. Filamentous fungi are important sources of amylases. The objective of this work was to evaluate the amylolytic potential, through the measurement of starch hydrolysis halos, in solid medium and to verify the effects of pH and fungal cultivation time. Thirteen filamentous fungal were used, isolated from stingless bee in a bioprospection project. Fungi were first characterized in terms of macro and microscopic aspects and the amylolytic potential was evaluated in Czapek-Dox Agar (CDA) medium containing starch. Among the isolates, seven showed starch hydrolysis halos at pH 4.5, being *Alternaria alternata*, *Aspergillus oryzae*, *Curvularia lunata*, *Drechslera* sp. and three isolates of *Fusarium* sp. Among these, the three *Fusarium* isolates showed the highest starch hydrolysis potential. The three-day culture time was considered better than five days, when the colonies spread across the culture plate, making it impossible to measure the halos. The results obtained in this work are important because they contribute to the prospection of fungi with biotechnological potential isolated from the region and provide information that will serve as a basis for future research involving the study of enzymatic activity.

**Keywords:** amylolytic activity, bioprospecting, starch degradation, filamentous fungi.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA DO AMIDO .....	15
FIGURA 2 - MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DE <i>Epicoccum nigrum</i> .....	18
FIGURA 3 - MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DE <i>Penicillium</i> sp. ....	19
FIGURA 4 - MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DE <i>Aspergillus</i> spp.....	20
FIGURA 5 - MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DE <i>Curvularia</i> spp. ....	21
FIGURA 6 - MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DE <i>Aspergillus fumigatus</i> . ....	22
FIGURA 7 - MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DE <i>Alternaria</i> sp. ....	23
FIGURA 8 - MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DE <i>Aspergillus niger</i> .....	24
FIGURA 9 - MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DE <i>Fusarium</i> spp. ....	25
FIGURA 10 - MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DE <i>Talaromyces</i> sp.....	26
FIGURA 11 - MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DE <i>Trichoderma</i> sp. ....	27
FIGURA 12 - MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DE <i>Drechslera</i> spp. ....	28
FIGURA 13 – MEDIÇÃO DO HALO DE DEGRADAÇÃO DO AMIDO. ....	31
FIGURA 14 - MACROMORFOLOGIA DOS FUNGOS ANALISADOS .....	33
FIGURA 15 - MICROMORFOLOGIA DOS FUNGOS ANALISADOS .....	34
FIGURA 16 - FUNGOS QUE APRESENTARAM HALO DE HDRÓLISE DO AMIDO ...	37
FIGURA 17 - FUNGOS QUE APRESENTARAM HALO DE HDRÓLISE DO AMIDO ...	38
FIGURA 18 - FUNGOS QUE NÃO APRESENTARAM HALO DE HDRÓLISE DO AMIDO .....	39
FIGURA 19 - FUNGOS QUE NÃO APRESENTARAM HALO DE HDRÓLISE DO AMIDO .....	40

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS MACROMORFOLÓGICAS DOS FUNGOS. ....	32
TABELA 2 - MEDIDA DOS HALOS DE HIDRÓLISE DO AMIDO .....	36

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1 CONTEXTO.....	12
<b>1.2 OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
1.2.1 Objetivo Geral.....	13
1.2. 2 Objetivos específicos.....	13
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>14</b>
2. 1 AMILASES - IMPORTÂNCIA DA DEGRADAÇÃO DO AMIDO.....	14
2.2 POTENCIAL AMIOLITICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS.....	16
2.3 FUNGOS FILAMENTOSOS.....	17
2.3.1 <i>Epicoccum nigrum</i> .....	17
2.3.2 <i>Penicillium oxalicum</i> .....	18
2.3.3 <i>Aspergillus oryzae</i> .....	19
2.3.4 <i>Curvularia lunata</i> .....	20
2.3.5 <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	21
2.3.6 <i>Alternaria alternata</i> .....	22
2.3.7 <i>Aspergillus niger</i> .....	23
2.3.8 <i>Fusarium</i> spp. ....	24
2.3.9 <i>Talaromyces purpurogenum</i> .....	25
2.3.10 <i>Trichoderma</i> spp. ....	26
2.3.11 <i>Drechslera</i> spp.....	27
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS ESPERIMENTOS.....	29
3.2 FUNGOS SELECIONADOS.....	29
3.3 CULTIVO DE UNGOS.....	29
3.4 OBSERVAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MACRO E MICROSCÓPICA DOS FUNGO.....	29
3.5 TESTE DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA.....	30
3.6 MEDIÇÃO DO HALO DE HIDRÓLISE DO AMIDO.....	30
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>32</b>
4.1 ASPECTOS MACRO E MICROSÓPICOS DO FUNGOS FLIAMENTOSOS.....	32
4.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL AMIOLÍTICO DOS FUNGOS.....	35
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>42</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONTEXTO

As enzimas são biomoléculas encontradas em todos os processos bioquímicos. Elas apresentam grandes grupos, como por exemplo as hidrolases, que tem a capacidade de decompor moléculas complexas em moléculas menos complexas, como carboidratos em açúcares.

Devido à sua especificidade, as enzimas apresentam apenas um substrato para cada uma delas. No caso do amido, um polissacarídeo utilizado como reserva pelos vegetais, é a amilase que causa a sua quebra. As enzimas amilolíticas agem na quebra das ligações glicosídicas da cadeia de amilose e amilopectina.

Portanto, as enzimas isoladas de microrganismos apresentam um grande potencial de aplicação biotecnológica e industrial, pois podem ser produzidas em larga escala. Dentre os microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas, os fungos são considerados os organismos mais estudados pois são grandes degradadores de matéria orgânica, pois muitas espécies realizam digestão extracelular. Recentemente a demanda por enzimas de origem fúngica vem crescendo, e neste sentido, faz-se necessário estudos que busquem microrganismos capazes de produzirem estas enzimas. Alguns destes fungos conseguem secretar determinadas enzimas diretamente no meio em que se encontram, não carecendo de ruptura celular para sua liberação e facilitando sua produção em larga escala (POLIZELI et al., 2005).

Em um trabalho recente, realizado pela equipe de pesquisa do NEMA foram isolados diferentes gêneros de fungos filamentosos associados ao corpo de duas espécies de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona bipunctata* (Tubuna) e *Tetragonisca angustula* (Jataí).

Considerando que essas abelhas são ótimas fontes para o isolamento de fungos com potencial biotecnológico, a análise da atividade amilolítica desses fungos poderá contribuir para catalogar fungos com potencial biotecnológico e fornecer informações para apoiar pesquisas futuras sobre o potencial de enzimas industriais desses microrganismos.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivos avaliar a atividade amilolítica, através da técnica de formação de halo em ágar amido, de treze fungos filamentosos isolados de abelhas sem ferrão.

### 1.2. 2 Objetivos específicos

- Selecionar treze diferentes gêneros/espécies de fungos filamentosos isolados previamente de abelhas sem ferrão, pertencentes à micoteca do Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (NEMA).
- Avaliar a atividade amilolítica por meio de halo de degradação dos fungos filamentosos.
- Analisar a capacidade de fungos filamentosos em degradar o amido em meios com diferentes pHs.
- Avaliar o tempo de cultivo dos fungos filamentosos.
- Identificação microscópica e macroscópica do fungos filamentosos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 AMILASES - IMPORTÂNCIA DA DEGRADAÇÃO DO AMIDO

O amido é um carboidrato na qual as plantas utilizam como reserva, sendo considerado o segundo carboidrato mais presente na natureza, muito importante para a vida dos organismos. Ele está presente na alimentação humana, como por exemplo, batata, milho, arroz e trigo (ALMEIDA, 2015).

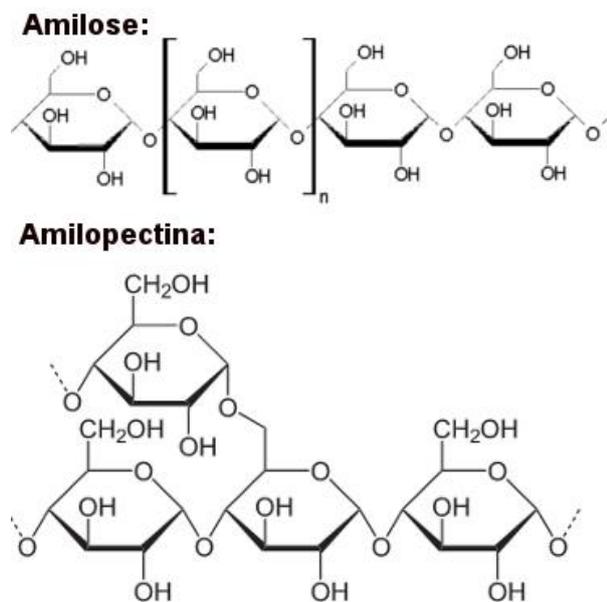
Quando é obtido a partir de frutos e sementes é denominado de amido, porém se ele vem a partir de órgão subterrâneos recebe o nome de fécula, fazem parte da dieta humana, sendo capaz de serem classificados como regulares ou nativos, podendo ser insolúvel em água gelada e precisam ter consistência de gelatina em certas aplicações biotecnológicas (OLIVEIRA, 2017).

É produzido nos plastídeos das plantas superiores, na qual é sintetizado nas folhas, acumulando-se nos cloroplastos no período em que tenha a presença de luz e durante a noite é utilizado para síntese de sacarose citosólica. A sacarose é então mandada para os órgãos de armazenamento das plantas, como frutas, sementes, raízes e tubérculos (OLIVEIRA, 2017).

Atualmente o amido é a fonte energética mais manipulada nas indústrias, onde acontece a hidrólise, deste, gerando os conhecidos “hidrolisados de amido”. Parte da fabricação é mandada para as indústrias de alimentos, pois o amido ajuda a melhorar as propriedades funcionais destes. Além disso, o amido pode ser utilizado em vários setores, como o têxtil, farmacêutico, indústrias de adesivos, explosivos, papel, construção civil, metais, cosméticos e de mineração, já que ele pode ser quimicamente modificado (OLIVEIRA, 2017).

O amido é um homopolissacarídeo constituído por cadeias de amilose e amilopectina, onde a amilose é constituída por unidades de glicose ligadas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, gerando uma cadeia linear, já a amilopectina é constituída por unidade de glicoses ligadas em  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6, gerando uma estrutura ramificada. A FIGURA 1 ilustra a estrutura de cada estrutura (ALMEIDA, 2015).

FIGURA 1 - ESTRUTURA DO AMIDO



FONTE: LUIS et al. (2017).

As amilases são enzimas responsáveis por catalisar a hidrólise de amido em açúcares, muito importante para a indústria e para a biotecnologia. Podendo ser utilizadas como aditivos em detergentes, sacarificação do amido na indústria alimentícia, fermentação, indústrias farmacêuticas, têxtil e papel.

A aplicação das enzimas amilolíticas tem algumas vantagens em relação às substâncias químicas, tanto na especificação das enzimas para a fabricação de xaropes com açúcar (que tenham propriedades físicas e químicas conhecidas), quanto na hidrólise enzimática que é mais tranquila gerando um número reduzido de reações intermediárias e de escurecimento do produto (OLIVEIRA, 2017).

De acordo com alguns autores as amilases são encontradas em três tipos de grupos:  $\alpha$ -amilases, responsáveis em romper ligações presentes no interior do substrato, as  $\beta$ -amilases, hidrolisam ligações das extremidades do substrato, e a glucoamilase que libera ligações de glicose do terminal não-redutor das moléculas do substrato. Além disso, estão divididas em duas categorias, endoamilases e exoamilases.

A endoamilase acelera a hidrólise no interior da molécula de maneira indeterminada, gerando ramos de oligossacarídeos de vários tamanhos e lineares. A exoamilase hidrolisa desde extremidades não-redutoras da cadeia ocasionando produtos menores (SPIER, 2005).

A primeira enzima usada na indústria alimentícia e de bebida foi a  $\alpha$ -amilase, conhecida também como  $\alpha$ -1,4-D-glucano glucano-hidrolases e glicogenase. Sua maior utilidade é em processos que tenham liquefação do açúcar, na indústria de bebidas fermentadas e na produção de adesivos, detergentes, ração animal e indústria papelreira (POLIZELI et al., 2016).

A  $\alpha$ -amilase pode ser composta por duas categorias: as que fazem sacarificação e hidrolisam de 50% a 60% do substrato, e aquelas que fazem liquefação e hidrolisam entre 30% e 40% do amido, mas isso pode variar com o nível de hidrólise do substrato. Além disso também apresentam subfamílias constituídas por amilases multifuncionais com arranjos catalíticos únicos, tendo uma ampla aplicação na biotecnologia, como por exemplo, a amilase formada pela bactéria termofílica *Bacillus* sp. (SPIER, 2005).

## 2.2 POTENCIAL AMIOLITICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

Para a produção de uma enzima de interesse é indicado que o microrganismo apresenta tais aspectos: alta capacidade de síntese e excreção de enzima, suportar situações diversas do ambiente (pressão osmótica, temperatura e força iônica do meio) e ser resistente às substâncias tóxicas (OLIVEIRA, 2017).

O processo de produção consiste em uma primeira fase, na qual é necessário adquirir o microrganismo do produtor, seja de linhagem selvagem ou modificada geneticamente, essa linhagem pode ser encontrada em culturas científicas, anteposto a partir do solo, água, tecidos vegetais e outros. O processo apresenta várias operações que contém o tratamento da matéria prima, o preparo de meios de propagação e produção, a esterilização e transformação do substrato em produto por via bioquímica, seguida de separação e purificação dos mesmos (OLIVEIRA, 2017).

Os fungos filamentosos são considerados grandes decompositores da matéria orgânica, pois secretam no meio extracelular diversas enzimas como proteases, celulasas, amilases, dentre outras. São organismos ubíquos, que podem ser encontrados em diversos ambientes, sendo uma fonte propícia para o isolamento de enzimas com potencial biotecnológico (BAZZO et al., 2022).

Vários trabalhos já foram publicados sobre o potencial amilolítico de fungos filamentosos, principalmente no Brasil. Khokhar e colaboradores (2011) analisaram o potencial amilolítico de cinquenta isolados fúngicos de diferentes fontes ambientais, incluindo os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*. Dentre os fungos

filamentosos isolados de material em decomposição da Mata Atlântica brasileira, as espécies mais promissoras em degradar o amido foram *Aspergillus brasiliensis* e *Rhizopus oryzae*.

Um outro trabalho desenvolvido por Souza et al. (2020) mostrou que os fungos que apresentaram maior atividade amiloítica foram *Aspergillus* e *Penicillium*, dentre os 21 isolados de fontes ambientais.

Entre os fungos isolados de uma reserva natural na Colômbia, os gêneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus* e *Lecythophora* apresentaram ao menos uma das sete atividades enzimáticas analisadas pelos autores, incluindo atividade amilolítica (MONTROYA-CASTRILLÓN et al., 2021).

## 2.3 FUNGOS FILAMENTOSOS

### 2.3.1 *Epicoccum nigrum*

*E. nigrum* é um fungo saprófita, que fornece um pigmento utilizado como antifúngico, geralmente encontrado como endófito em muitas espécies de plantas de clima tropical. *E. nigrum* apresenta uma pigmentação escura na frente da colônia e em seu verso apresenta conidióforos crescidos na superfície de um esporodóquio que é um aglomerado de hifas pseudoparenquimatosas com aparência de almofada (FIGURA 2). Na década de 50 foi realizado um estudo em 70 espécies de *Epicoccum*, que teve por finalidade a unificação de todas essas espécies em uma única espécie variável.

*E. nigrum* é um excelente produtor de metabólitos secundários de interesse biotecnológico, resultando em pigmentos carotenóides e flavonóides com ação antioxidante. Também é usado para detectar proteínas presentes em géis de eletroforese, podendo ser encontrado como Deep Purple™ Total Protein Stain.

Além disso, ele vem sendo utilizado no controle da podridão causada por *Monilinia laxa* no pêssego e na nectarina, no controle do *Sclerotinia sclerotiorum* em feijão e girassol e por fim no controle do *Pythium* em algodão (FÁVARO, 2009).

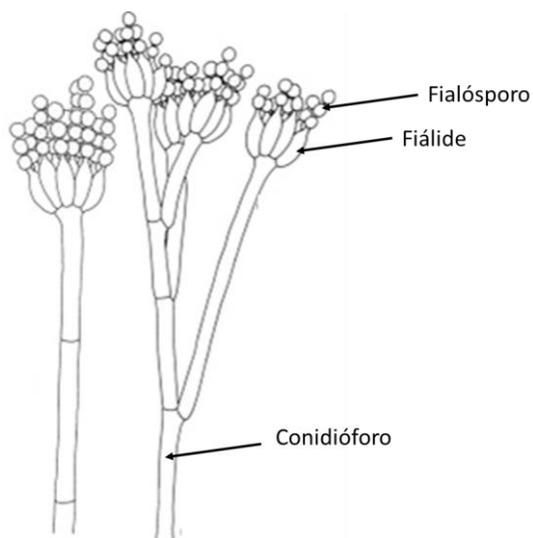
FIGURA 2 - MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DE *Epicoccum nigrum*.

FONTE: Miniatlas Mikroorganismů. Acesso em <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/epi.htm>

### 2.3.2 *Penicillium oxalicum*

O *Penicillium* apresenta grande importância para a biotecnologia, muito utilizado como modelo de estudo para diversas pesquisas, desde produção de novos fármacos, enzimas de interesses industriais, controle biológico até a produção de metabólitos secundários (PALLU, 2010).

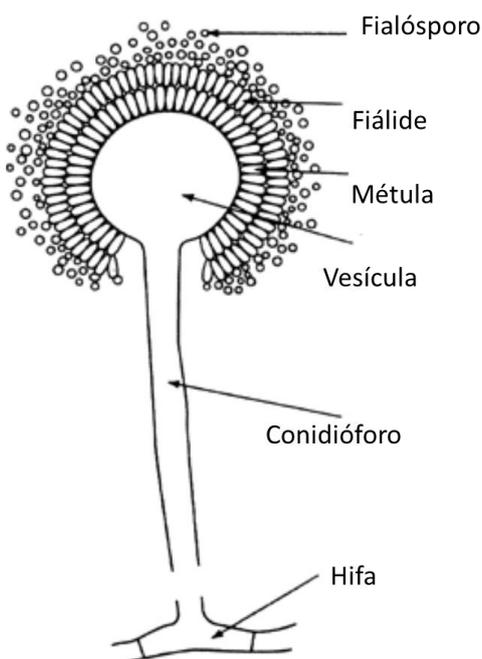
O gênero *Penicillium* desempenha grande função ecológica, pois decompõe e recicla a matéria orgânica. A espécie *P. oxalicum* apresenta colônias circulares, pigmentação verde escura e superfície com textura aveludada, sendo uma linhagem utilizada na agricultura, alimentação e produção de enzimas. Sua estrutura microscópica pode ser reconhecida pela presença de filálides ramificadas, com fialósporos enfileirados (FIGURA 3).

FIGURA 3 - MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DE *Penicillium* spp.

FONTE: Adaptado de Visagie et al. (2014).

### 2.3.3 *Aspergillus oryzae*

*A. oryzae* apresenta-se com uma coloração esbranquiçada e depois fica com uma coloração esverdeada e com o passar do tempo fica amarronzada, a textura da cultura tem aspecto de ser aveludada, além disso, é encontrado no solo e em materiais vegetais em decomposição, em regiões tropicais já que requer temperatura de crescimento relativamente quente. A espécie é uma grande aliada para a biotecnologia, já que apresenta um grande potencial de produzir e secretar grandes quantidades de proteínas e principalmente enzimas (MACHIDA et al., 2008). Como todas as espécies do gênero, a estrutura de reprodução assexuada é representada por uma hifa aérea (conidióforo) que forma uma vesícula com fiálide e fialósporos (FIGURA 4).

FIGURA 4 - MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DE *Aspergillus* spp.

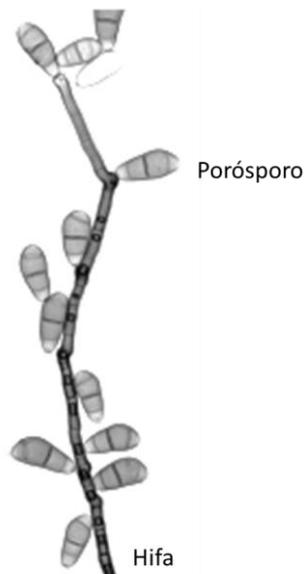
FONTE: Adaptado de Klich (2017).

#### 2.3.4 *Curvularia lunata*

*C. lunata* apresenta hifas septadas, que podem ser geniculadas, simples ou ramificadas. Os conídios são ligeiramente, mas distintamente curvados, transversalmente multisseptados, com uma célula central normalmente expandindo e mais escuro que as outras células (FIGURA 5) (GERMAIN, 2003).

Normalmente as espécies são patógenos facultativos de plantas tropicais ou subtropicais, contudo algumas podem ser isoladas em áreas agrícolas temperadas. Elas podem causar infecção humana, incluindo onicomiose, ceratite, sinusite entre outras. A morfologia da colônia apresenta textura de lã, a coloração é branca tornando-se marrom na superfície da colônia e no verso.

Algumas espécies de *Curvularia* impactam significativamente no melhoramento global de cultivos, atuam como catalisadores em reatores em batelada para biossíntese de enzimas industriais e medicamentos, bioengenharia de nanopartículas, agente biofertilizante, biorremediadores e ação na bio-hidrometalurgia, dessa forma, pode-se considerar que este gênero é de grande importância para a biotecnologia é um vetor indispensável de desenvolvimento da bioeconomia.

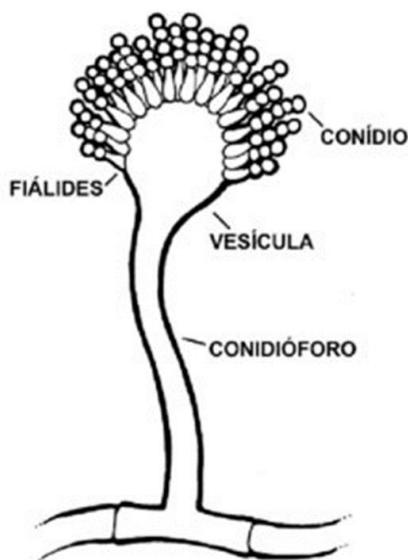
FIGURA 5 - MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DE *Curvularia* spp.

FONTE: Adaptado de Marin-Felix et al. (2017).

### 2.3.5 *Aspergillus fumigatus*

*A. fumigatus* apresenta colônias circulares, coloração verde-escura e uma textura arenosa. Geralmente é encontrado em ambientes externos como janelas, portas, entradas de aquecimento, ar condicionado e principalmente em ambiente hospitalar. É um excelente decompositor na natureza, com isso apresenta um metabolismo variado apropriado para repor nutrientes em qualquer condição ambiental.

É um patógeno oportunista com ciclo de vida assexuado, excelente esporulação que resulta em uma boa formação de conídios e com isso uma dispersão destes em correntes de ar podendo ser aspirados por seres humanos e normalmente eliminados pelo sistema de defesa do organismo. Porém, em seres humanos com baixa imunidade esta infecção pode ser fatal (LATGÉ, 2009). A micromorfologia de sua reprodução assexuada é comum a todas as espécies do gênero (FIGURA 6).

FIGURA 6 - MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DE *Aspergillus fumigatus*.

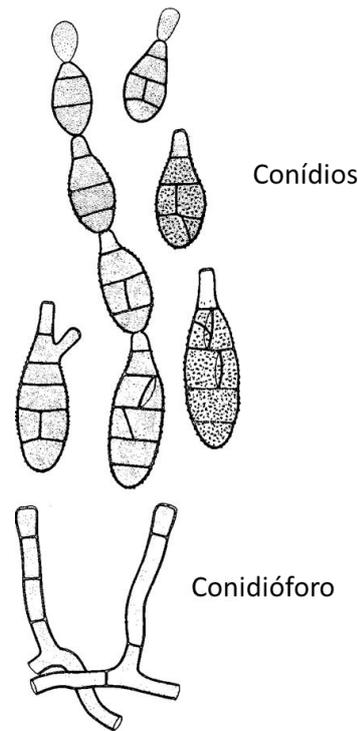
FONTE: Mesquita-Rocha (2019).

### 2.3.6 *Alternaria alternata*

*A. alternata* apresenta colônias com coloração parda, presença de alteração da coloração na superfície entre o contorno e as margens, variando de branco para palha. São produtores de micotoxinas, nas quais realizam um importante papel na patogênese e podem ser empregadas como agentes seletivos na seleção *in vitro* no nível celular para resistência a doenças (HAMID, 2000).

A morfologia microscópica desta espécie é reconhecida principalmente pelos grandes conídios multicelulares marrons (FIGURA 7). Além disso, apresenta hifas proliferantes dando origem a conidióforos, cujos ramos formam conídios ainda imaturos.

Espécies de *Alternaria* podem representar fitopatógenos importantes em muitas plantas cultivadas comercialmente, com uma variedade de potenciais hospedeiros. Porém, muitas cepas deste gênero são simbióticas com muitas plantas, como endófitos, de forma assintomática.

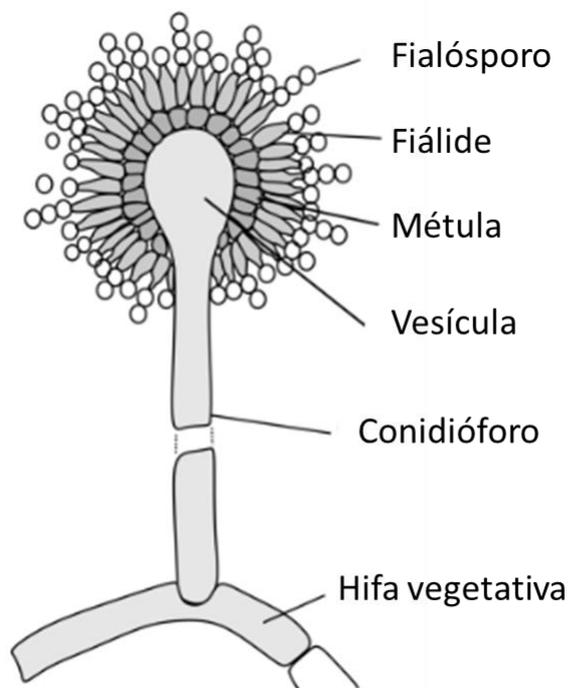
FIGURA 7 - MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DE *Alternaria* spp.

FONTE: Adaptado de Ploetz e Freeman (2009).

### 2.3.7 *Aspergillus niger*

Este fungo atua como microrganismo importante no ambiente biotecnológico pois produz um grande número de micotoxinas, é capaz de produzir não apenas proteínas e enzimas em altas concentrações, mas também produtos farmacêuticos que são benéficos para a saúde humana e animal segundo Santos (2007). Esta espécie também pode em alguns casos infectar animais e humanos, especialmente imunocomprometidos.

As infecções mais frequentes ocorrem no sistema nervoso, olhos e cavidades orbitais. Recentemente foi relatada uma infecção na cavidade oral que se disseminou para o sistema respiratório em um paciente infectado na epidemia de Covid-19, mostrando que alguns isolados podem se adaptar às condições ambientais se comportando como patógenos oportunistas. A FIGURA 8 ilustra a morfologia da estrutura de reprodução assexuada dessa espécie.

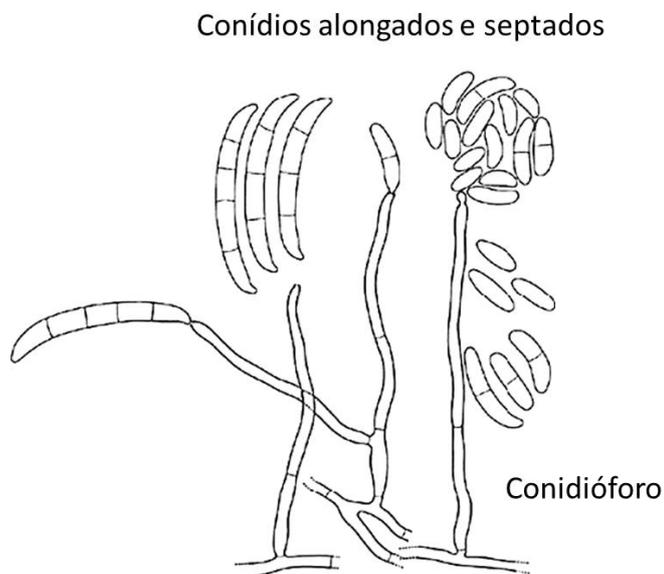
FIGURA 8 - MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DE *Aspergillus niger*.

FONTE: Adaptado de Mokobi (2021).

### 2.3.8 *Fusarium* spp.

As espécies de *Fusarium* apresentam colônias de crescimento rápido com micélios aéreos em forma de feltro ou flocoso. As colônias apresentam coloração diversificada podendo ser rosa, bordô, branco e violeta azulado, isto vai depender da espécie. Os conídios, alongados ou arredondados (FIGURA 8) são geralmente produzidos em esporodóquios e aparecem como manchas viscosas nas plantações (MOLINA et al. 2015)

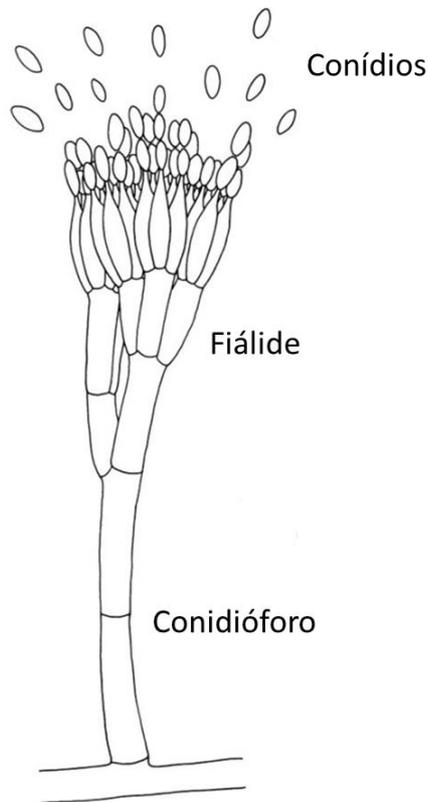
A maioria das espécies de *Fusarium* são encontradas nas frutas, uma vez que produzem grandes quantidades de micotoxinas que geram podridão radicular, cancrs e murcho das folhas, o que pode gerar doenças tanto em humanos quanto em animais. Contudo, eles podem ser muito benéficos, já que produzem metabólitos secundários, podem ser usados como pigmentos ou ter atividades biológicas com importância na área médica (NIRMALADEVI et al., 2014).

FIGURA 9 - MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DE *Fusarium* spp.

FONTE: Adaptado de Hatai (2012).

### 2.3.9 *Talaromyces purpurogenum*

*T. purpurogenum* apresenta micélio predominantemente laranja e branco, com algumas áreas aveludadas, esporulação moderadamente densa, margens largas e inteiras de micélio branco e com textura aveludada e flocosa. Esta espécie é muito utilizada nas indústrias têxtil e produção de papel, e outros. Este gênero produz ácido espiculispórico, o qual pode ser usado como detergente. A estrutura de reprodução assexuada é muito similar às de *Penicillium* spp. (FIGURA 10).

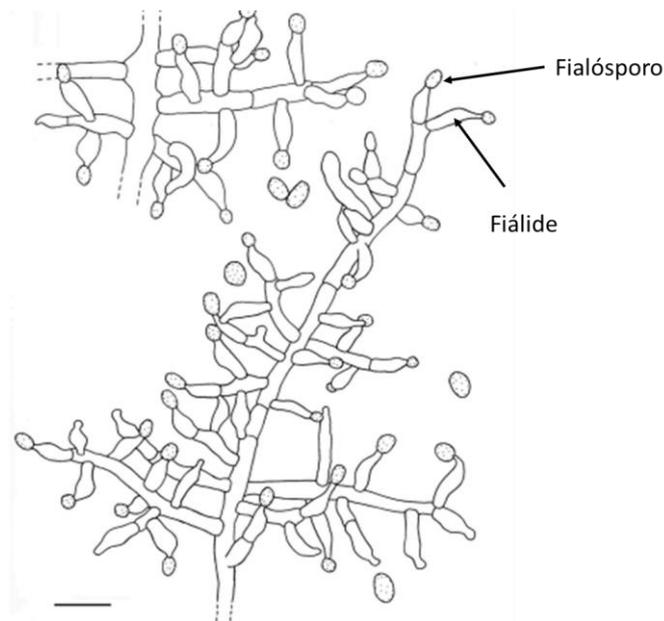
FIGURA 10 - MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DE *Talaromyces* spp.

FONTE: Adaptado de Visagie e Jacobs (2012).

### 2.3.10 *Trichoderma* spp.

Os fungos do gênero *Trichoderma* apresentam colônias com coloração branca ou branco-verde com um rápido crescimento micelial, geralmente encontrado no solo e em raízes. Apresentam grande capacidade de produzir enzimas, também induz a resistência localizada e sistêmica em uma variedade de plantas e patógenos de plantas e aumentam a absorção de nutrientes e a eficiência do uso de nitrogênio (HARMAN et al., 2004).

*Trichoderma* spp. pode contribuir para o crescimento e desenvolvimento das raízes de plantas, para a produtividade das culturas e aumentar a resistência a estresses abióticos e a absorção. Devido a este conhecimento, o gênero é considerado um aliado no controle biológico de pragas, com aplicabilidade biotecnológica. Sua estrutura microscópica é reconhecida por hifas septadas com fiálides ramificadas e fialósporos terminais (FIGURA 11).

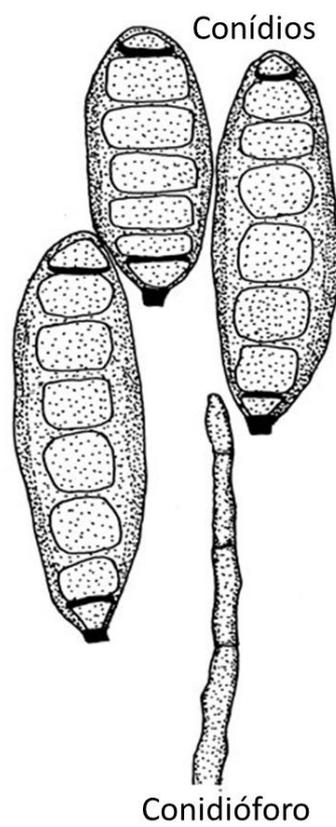
FIGURA 11 - MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DE *Trichoderma* spp.

FONTE: du PLESSIS et al. (2018).

### 2.3.11 *Drechslera* spp.

O gênero *Drechslera* spp. inicialmente apresenta-se com colônia branca e com o tempo torna-se acinzentado, sua textura é aveludada com crescimento rápido. Possui hifas septadas, conidióforos que podem ser simples, geniculados ou ramificados (FIGURA 12). Apresenta conídios fusóides, distoseptados, possui tubo germinativo desenvolvendo perpendicularmente ao eixo longo do conídio (GERMAIN, 2003).

Este gênero pode ser usado para a biorremediação da poluição por óleo cru, pois em altas concentrações de NaCl e altas temperaturas ele degrada o hidrocarboneto, condições estressantes encontradas no deserto do Kuwait (OBUEKWE et al., 2005). Também é apto para a produção de pigmentos amarelo-alaranjados, como por exemplo o *D. siccans* que fornece herbicida natural para ervas daninhas, portanto, este gênero é um excelente vetor para a biotecnologia (EVIDENTE et al., 2005).

FIGURA 12 - MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DE *Drechslera* spp.

FONTE: Adaptado de Sivanesan (1985).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram realizados no laboratório do Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (NEMA) e no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina.

#### 3.2 FUNGOS SELECIONADOS

Os treze fungos filamentosos analisados nesse trabalho foram: *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *Curvularia lunata*, *Drechslera* sp., *Epicoccum nigrum*, *Fusarium* sp. (isolados 1, 2 e 3), *Penicillium oxalicum*, *Talaromyces purpurogenum* e *Trichoderma* sp.

#### 3.3 CULTIVO DOS FUNGOS

Os fungos selecionados foram isolados, em um trabalho anterior, de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona bipunctata* (Tubuna) e *Tetragonisca angustula* (Jataí) e são pertencentes à Micoteca do NEMA. Os fungos foram repicados para placas contendo (Ágar Sabouraud Dextrose - SDA), com auxílio de alça microbiológica, em condições assépticas. Após a inoculação dos fungos, as placas foram incubadas de 28 a 30°C por 5 dias para ocorrer o desenvolvimento do micélio na superfície do ágar.

#### 3.4 OBSERVAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MACRO E MICROSCÓPICA DOS FUNGOS

Essas observações foram realizadas para a confirmação da pureza das colônias e registro das características macro e microscópica de cada fungo analisado. Após o crescimento das colônias fúngicas, analisou-se as suas características macroscópicas como a cor, textura e tamanho. Posteriormente iniciou-se a análise microscópica, em que foram preparadas lâminas para a análise com o auxílio de um microscópio óptico com o objetivo de observar e identificar as principais estruturas como hifas e estruturas de reprodução assexuada. Na preparação das lâminas para microscopia de luz utilizou-se a técnica com fita adesiva (durex), em que um pedaço de fita foi estendida sobre a superfície da colônia e em seguida foi removida cuidadosamente e aderida à lâmina

contendo corante lactofenol azul de algodão. Após a preparação das lâminas, procedeu-se à observação microscópica e a fotodocumentação.

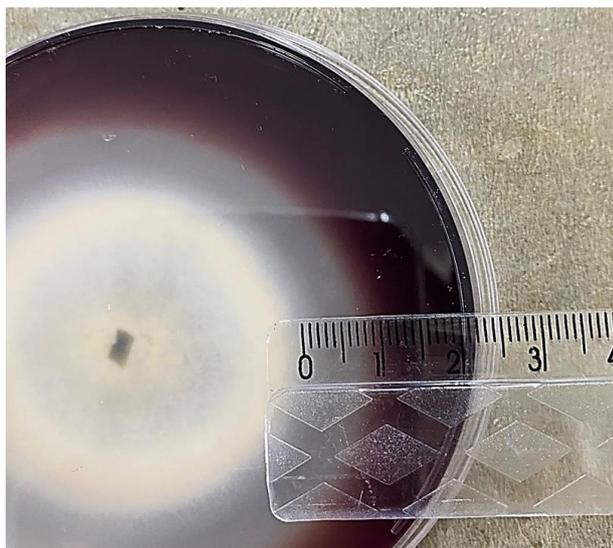
### 3.5 TESTE DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA

A avaliação da atividade amilolítica dos fungos foi realizada em placas de Petri contendo meio de cultura Czapek-Dox Agar (CDA) que utiliza o amido solúvel (2%) como única fonte de carbono. O meio CDA foi preparado com 20 gramas de amido solúvel; 1 grama  $\text{NaNO}_3$ , 1 grama de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 5 gramas de  $\text{MgSO}_4$ , 1 grama de  $\text{FeSO}_4$  e 15 gramas de ágar bacteriológico (BALKAN e ERTAN, 2005). O pH do meio foi ajustado de 7,0 para 4,0; 4,5; 5,0 e 5,5 com NaOH ou HCL. Após o ajuste do pH o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 20 min.

### 3.6 MEDIÇÃO DO HALO DE HIDRÓLISE DO AMIDO

Os fungos previamente cultivados em SDA foram repicados, com o auxílio de uma alça microbiológica, para o centro de placas de Petri contendo o Ágar Czapek-Dox. Foram considerados cultivos de 3 e 5 dias e cada fungo foi cultivado em triplicata, para cada tempo de incubação. Após o tempo de incubação, foi adicionado Lugol a 1% sobre a cultura, até cobrir toda a placa e o excesso foi removido. Para visualização da formação do halo de hidrólise do amido, as placas foram mantidas em temperatura ambiente por 24 horas. Os halos foram inspecionados visualmente e com o auxílio de um contador de colônias, com iluminação de led. Os halos foram medidos com auxílio de uma régua centimetrada (FIGURA 13).

FIGURA 13 – MEDIÇÃO DO HALO DE DEGRADAÇÃO DO AMIDO.



FONTE: O autor (2023).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ASPECTOS MACRO E MICOSCÓPICOS DOS FUNGOS FILAMENTOSOS

As principais características macromorfológicas dos fungos, incluindo morfologia, coloração e aspecto das colônias estão apresentadas na TABELA 1 e FIGURA 14. A FIGURA 15 mostra as características microscópicas, evidenciando as hifas e estruturas de reprodução assexuadas.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS MACROMORFOLÓGICAS DOS FUNGOS.

Fungo	Aspecto	Aspecto da colônia		
		Textura	Cor	Bordas
<i>Alternaria lunata</i>	Filamentoso	Algodonosa	Branco	Regulares
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Filamentoso	Arenosa	Verde-escuro	Irregulares
<i>Aspergillus niger</i>	Filamentoso	Arenosa	Preto	Irregulares
<i>Aspergillus oryzae</i>	Filamentoso	Algodonosa	Branco/Verde	Regulares
<i>Curvularia lunata</i>	Filamentoso	Algodonosa	Acinzentado	Regulares
<i>Drechslera</i> spp.	Filamentoso	Algodonosa	Acinzentado	Regulares
<i>Epicoccum nigrum</i>	Filamentoso	Algodonosa	Amarelo/ Branco	Regulares
<i>Fusarium</i> sp. (1)	Filamentoso	Algodonosa	Branco	Regulares
<i>Fusarium</i> sp. (2)	Filamentoso	Algodonosa	Branco	Irregulares
<i>Fusarium</i> sp. (3)	Filamentoso	Algodonosa	Branco	Regulares
<i>Penicillium oxalicum</i>	Filamentoso	Arenosa	Verde-escuro	Irregulares
<i>Talaromyces purpurogenum</i>	Filamentoso	Algodonosa	Branco	Irregulares
<i>Trichoderma</i> sp.	Filamentoso	Algodonosa	Verde-escuro	Regulares

FONTE: O autor (2023).

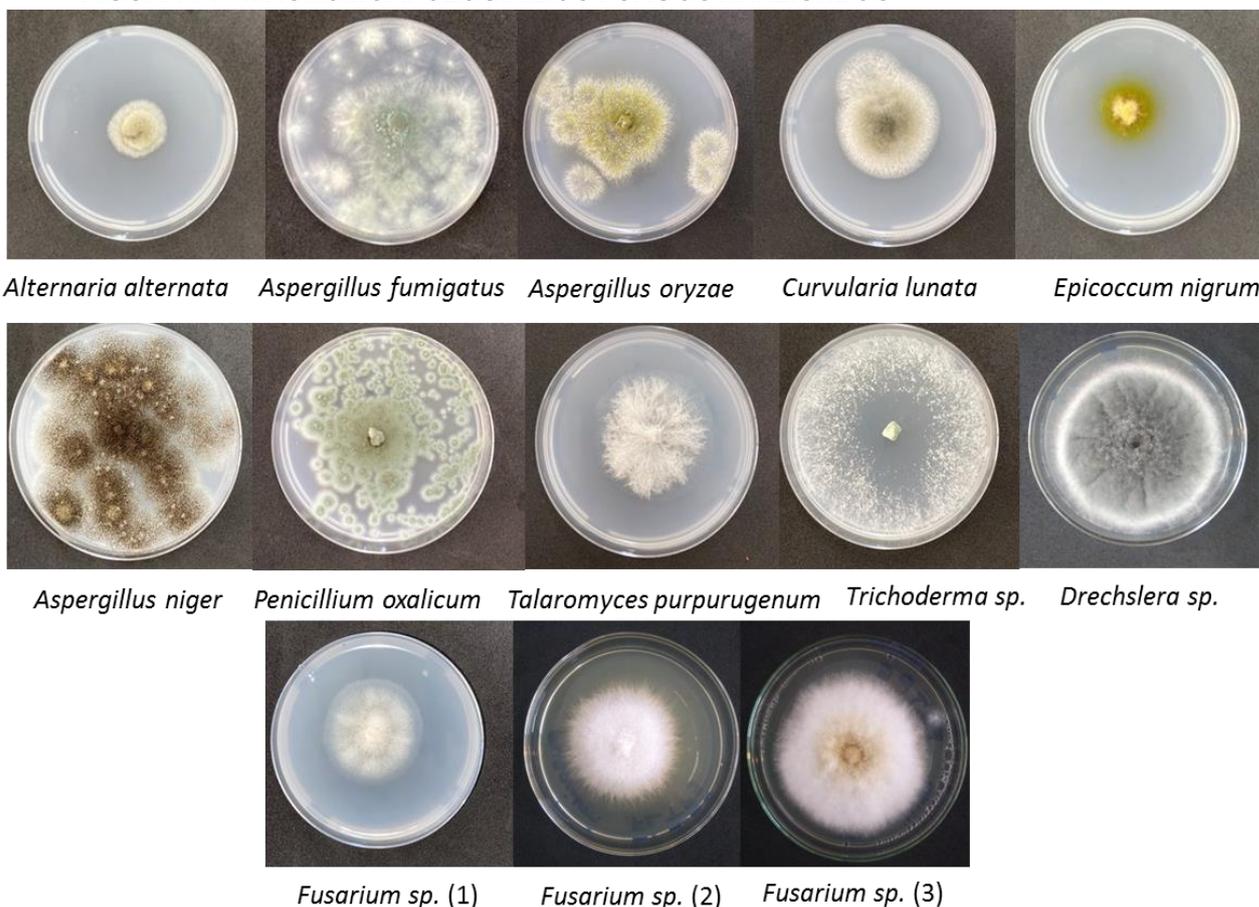
Todos os fungos apresentados acima mostraram aspectos de serem filamentosos, ou seja, eles apresentaram hifas. Os fungos *Alternaria lunata*, *Aspergillus oryzae*, *Curvularia lunata*, *Drechslera* sp., *Epicoccum nigrum*, *Fusarium* sp. (1), *Fusarium* sp. (2), *Fusarium* sp. (3), *Talaromyces purpurogenum* e *Trichoderma* spp. apresentaram textura

algodonosa, já os fungos *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* e *Penicillium oxalicum* textura arenosa.

Em relação as cores os fungos *Aspergillus oryzae* e *Epicoccum nigrum* exibiram duas cores, isto porque as cores destes podem mudar com o tempo, ou seja, de branco passam a ser verde e amarelo, respectivamente. O *Alternaria lunata*, *Fusarium* (1), (2) e (3), *Talaromyces purpurogenum* apresentaram a cor branca e o *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium oxalicum* e *Trichoderma* sp. apresentaram cor verde escuro. *Aspergillus niger* coloração preta, *Curvularia lunata*, *Drechslera* spp. coloração acinzentada.

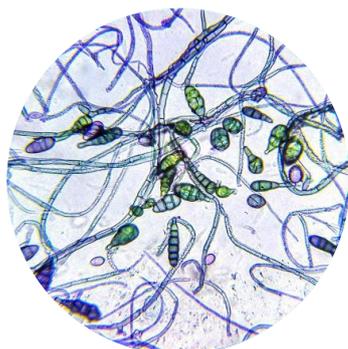
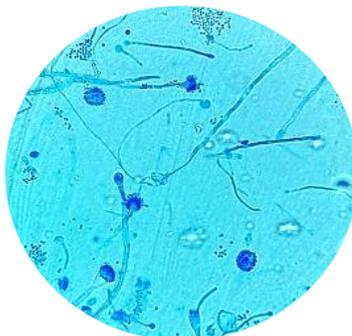
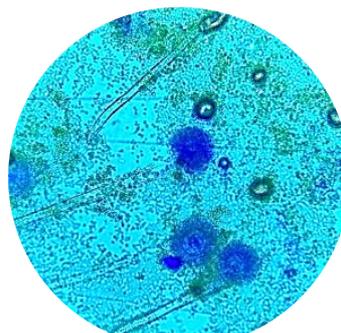
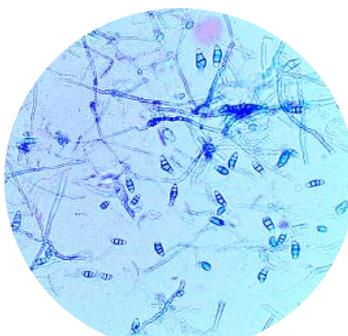
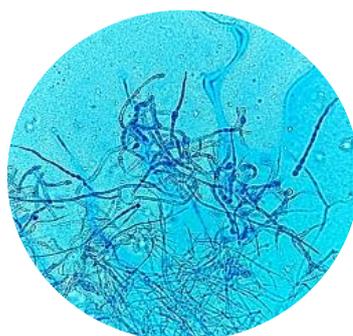
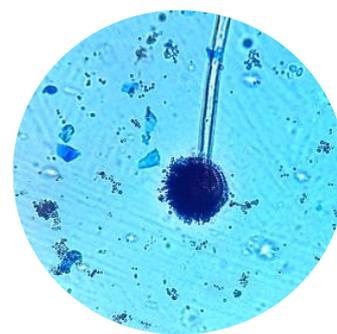
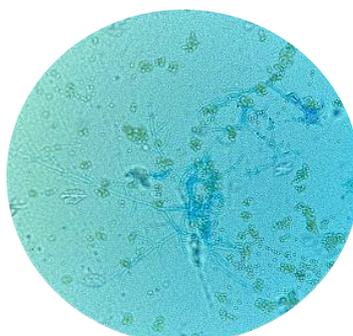
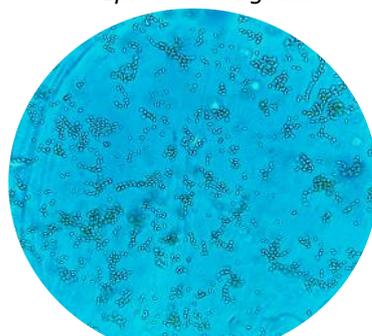
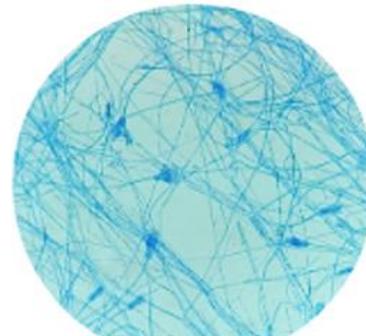
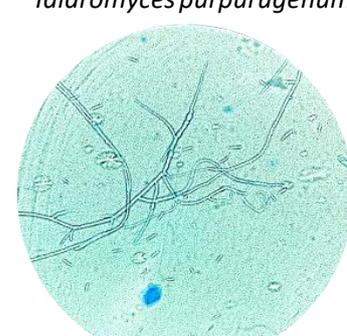
As bordas variaram de regulares a irregulares, mas grande parte apresentou-se como regular sendo eles: *Alternaria lunata*, *Aspergillus oryzae*, *Curvularia lunata*, *Drechslera* sp., *Epicoccum nigrum*, *Fusarium* sp. (1), *Fusarium* sp. (3) e *Trichoderma* sp., já os fungos *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp. (2), *Penicillium oxalicum* e *Talaromyces purpurogenum* mostrou-se com bordas irregulares.

FIGURA 14 - MACROMORFOLOGIA DOS FUNGOS ANALISADOS



FONTE: O autor (2023).

FIGURA 15 - MICROMORFOLOGIA DOS FUNGOS ANALISADOS

*Alternaria alternata**Aspergillus fumigatus**Aspergillus oryzae**Curvularia lunata**Epicoccum nigrum**Aspergillus niger**Trichoderma sp.**Penicillium oxalicum**Talaromyces purpurugenum**Fusarium sp. .2**Drechslera sp.**Fusarium sp. .1*

FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: Aumento de 400x.

Em relação a micromorfologia deste fungos a *Alternaria alternata* é identificada por apresentar grandes conídios multicelulares marrons, além disso, apresenta hifas proliferantes dando origem a conidióforos, *aspergillus fumigatus* apresenta fialosporos agrupados ao fiálides que estão na vesícula, *aspergillus oryzae* é representada por uma hifa aérea (conidióforo) que forma uma vesícula com fiálide e fialósporos, *curvularia lunata* é representada por uma hifa aérea (conidióforo) que forma uma vesícula com fiálide e fialósporos, *epicoccum nigrum* apresenta conidióforos crescidos na superfície de um esporodóquio, *aspergillus niger* apresenta fialosporos agrupado ao fiálide que estão na vesícula, *trichoderma* sp. é reconhecida por hifas septadas com fiálides ramificadas e fialósporos terminais, *penicillium oxalicum* pode ser reconhecida pela presença de filálides ramificadas, com fialósporos enfileirados, *talaromyces purpurugenum* apresenta conídios se desprendendo das filalides, pois são muito esporulentos e o *fusarium* spp. apresenta-se com conídios, alongados ou arredondados.

#### 4.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL AMIOLÍTICO DOS FUNGOS

O teste do potencial dos fungos, em degradar o amido em meio sólido foi realizado, primeiramente, em CDA preparado em três diferentes pHs (4.0, 4.5, 5.0 e 5.5). Os resultados não mostraram diferenças significativas (dados não mostrados), mas aparentemente o halo formado em pH 4,5 foi um pouco mais pronunciado e optou-se em realizar os ensaios apenas nesse pH, já que outros autores também utilizaram esse valor. Aydoğdu e colaboradores (2012) verificaram o efeito do pH (4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0) do meio CDA na atividade amilolítica de trinta e oito diferentes fungos filamentosos e observou que, as variações dos halos nos diferentes pHs depende da espécie fúngica, como citado por Shafique et al. (2009). A seleção de espécies de fungos que são adequados para a produção de amilases depende das condições ambientais, principalmente do pH.

Quanto ao tempo de cultura fúngica, foi avaliado o halo de hidrólise do amido em culturas de três e cinco dias. Os resultados das medidas dos halos e as imagens estão apresentados na TABELA 2 e FIGURAS 16 e 17 (fungos que apresentaram halo) e 18 e 19 (fungos que não apresentaram halo de hidrólise do amido).

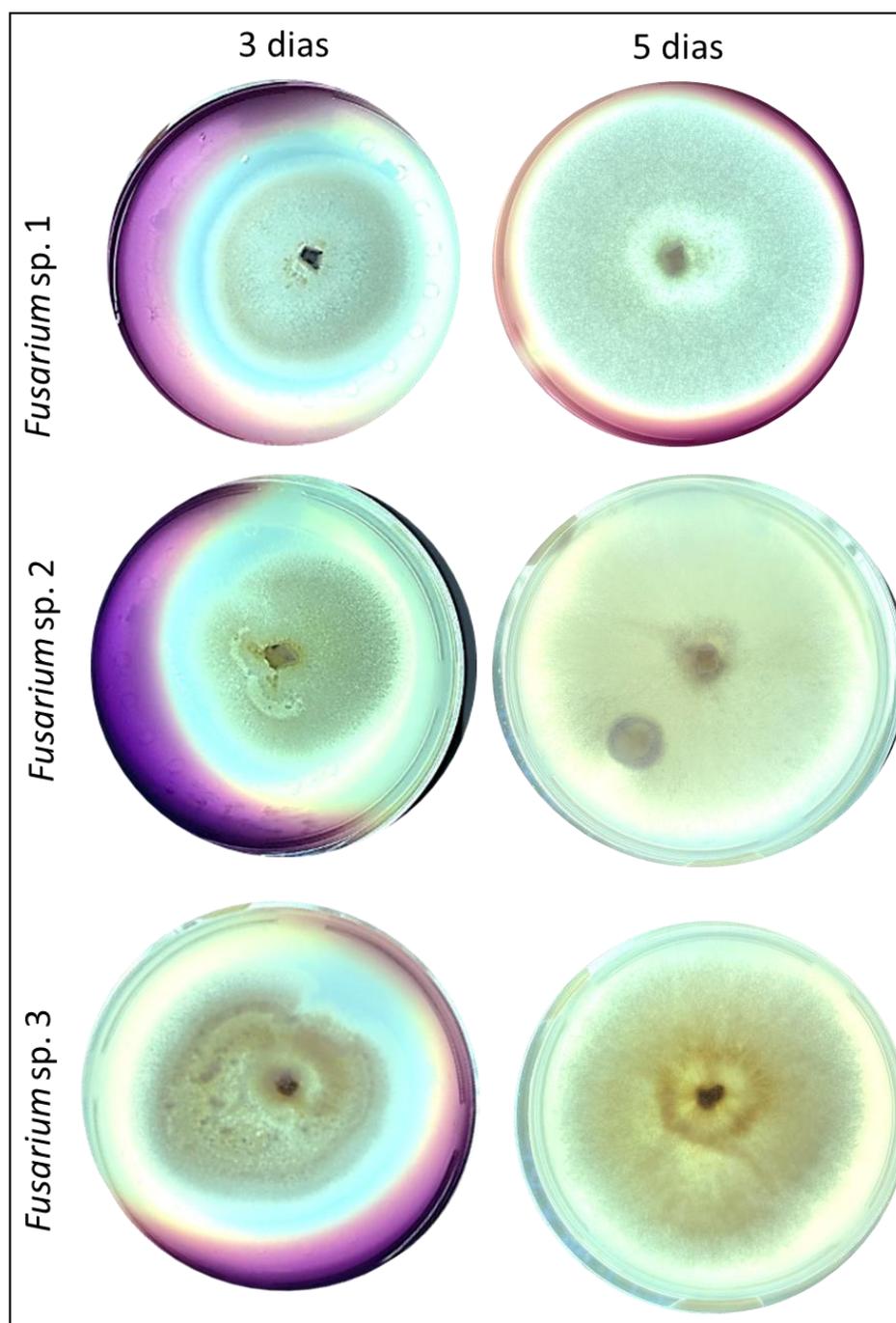
TABELA 2 - MEDIDA DOS HALOS DE HIDRÓLISE DO AMIDO

Fungos	Média das triplicatas para cada tempo de cultivo	
	3 dias	5 dias
<i>Alternaria alternata</i>	3 mm	5 mm
<i>Aspergillus oryzae</i>	2 mm	---
<i>Curvularia lunata</i>	9 mm	11 mm
<i>Drechslera sp.</i>	8 mm	---
<i>Fusarium sp. (1)</i>	15 mm	15 mm
<i>Fusarium sp. (2)</i>	10 mm	---
<i>Fusarium sp. (3)</i>	12 mm	---

FONTE: O autor (2023)

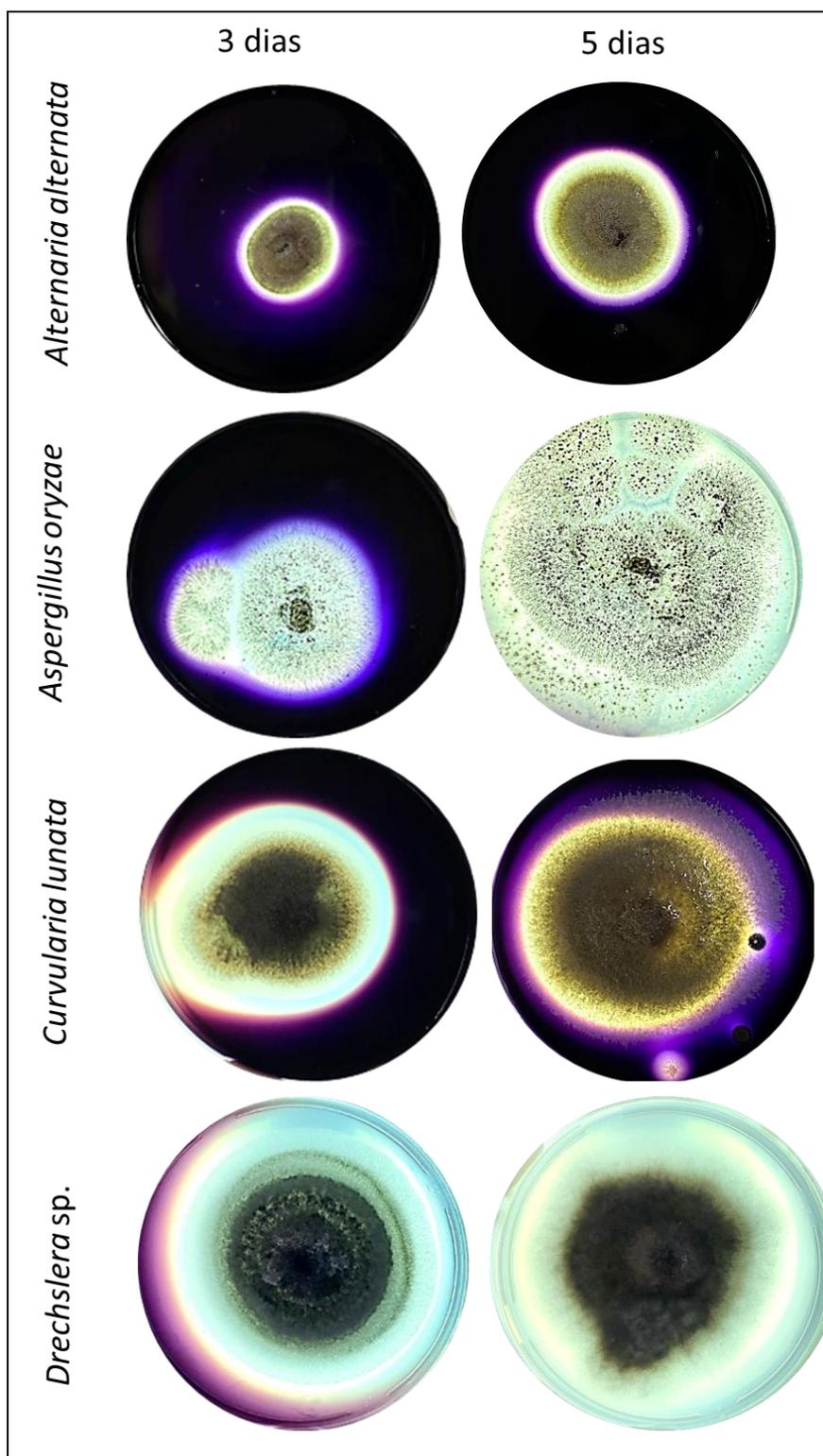
O gênero *Fusarium* spp. apresentou o maior halo, em segundo lugar, *Curvularia lunata* e na sequência, *Drechslera sp.* *Alternaria alternata* e *Aspergillus oryzae*. Exceto para *A. alternata*, *Drechslera sp.* e o isolado 1 de *Fusarium*, não foi possível fazer a medida dos halos no tempo de cinco dias, pois a colônia fúngica se espalhou pela placa.

FIGURA 16 - FUNGOS QUE APRESENTARAM HALO DE HDRÓLISE DO AMIDO



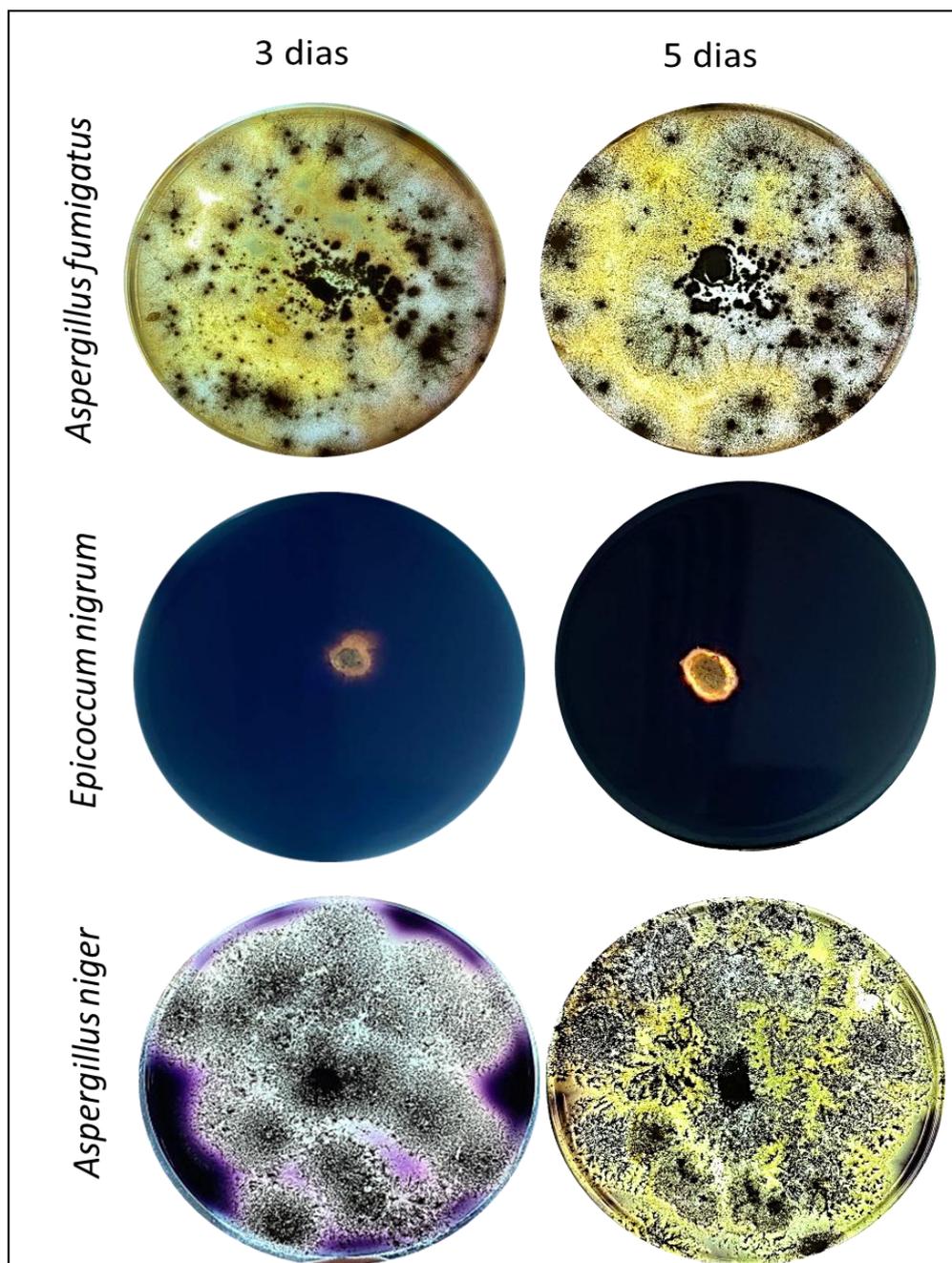
FONTE: O autor (2023).

FIGURA 17 - FUNGOS QUE APRESENTARAM HALO DE HDRÓLISE DO AMIDO



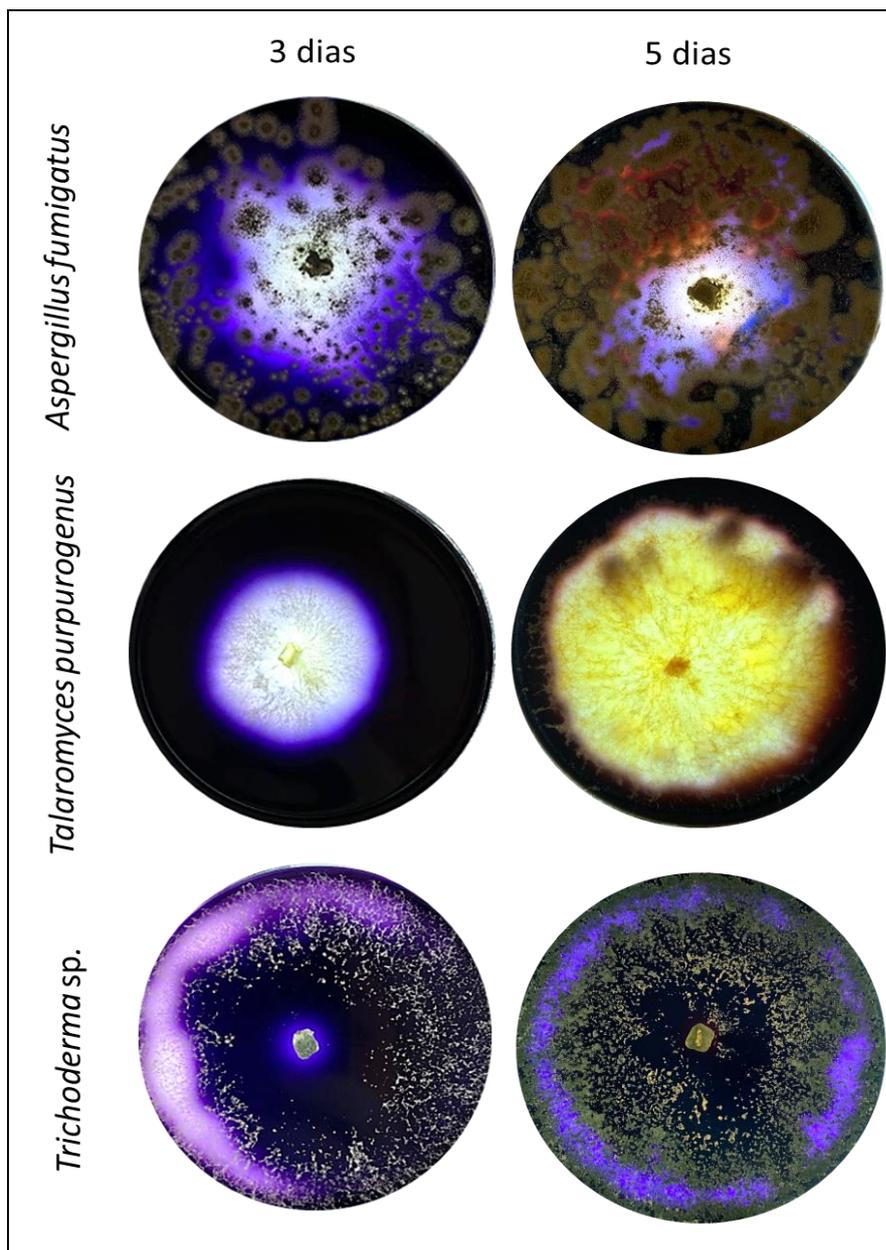
FONTE: O autor (2023).

FIGURA 18 - FUNGOS QUE NÃO APRESENTARAM HALO DE HDRÓLISE DO AMIDO



FONTE: O autor (2023).

FIGURA 19 - FUNGOS QUE NÃO APRESENTARAM HALO DE HDRÓLISE DO AMIDO



FONTE: O autor (2023).

ALMEIDA et al. (2017) verificaram a atividade amilolítica de vinte e cinco fungos filamentosos isolados a partir de material em decomposição coletados na Mata Atlântica Brasileira. As duas cepas que produziram mais amilases foram identificadas como *Aspergillus brasiliensis* e *Rhizopus oryzae*. As amilases desses fungos apresentaram atividade ótima na faixa de pH de 4,0-5,5 e temperatura entre 50 e 60°C. Nesse trabalho, os autores testaram várias fontes de carbono (amido, farelo de trigo, glicose, maltose,

cevada, bagaço, milho moído e farinha de aveia), adicionados ao meio de cultura, visando determinar o tipo de amilase sintetizada em condições ótimas de desenvolvimento do microrganismo. Os produtos dos ensaios enzimáticos foram aplicados em Cromatografia em Camada Fina (TLC) e uma solução.

Fungos isolados no Semiárido Paraibano foram analisados quanto à capacidade amilolítica por Coelho et al. (2018). As análises foram realizadas a partir de 50 isolados, dos quais apenas 27 apresentaram crescimento em meio BDA e destes apenas 10 (dez) (37,04 %) apresentaram atividade amilolítica. A formação do halo foi verificada após 72 horas de crescimento fúngico. A determinação da produção enzimática foi realizada do mesmo modo que foi utilizado no nosso trabalho, em meio sólido composto de ágar e amido solúvel. Os autores verificaram a atividade da amilase através da determinação do índice enzimático (IE), calculado pela razão do diâmetro da colônia pelo diâmetro do halo de degradação do amido. Nesse trabalho, os fungos não foram identificados.

Cepas de fungos isoladas de diferentes resíduos agrícolas comuns, na Nigéria: cascas de mandioca, cascas de inhame, cascas de banana, cascas de banana e resíduos de cervejaria foram analisados quanto à produção de amilase, utilizando cultivo submerso e em estado sólido (ADENIRAN e ABIOSE, 2009). A quantidade de amilase produzida foi verificada a partir da estimativa da quantidade de açúcares redutores produzidos após incubação a 40°C com concentração conhecida de solução enzimática. Os fungos que apresentaram maiores atividades foram *Helminthosporium oxysporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* e *Penicillium frequestantis*.

Em um trabalho recente, Boro e Narzary (2022) isolaram vários fungos e leveduras para verificar a capacidade de produção de cerveja, a partir de glicose e amido. Dentre os isolados, as espécies *Hyphopichia burtonii*, *Mucor circinelloides*, *Mucor indicus*, *Penicillium citrinum* e *Saccharomycopsis fibuligera*, apresentaram capacidade amilolítica.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Enzimas isoladas de microrganismos apresentam um grande potencial de aplicação biotecnológica e industrial já que podem ser produzidas em larga escala. Dentre os microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas, os fungos são considerados os organismos mais estudados pois são grandes degradadores de matéria orgânica, pois muitas espécies realizam digestão extracelular. Recentemente a demanda por enzimas de origem fúngica vem crescendo, e neste sentido, faz-se necessário estudos que busquem microrganismos capazes de produzir estas enzimas. Este trabalho contribuiu para o conhecimento e prospecção de fungos isolados de abelhas sem ferrão, na região Oeste do Paraná, com potencial biotecnológico. Os halos observados de hidrólise de amido indicam que os isolados fúngicos: *Alternaria alternata*, *Aspergillus oryzae*, *Curvularia lunata*, *Drechslera* sp. e principalmente *Fusarium* sp., podem ser empregados em bioprocessos na produção de enzimas com atividade amilolítica. Pretende-se, futuramente, realizar ensaios mais avançados como a análise da cinética enzimática, isolamento das amilases e teste com outros parâmetros de cultivo.

## REFERÊNCIAS

- ADENIRAN, A. H.; ABIOSE, S. H. Amylolytic potentiality of fungi isolated from some Nigerian agricultural wastes. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 667-672, 2009.
- ALMEIDA, P. Z. et al. Bioprospection and characterization of the amyolytic activity by filamentous fungi from Brazilian Atlantic Forest. **Biota Neotropica**, v. 17, n 3, 2017.
- ALMEIDA, P.Z. **Diversidade do potencial amilolítico de fungos filamentosos: purificação e caracterização de uma glucoamilase de *Aspergillus brasiliensis***.  
Dissertação de mestrado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, 2015.
- BALKAN, B. et al. Produção e Propriedades de Amilase de *Penicillium chrysogenum* e sua aplicação na hidrólise do amido. **Preparative Biochemistry Biotechnology**, v. 35, 169-177, 2005.
- BAZZO, V. et al. Bioprospection and characterization of the amyolytic activity of filamentous fungi. **Brazilian Journal of Development**, v.8, n. 5, p. 33314–33330, 2022.
- BORO, N.; NARZARY, D. Amylolytic Fungi in the Ethnic Beer Starter “emao” and Their Beer-Producing Attributes. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 6, 2022.
- COELHO, G. D. et al. Potencial de Fungos da Caatinga para Produção de Enzimas Amilolíticas. **Revista Saúde e Ciência online**, v. 7, n. 2, p. 286-297, 2018.
- du PLESSIS, I. L. et al. The diversity of *Trichoderma* species from soil in South Africa, with five new additions. **Mycologia**, p. 1557-2536, 2018.

EVIDENTE, A. et al. Drazepinone, a trisubstituted tetrahydronaphthofuroazepinone with herbicidal activity produced by *Drechslera siccas*. **Journal Phytochemistry**, v. 66, n. 6, p. 715-721, 2005.

FAVARO, L.C. L.; Diversidade e interação de *Epicoccum spp.* com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, L.). Tese de Doutorado- Universidade de São Paulo, 2009.

GERMAIN, G. S.; SUMMERBELL, R. **Identifying filamentous fungi: A clinical laboratory handbook**. 2ª ed., 2003.

HAMID, K. et al. **Physiological and molecular plant pathology**. p. 235-244, 2000.

HARMAN, G. et al. *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 43–56, 2004.

HATAI, K. Diseases of Fish and Shellfish Caused by Marine Fungi. **Progress in Molecular and Subcellular Biology**, v. 53, p. 15-52, 2012.

KHOKHAR, I. et al. Isolation and screening of amylolytic filamentous fungi. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 15, n. 1, p. 203-206, 2011.

KLICH, M. A. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. **Molecular Plant Pathology**, v. 8: p. 713-722, 2007.

LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. **The New England Journal of Medicine**. p. 2147-2148, 2009.

LUIS, A. et al. **Mundo da Bioquímica**. Disponível em: <http://mundodabioquimica.blogspot.com/2017/11/o-amido-tambem-conhecido-como-amilo-e.html>. Acesso em: 09 de nov. 2017.

MACHIDA, M. et al. Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. **Journal DNA Research**, v.15, p.173-183, 2008.

MARIN-FELIX, Y. et al. New species and records of *Bipolaris* and *Curvularia* from Thailand. **Mycosphere**, v. 8, n. 9, p. 1556–1574, 2017.

MESQUITA-ROCHA, S. *Aspergillus fumigatus*: general aspects and importance in contemporary medicine. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 37, n.2, p. 169-173, 2019.

MINIATLAS MIKROORGANISMŮ. *Epicoccum nigrum*.  
<http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/epi.htm>.

MOKOBI, F. *Aspergillus niger* - An Overview. **Microbiology notes**, 2021.  
<https://microbenotes.com/aspergillus-niger/>

MOLINA, G. et al. Comparative study of the bioconversion process using R-(+)- and S(-) limonene as substrates for *Fusarium oxysporum* 152B. **Journal Food Chemistry**, p. 606–613, 2015.

MONTOYA-CASTRILLÓN, M.et al.J. Isolation and characterization of filamentous fungi from wood and soil samples of “La Lorena”, Sonsón, Antioquia (Colombia), natural reserve. **DYNA**, v. 88, n. 219, p. 171–180, 2021.

NIRMALADEVI, D. et al. Neuroprotective effects of bikaverin on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress mediated neuronal damage in SH-SY5Y cell line. **Journal Cellular and Molecular Neurobiology**, p. 973–985, 2014.

OBUEKWE, C. O.et al. Growth and hydrocarbon degradation by three desert fungi under conditions of simultaneous temperature and salt stress. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 56, n.4, p. 197-205, 2005.

OLIVEIRA, A.C.G. Seleção de fungos filamentosos com atividade amilolítica. **Trabalho de conclusão de curso**. Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual, Paulista Julio de Mesquita Filho, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, 2017.

PALLU, A. P. **Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2010.

PLOETZ, R.; FREEMAN, S. Foliar, floral and soilborne diseases. The Mango, 2nd Edition: **Botany, Production and Uses**, p. 231-302, 2009.

POLIZELI, M. L. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

POLIZELI, M. L. et al. O sistema amilolítico. In.: POLIZELI, M.L. et al. Amilases microbianas. São Paulo: **EDUSP**, Cap. 2, p. 23-45, 2016.

SANTOS, S.F.M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato - RN**. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.

SHAFIQUE, S. et al. Screening of *Aspergillus niger* and *A. flavus* strains for extra cellular alpha-amylase activity. **Pakistan Journal of Botany**, v. 4, p. 897-905, 2009.

SIVANESAN, A. New species of *Bipolaris*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 84, n. 3, p. 403-421, 1985.

SPIER, M.R. **PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS FÚNGICAS  $\alpha$ -AMILASE e AMILOGLUCOSIDASE POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO**. Dissertação de mestrado - Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Paraná, 2005.

VISAGIE, C. M. et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 343-371, 2014.

VISAGIE, C.M.; JACOBS, K. Three new additions to the genus *Talaromyces* isolated from Atlantis sandveld fynbos soils. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 28, n. 1, p. 14-24, 2012.