



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - ESA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS



ATIVIDADE ENZIMÁTICA HIDROLÍTICA DOS FUNGOS AMAZÔNICOS
Pycnoporus sanguineus (L.F.) MURR E *Panus crinitus* (L.ex. FR.)
SINGER.

CYNARA DA CRUZ CARMO

MANAUS

2005

CYNARA DA CRUZ CARMO

ATIVIDADE ENZIMÁTICA HIDROLÍTICA DOS FUNGOS AMAZÔNICOS

Pycnoporus sanguineus (L.F.) MURR E *Panus crinitus* (L.ex. FR.)

SINGER.

**Dissertação apresentada à Coordenação do
Curso de Mestrado em Biotecnologia e
Recursos Regionais da Universidade do
Estado do Amazonas – UEA, como parte dos
requisitos necessários para obtenção do
título de Mestre.**

ORIENTADOR: PROF. DR. ADEMIR CASTRO E SILVA

CO-ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. IVETE ROLAND

MANAUS

2005

CYNARA DA CRUZ CARMO

ATIVIDADE ENZIMÁTICA HIDROLÍTICA DOS FUNGOS AMAZÔNICOS

Pycnoporus sanguineus (L.F.) MURR E *Panus crinitus* (L.ex. FR.)

SINGER.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Uso Sustentável da Biodiversidade

Data da Aprovação: 13.10.2005

Banca Examinadora:

PRESIDENTE: Prof. Dr. Ademir Castro e Silva

MEMBRO 1: Prof^a. Dra. Lúcia Alencar Maia

MEMBRO 2: Prof^a. Dra. Milade Carneiro Cordeiro

CARMO, Cynara da Cruz

“Atividade enzimática hidrolítica dos fungos amazônicos *Pycnoporus sanguineus* (L.F.) Murr e *Panus crinitus* (L.ex. Fr.) Singer”.

Manaus: UEA, 2005

81p.

Dissertação de Mestrado - Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais – Universidade do Estado do Amazonas

1. Enzimas hidrolíticas 2. Xilosidase 3. Glicosidase 4. FPA 5. Fungos basidiomicetos

*Falo assim sem saudade
Falo assim por saber
Se muito vale o já feito
Mais vale o que será
E o que foi feito
É preciso conhecer
Para melhor prosseguir.*

(Milton Nascimento)

**A meu pai, minha eterna fonte de inspiração, dedico.
† *In memória***

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao **Prof. Dr. Ademir Castro e Silva**, pela orientação, apoio, incentivo e dedicação durante todas as etapas de desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu marido **Andrey Azedo** e meu filho **Pedro Luca**, pela compreensão, apoio e paciência durante a minha ausência.

À minha mãe, **Alaíde** e minha irmã **Tarcyara**, pelo incentivo, confiança e orações dedicadas durante não somente o meu curso, mas sim durante toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Estado do Amazonas – UEA pela oportunidade de cursar o mestrado em Biotecnologia, área de grande importância.

À Superintendência da Zona Franca de Manaus – SUFRAMA e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM, pelo apoio financeiro.

À Prof^a. Dra. Ivete Roland pela orientação e apoio no Laboratório de Bioquímica.

Ao técnico de laboratório Emerson (UTAM/UEA), e aos bolsistas Dolores e Frank, pela ajuda, apoio e orientação no uso de reagentes e equipamentos.

Às amigas e colegas de curso Francisca Ferreira e Naimy Castro pelo apoio, união, companheirismo, luta e incentivo durante a fase de dissertação deste trabalho.

Aos meus colegas de curso, em especial para o meu grupo de estudos: Ângela, Júnior, Hyelen e Laura, pela união e incentivo durante todo o curso.

À amiga Yeda Hortêncio, pela ajuda na revisão deste trabalho.

A todos que, de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Estrutura tridimensional da Parede Celular.....	39
Figura 02 – Fórmula Estereoquímica de um fragmento de Celulose.....	41
Figura 03 –Estrutura da Lignina.....	44
Figura 04 – Podridão Branca.....	48
Figura 05 – Podridão Parda.....	49
Figura 06 – Podridão mole.....	49
Figura 07 – Corpo frutífero do fungo <i>P. sanguineus</i>	58
Figura 08 – Crescimento micelial do <i>P. sanguineus</i> em diferentes meios de cultura, pH e temperatura ambiente.....	61
Figura 09 – Corpo frutífero do fungo <i>Panus crinitus</i>	61
Figura 10 - Crescimento do <i>Panus crinitus</i> em diferentes meios, pH e temperatura ambiente.(+/-25°C).....	63
Figura 11 - Crescimento micelial do fungo <i>P. sanguineus</i> em meio Agar-malte, pH 5,2 e diferentes temperaturas.....	64
Figura 12 - Crescimento micelial do fungo <i>Panus crinitus</i> em meio Sabourand, pH 5,6 e diferentes temperaturas.....	65
Figura 13 – Atividade enzimática do <i>P. sanguineus</i> sob condição de agitação e sem acréscimo de fonte de carbono.....	70
Figura 14 - Atividade enzimática do <i>P. sanguineus</i> sob condição de agitação e sem acréscimo de fonte de carbono.....	71
Figura 15 - Atividade enzimático do <i>P. sanguineus</i> sob condição estacionária e em meio de cultura sem glicose (A) e com glicose (B) como fonte de carbono	
Figura 16 - Atividade enzimática do <i>Panus crinitus</i> sob condição de agitação e sem acréscimo de fonte de carbono.....	72
Figura 17 - Atividade enzimática do <i>Panus crinitus</i> sob condição de agitação e sem acréscimo de fonte de carbono.....	74
	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Classificação internacional das enzimas.....	26
Tabela 02 – Distribuição do volume de enzimas por área industrial.....	28
Tabela 03 – Distribuição dos tipos de enzimas alimentícias.....	28
Tabela 04 – Fontes vegetais para produção de enzimas.....	30
Tabela 05 – Tipos de enzimas produzidas por <i>Aspergillus niger</i>	31
Tabela 06 – Fontes enzimáticas para glucose isomerase e α -amilase.....	32
Tabela 07 – Parâmetros descritivos do crescimento micelial do <i>Pycnoporus sanguineus</i> em diferentes pH e meio de cultura extrato de malte	61
Tabela 08 – Análise de Variância (ANOVA) com efeito do pH no crescimento micelial do <i>Pycnoporus sanguineus</i>	62
Tabela 09 – Teste de Tukey com pareamento das médias dos pH testados.	62
Tabela 10 - Parâmetros descritivos do crescimento micelial do <i>Panus crinitus</i> em diferentes pH.....	64
Tabela 11 – Análise de Variância (ANOVA) do efeito do pH no crescimento micelial do <i>Panus crinitus</i>	64
Tabela 12 – Atividade enzimática do fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i> sob condição de agitação e estacionária em meio malte sem acréscimo de glucose como fonte de carbono e temperatura ambiente	69
Tabela 13 - Atividade enzimática do <i>P. sanguineus</i> sob condição estacionária em meio malte com e sem acréscimo de glicose como fonte de carbono.....	69
Tabela 14 – Comparação da atividade enzimática de FPA e endo-glucanase de	

<i>Pycnoporus sanguineus</i> e <i>Trichoderma reesei</i>	70
Tabela 15 - Atividade enzimática dos fungos na condição de crescimento sob agitação e sem a presença de glicose e em temperatura ambiente.....	75
Tabela 16 - Atividade enzimática do <i>Panus crinitus</i> em condição estacionária e presença/ausência de fonte de carbono. Crescimento em temperatura ambiente.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ❖ **μmol** – micromol
- ❖ **CDG 07** – *Panus crinitus*
- ❖ **CMC** – carboxymethyl cellulase
- ❖ **DNS** – 3-5-di-nitro-salicilato
- ❖ **FPA** – Atividade em Papel Filtro
- ❖ **g/L** – grama por litro
- ❖ **mM** – milimol
- ❖ **nm** – nanômetros
- ❖ **P** - padrão
- ❖ **p/v** – por volume
- ❖ **PIC 07** – *Pycnoporus Sanguineus*
- ❖ **pNPG** - p-nitrofenil-β-D-Glicosideo
- ❖ **pNPX** - p-nitrofenil-β-Xilosideo
- ❖ **rpm** – rotações por minuto
- ❖ **UEA** – Universidade do Estado do Amazonas

RESUMO

As enzimas de natureza hidrolíticas como celulases, xilanases e glicosidases e/ou outros agentes não enzimáticos produzidos por fungos que degradam a madeira, apresentam um enorme potencial biotecnológico. Com o intuito de investigar o potencial hidrolítico de dois fungos amazônicos degradadores de madeira, *Pycnoporus sanguineus* (L.:F.) Murr e *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer, foi realizado o estudo sobre a influência do pH, temperatura e meio de cultura no crescimento desses fungos e determinada a atividade enzimática FPA, endo- β -glucanase, β -glicosidase e β -xilosidase, sob a condição estacionária e sob agitação a 180 rpm. Os fungos estudados mostraram preferência por meio ácido (pH ótimo 5,0) e temperatura ótima na faixa de 30-35 °C. Para *P. sanguineus* essas condições ótimas foram obtidas em meio sabouraud acrescido de peptona, enquanto que para *Panus crinitus* foi extrato de malte. O parâmetro temperatura foi o que mais influenciou no crescimento fúngico. A atividade enzimática de ambos os fungos foi maior sob a condição de agitação. Na condição estacionária e sem a presença de glicose no meio de cultura não foi detectada atividade FPA para ambos os fungos e somente para *P. sanguineus* foi detectada atividade endo- β -glucanase. Nesta condição estacionária o acréscimo de glicose ao meio aumentou cerca de 38% a atividade endo- β -glucanase no *P. sanguineus*, mas não contribuiu para aumento dessa enzima no *Panus crinitus*. Para ambos os fungos a atividade de β -xilosidase em condição estacionária e meio de cultura com glicose não foi acompanhada pela atividade endo-glucanase. O estudo revelou que o fungo *Panus crinitus* apresenta uma maior atividade hemicelulolítica, evidenciado pela maior atividade β -xilosidase, enquanto que o *P. sanguineus* maior atividade celulolítica. Faz-se mister, portanto, estudos posteriores para se buscar novos meios de cultura para a obtenção da máxima atividade dessas enzimas de natureza hidrolítica visando viabilizar a purificação para possíveis usos biotecnológicos.

PALAVRAS CHAVE : enzimas hidrolíticas, xilosidase, glicosidase, FPA, fungos basidiomicetos

ABSTRACT

Enzymes of hydrolytic nature such as cellulase, xylanase and glycosidase and/or others agents non-enzymatic produced by wood decay fungi, show a huge biotechnological potential. In order to investigate hydrolytic potential of two amazonian wood decay fungi, *Pycnoporus sanguineus* (L.:F.) Murr and *Panus crinitus* (L. Ex. Fr.) Singer, studies on influence of pH, temperature and medium at growth of fungi as well as determination of enzymatic activity of FPA, β -glucanase and β -xylosidase on stationary and agitation conditions at 180 rpm were done. Fungi studied shown preference by acid conditions (pH optimum 5,0) and temperature optimum between 30-35° C. *P. sanguineus* had these optimum conditions at sabouraud medium supplemented with peptone while *P. crinitus* at malt extract medium. Temperature had more influence on fungal growth. Enzymatic activity were better at agitation conditions. At stationary condition with no glucose in the medium it wasn't detected FPA activity in both fungi and only to *P. sanguineus* the endo- β -glucanase activity was detected. At stationary growth the addition of glucose increase about 38% endo- β -glucanase activity for *P. sanguineus* but it not contributed to increase this activity for *P. crinitus*. For both fungi the β -xylosidase activity at stationary conditions and presence of glucose it wasn't followed by endo-glucanase activity. *P. crinitus* presents a greater hemicelulolytic activity become evident by greater β -xylosidase activity while *P. sanguineus* showed great celulolitic activity. There is need studies to find new medium to maximize hydrolytic enzyme activity to get viable purification to possible biotechnological uses.

KEY WORDS: hydrolytic enzymes, xylosidase, glycosidase, FPA, basidiomycete fungi.

SUMÁRIO

Introdução.....	15
1 Objetivos	20
1.1 Geral	20
1.2 Específicos	20
2 Revisão Bibliográfica	21
2.1 Enzimas	21
2.1.1 A Atividade Enzimática e o pH.....	24
2.1.2 O valor Comercial das enzimas.....	24
2.1.3 Enzimas Celulolíticas	29
2.1.4 Mecanismo de Degradação da Celulose	31
2.2 Material Lignocelulósico: Estrutura e Biodegradação	32
2.2.1 Parede Celular	32
2.2.2 Componentes Químicos da Madeira	34
2.2.2.1 Celulose	34
2.2.2.2 Hemicelulose	35
2.2.2.3 Lignina	36
2.3 Fungos Deterioradores de Madeira.....	39
2.3.1 Tipos de podridão causadas por Fungos.....	40
2.3.2 Fungos Lignocelulolíticos.....	42
3 Material e Métodos	44
3.1 Microrganismos	44
3.2 Meio de Cultura para Otimização	45
3.3 Otimização de pH e Temperatura	47
3.4 Determinação da Atividade Enzimática.....	48
3.4.1 Meio de Cultura	48

3.4.2 Atividade em Papel Filtro (FPA) - Celobiohidrolase	48
3.4.3 Atividade Endo-1,4- β -D-Glucanase (carboxymethyl cellulase ou CMCase).....	49
3.4.4 Atividade β -Xilosidase	49
3.4.5 Atividade da β -Glicosidase	50
3.5 Quantificação do Crescimento Fúngico	52
4 Resultados e Discussão.....	53
4.1 Observações sobre o Crescimento Fúngico	53
4.1.1 <i>Pycnoporus sanguineus</i> (L.:F.) Murr	53
4.1.1.1 Influência do meio e pH no crescimento do <i>P. sanguineus</i> (L.:F.) Murr	54
4.1.2 <i>Panus crinitus</i> (L. ex. Fr.) Singer.....	56
4.1.2.1 Influência do meio e pH no crescimento do <i>Panus crinitus</i> (L. ex. Fr.) Singer.....	57
4.1.3 Influência da Temperatura no crescimento dos fungos	59
4.2 Determinação da Atividade Enzimática	61
4.2.1 Atividade enzimática do <i>Pycnoporus sanguineus</i> (L.:F.) Murr.....	61
4.2.2 Atividade enzimática do <i>Panus crinitus</i> (L. ex. Fr.) Singer.....	67
Conclusão	72
Referências Bibliográficas.....	74

INTRODUÇÃO

A biodiversidade amazônica se conta em termos sempre superlativos em números de plantas, peixes, aves, mamíferos, animais marinhos e insetos, sem contar os microorganismos que são milhões de espécies. Estima-se que apenas 1% desta mega- biodiversidade amazônica tenha sido estudada do ponto de vista químico ou farmacológico. Estudos químicos e farmacológico são a base para a pesquisa e desenvolvimento (P&D) de produtos farmacêuticos. (ALMEIDA, 2001).

Muitos trabalhos científicos nas várias áreas do conhecimento (química, farmacologia, biologia, ecologia, cultivo e medicina), foram publicados nos últimos 10 anos sobre a biodiversidade brasileira, principalmente a Amazônica, Notadamente produzidos pelos órgãos de pesquisas espalhados da região amazônica, como o Museu Paraense Emílio Goeldi, o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e a EMBRAPA (ALMEIDA, 2001).

O mercado mundial dos fitoterápicos é estimado hoje em U\$22 bilhões sendo U\$400 milhões no Brasil. Das plantas da Amazônia, também se produzem fitofármacos, substância medicamentosa extraída dos extratos de plantas (ex: o quinino extraído da quina). O mercado farmacêutico é dinâmico, e mundialmente lança produtos que vendem U\$ 345 bilhões/ano. É um mercado extremamente importante mesmo no Brasil, onde chega a U\$ 10 bilhões. (BARATA, 2000).

Dentre as muitas espécies amazônicas que podem e devem gerar insumos para utilização industrial, encontram-se os fungos. Apesar do seu papel nos ecossistemas e suas aplicações na biotecnologia, o conhecimento sobre os fungos ainda permanece num nível incipiente, onde estima-se que somente cerca de 5% das espécies é conhecida, e que muito pouco é conhecido sobre a sua biologia.

Hawksworth (1991), estimou a magnitude da diversidade fúngica nos ecossistemas mundiais em 1,5 milhões de espécies. Vários estudiosos do assunto ficaram céticos em relação a essa previsão, principalmente pela falta de dados sobre a extensão da descoberta de novos fungos nos trópicos. Neste sentido, May (1991) ponderou que um novo sítio visitado poderia render cerca de 95% de novas espécies para a ciência. Vários outros pesquisadores abordaram o problema sob diferentes aspectos (PASCOE, 1990; SMITH & WALLER, 1992; HAMMOND, 1992; HAMMOND, 1995;) concordando que a estimativa de Hawksworth era um tanto conservativa e que a diversidade de espécies fúngicas na realidade era maior do que o proposto.

Dreyfuss & Chapela (1994), por exemplo, estimaram que cerca de 1,3 milhão de espécies fúngicas endófitas no trópico ainda estão para ser descobertas. Essa estimativa tem sido corroborada por outros autores tendo em vista o número de espécies endofíticas que estão sendo determinadas (ARNOLD *et al.*, 2000; 2001) e que, portanto, somente os fungos endofíticos sugerem que a estimativa de 1,5 milhão subestima a biodiversidade fúngica. Estima-se que mais de 140 diferentes espécies de microfungos podem ser encontrados em pequenas amostras de folhas decompostas num chão de uma floresta tropical.

Dentre essa grande diversidade micológica, encontra-se o grupo dos fungos filamentosos. Alguns têm em comum a habilidade de produzir enzimas extracelulares que oxidam compostos fenólicos relacionados à lignina e são particularmente úteis na bioconversão da madeira, como por exemplo, no pré-tratamento biológico de cavacos de madeira na indústria de papel e celulose, o que permite a economia de energia no processo mecânico e termomecânico de produção de pasta celulósica (CASTRO E

SILVA, 2002d; BOOMINATHAN & REDDY, 1992). Outro aspecto importante dos fungos filamentosos é o seu potencial para a produção de antibióticos, tais como cefalosporina (*Cephalosporium acremonium*), griseofulvina (*Penicillium griseofulvis*) e penicilinas (*Aspergillus nidulans*, *Cephalosporium acremonium* e *Penicillium chrysogenum*), ácidos orgânicos (produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*) e vitaminas (produção de riboflavina por *Ashbya gossypii*). (PUTZKE, 2002).

Como biodegradadores naturais, os fungos encontram as substâncias necessárias para o seu desenvolvimento na natureza, principalmente como macromoléculas insolúveis, as quais precisam degradar primeiramente em unidades monoméricas solúveis antes de as incorporarem. Polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lignina, lipídios e outros compostos de grande peso molecular, ou insolúveis, não podem ser incorporados diretamente, tendo que ser reduzidos. Para conseguir absorver nutrientes os fungos secretam enzimas especiais para o meio exterior, conseguindo reduzir o tamanho das moléculas e atingir a solubilidade.(PUTZKE, 2002 ; VAN DER HEIJDEN *et al*, 1998).

Um dos grandes problemas de todos os tempos tem sido o ataque de fungos à madeira, problema que acompanha o homem desde a utilização dos primeiros artefatos fabricados com esse material, até a atualidade, com a utilização de produtos e subprodutos da madeira. Estes organismos podem ser específicos a determinado tipo de madeira ou resíduo vegetal ou, mesmo, ser de amplo espectro, decompondo madeiras de várias espécies. A madeira é um tecido vegetal, em grande parte, morto, que recebe deposição de celulose e lignina em suas paredes, conferindo-lhe propriedades intrínsecas. A degradação da madeira consiste no rompimento desses componentes da parede celular através de um processo enzimático. Apesar de freqüentemente degradarem a madeira, os fungos apresentam grande versatilidade com relação aos substratos a serem degradados, podendo ser utilizados nas mais diversas áreas de biorremediação, desde que são capazes de degradar hidrocarbonetos aromáticos, compostos bifenílicos, produtos originados em indústria têxtil, papel e celulose. (PUTZKE, 2002; AUST,1990; BARR, 1994).

Linhagens do fungo *Chrysonilia sitophila*, por exemplo, o qual exibe um alto teor de proteína e atividades celulolíticas e ligninolíticas, têm sido testadas em estudos de produção de proteínas a partir de casca de arroz pré-tratadas e celulose pré-tratada fotoquimicamente (DURÁN *et al.*, 1987; DURÁN *et al.*, 1988).

Poucas espécies de fungos filamentosos decompõem celulose em sua forma nativa, altamente cristalina. Esses são os fungos ditos celulolíticos. Muitas espécies decompõem apenas produtos modificados a partir da celulose. A madeira tem proporções de celulose entre 40 e 60% , além de apresentar, também, hemicelulose (10 – 30%) e lignina (10 – 30%), variando esses valores de acordo com a espécie considerada e com a idade do vegetal. As principais enzimas para celulose são endo-1,4- β -glucanases, exo-1,4- β -glucanases e 1,4- β -glucosidases. As hemiceluloses exigem uma maior quantidade de enzimas em função de sua complexidade estrutural, sendo algumas delas, a endo-1,4E-RB-xilanase, 1,4- β -xilosidase, seus equivalentes em manana e em muitas acetil esterases. (PUTZKE, 2002; CASTRO E SILVA, 1996).

Recentemente, uma nova fonte de α -amilase foi identificada em *Pycnoporus sanguineus* (DE ALMEIDA; MIZUTA & GIGLIO, 1997 *apud* PANDEY *et al.*, 2000). Este fungo possui um “pool” enzimático que de acordo com Castro e Silva *et al.*, (1993), que estudaram uma cepa amazônica deste fungo, passa pela produção em meio “agar-malte” de lignina-peroxidase, peroxidase, lacase- Mn-peroxidases, β -glicosidase, celulase e xilanase.

Conforme pudemos observar nas colocações anteriores o potencial enzimático de microrganismos, principalmente fúngico, é grande e de alcance mundial e a Amazônia poderá aumentar sua participação nesse mercado promissor. Não resta dúvida que a nossa biodiversidade micológica é ainda um tanto desconhecida na sua totalidade, e também tem potencial para inserir a Amazônia no contexto mundial de produção de enzimas para diversas aplicações industriais.

Portanto, a utilização industrial de enzimas produzidas por esses fungos vislumbra a quebra de paradigmas que levavam a olhá-los apenas como agentes maléficos, iniciando uma era de aproveitamento do nosso potencial micológico para abertura de pequenas empresas biotecnológicas visando a produção dessas enzimas.

O estudo das enzimas também tem imensa importância prática. Em algumas doenças, especialmente nas desordens genéticas herdadas, pode ocorrer, nos tecidos, a deficiência, ou mesmo a ausência total, de uma ou mais enzimas. Condições anormais também podem ser causadas pelo excesso de atividade de certas enzimas no plasma sanguíneo, eritrócitos ou amostras de tecido são importantes no diagnóstico de várias doenças. (LEHNINGER, 1995; CARVALHO, 1997).

O mercado mundial de enzimas movimentava milhões de dólares anualmente, e a participação do Brasil é ínfima. A Amazônia, apesar de sua biodiversidade fúngica, não apresenta nenhuma participação nesse mercado em função dos poucos estudos até então desenvolvidos, que forneçam subsídios para o conhecimento desse potencial, atualmente, à medida que olhamos o ambiente como um todo, temos a necessidade de compreender detalhe do funcionamento do “bio” componente, o que por sua vez, tem possibilitado o desenvolvimento de novas atividades industriais, referidas como biotecnologias ambientais (VANDEVIVERE & VERSTRAETE, 2001). Uma das principais aplicações industriais é na produção do álcool etílico (fermentação) e também na fabricação de produtos como o pão, queijos, cerveja, vinho, etc. (CARVALHO, 1997; PUTZKE, 2002).

Portanto, o presente trabalho objetiva estudar a atividade de enzimas hidrolíticas de dois fungos amazônicos deterioradores de madeira, *O Pycnoporus sanguineus* e o *Panus crinitus* e os resultados oriundos deste trabalho se revestem de grande importância para o estado incipiente da biotecnologia no Estado do Amazonas, uma vez que se volta a aplicação industrial de fungos que notadamente são reconhecidos apenas como deterioradores de madeira, com pouco conhecimento sobre o seu grande potencial biotecnológico.

1. OBJETIVOS

1. GERAL

Estudar a atividade enzimática hidrolítica dos fungos *Pycnoporus sanguineus* (L.F.) Murr e *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer.

2. ESPECÍFICOS

- Determinar a produção das enzimas Cellobiohydrolase, Endo-1,4- β -D-Glucanase, β -Xilosidase e β -Glicosidase dos fungos testados.
- Verificar a influência da glicose como fonte de carbono na atividade enzimática dos fungos.
- Verificar a influência das condições de crescimento (agitação e estacionária) na atividade enzimática dos fungos.
- Estudar os parâmetros que otimizam as condições de crescimento dos fungos testados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas

Segundo Lehninger (1995), a catálise enzimática das reações é essencial para os sistemas vivos. Sob condições biológicas relevantes, as reações não catalisadas tendem a ser lentas.

A maioria das moléculas biológicas é muito estável no ambiente aquoso de pH neutro e temperatura moderada encontrado no interior das células. As reações necessárias para digerir os alimentos, enviar sinais através dos nervos, ou contrair um músculo simplesmente não ocorrem em velocidade útil sem catálise. Uma enzima contorna estes problemas fornecendo um ambiente específico dentro do qual uma reação dada é energeticamente mais favorável e através de seqüências organizadas, catalisam as centenas de reações graduais e sucessivas que ocorrem nas vias metabólicas, através das quais as moléculas nutrientes são degradadas, a energia química conservada é transformada e as macromoléculas biológicas sintetizadas a partir de precursores simples. (LAGUNA, 1969; RODWEL. et alli, 1985; LEHNINGER, 1995).

A característica distintiva de uma reação catalisada enzimaticamente é que ela ocorre no interior dos limites de uma cavidade, ou fenda, na estrutura molecular da enzima chamada **sítio ativo**. A molécula que se liga ao sítio ativo e que sofre a ação da enzima é chamada de **substrato**. O complexo enzima-substrato tem papel central na reação enzimática, ele é o ponto de partida para os tratamentos matemáticos que

definem o comportamento cinético das reações catalisadas enzimaticamente e para as descrições teóricas dos mecanismos enzimáticos. (LAGUNA, 1969; LEHNINGER, 1995).

As enzimas, enquanto catalisadores, providenciam percursos reacionais alternativos, de menor carga de ativação, que incluem a formação de espécies intermediárias de relativa estabilidade, distintas dos estados de transição. De modo geral, o mecanismo da catálise enzimática, na sua expressão mais simples, compreende a formação de um complexo enzima-substrato, ES, altamente específico. A especificidade enzimática levou Fisher, (1894) a enunciar o princípio segundo o qual a enzima está para o substrato, como a chave está para a fechadura.



Onde **E** representa a enzima, **S**, o substrato e **P** o produto da reação.

Segundo este princípio, as moléculas do substrato fixam-se em locais específicos do componente protéico da enzima, os centros ativos, os quais compreendem regiões responsáveis pela ligação ao substrato, sítio de fixação, e regiões que catalisam a reação. Somente um pequeno número de aminoácidos constitui o centro ativo.

No modelo "chave e fechadura" de Fisher, a molécula enzimática seria estática. Comprovou-se, posteriormente, que a função enzimática tira proveito, na maioria dos casos, das propriedades de flexibilidade da estrutura protéica. Tal comprovação levou Koshland (em 1958) a propor um modelo de "encaixe por indução", onde a ligação do substrato induz uma mudança conformacional na enzima que resulta em um encaixe dos aminoácidos no sítio ativo de forma complementar para interagir com os grupos funcionais do substrato (LAGUNA, 1969).

Outro modelo desenvolvido com o objetivo de entender o processo de catálise enzimática foi a teoria dos três pontos sugerida por Ogston, que é amplamente usada

para explicar a enantiosseletividade das enzimas. Para obter um alto grau de enantiosseletividade, um substrato deveria ser firmemente no espaço de 3 dimensões. Entretanto, eles deveriam ter pelo menos três pontos diferentes de ataque do substrato no sítio ativo (LAGUNA, 1969; RODWEL. et alli, 1985; FABER, 1995; LEHNINGER, 1995).

As enzimas foram então classificadas de acordo com o tipo de reação catalisada. (Tabela 01). A maioria das enzimas catalisa a transferência de elétrons, átomos ou grupos funcionais. Assim, elas são classificadas, recebem nomes e números de código de acordo com a reação de transferência, o grupo doador e o grupo receptor. (LEHNINGER, 1995).

TABELA 01 – CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL DAS ENZIMAS

Nº.	Classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons hidretos ou átomos H).
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise
4	Liasas	Adição de grupos em ligações duplas ou formação de ligações duplas pela remoção de grupos
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N pelo acoplamento da clivagem do ATP com as reações de condensação.

2.1.1- A Atividade Enzimática e o pH

As enzimas têm um pH ótimo ou uma região de pH ótimo no qual sua atividade é máxima; em valores de pH maiores ou menores sua atividade diminui. Tal fato ocorre porque as cadeias laterais de alguns aminoácidos agem como ácidos ou bases fracos e realizam funções críticas no sítio ativo da enzima. Embora a mudança no estado de ionização dos grupos no sítio ativo seja uma das razões para a variação na atividade, ela não é a única. O grupo que está sendo titulado pode, por sua vez, afetar alguns aspectos críticos da estrutura protéica, através da remoção de um próton de um resíduo de histidina fora do sítio ativo, assim como pode eliminar uma interação iônica essencial para a estabilidade da conformação ativa da enzima. Menos comum são os casos nos quais os grupos que são titulados estão no substrato. A região de pH na qual ocorre a mudança de atividade pode fornecer uma pista para sabermos qual aminoácido está envolvido. Uma mudança na atividade enzimática que ocorre em pH próximo de 7, por exemplo, em geral reflete a titulação de um resíduo de histidina. Lehninger (1995) e Kirk (1987), ressaltam, entretanto, que os efeitos do pH precisam ser interpretados com um pouco de cautela.

As enzimas caracterizam-se por apresentarem em suas estruturas uma proteína (substância orgânica que contém nitrogênio em sua molécula) e que por decomposição hidrolítica ou adição de água, produz em aminoácidos. A intensidade da ação enzimática duplica ou triplica a cada 10°C e o ponto ótimo da ação, ou seja, sua velocidade, depende do pH do meio (LAGUNA, 1969; KIRK,1987; CASTRO E SILVA, 2000).

2.1.2 O Valor Comercial das Enzimas

Nos últimos sete anos novas companhias têm surgido com novas tecnologias para isolamento e produção de enzimas. Aproximadamente 75% das enzimas industriais são usadas para hidrólise e despolimerização de substâncias naturais

complexas com a protease dominando o mercado devido seu uso nas indústrias de detergente e laticínios (LOWE,2001; GATTI, 1997). A maior aplicação ocorrendo na categoria alimentos (Tabela 02).

TABELA 02 - DISTRIBUIÇÃO DO VOLUME DE ENZIMAS POR ÁREA INDUSTRIAL.

ÁREA INDUSTRIAL	DISTRIBUIÇÃO
Coalho	25%
Detergentes	34%
Têxtil	11%
Couro	3%
Polpa/papel	1%
Outras	6%

Fonte: (GODFREY E WEST, 1996).

As aplicações na área de alimentos incluem conversões de amido em glucose e frutose, queijo, vinho, cerveja, pão, aromatizantes, sucos de frutas e alimentação animal (Tabela 03).

TABELA 03 - DISTRIBUIÇÃO DOS TIPOS DE ENZIMAS ALIMENTÍCIAS.

ENZIMAS	DISTRIBUIÇÃO
Glucoamilase	20%
Alfa-amilase	16%
Glucose isomerase	15%
Papaína	3%
Tripsina	3%
Outras proteases	2%
Fitase	2%
Pectinase	2%
Outras	12%

Valor total = US\$ 1,5 bilhão

Fonte: (GODFREY E WEST, 1996).

A produção de enzimas sofreu grande expansão desde os anos 60 devido ao desenvolvimento da tecnologia de fermentação e mais recentemente pela introdução da engenharia genética. Microrganismos recombinantes estão agora se tornando a principal fonte para uma ampla variedade de tipos de enzimas. Não resta dúvida que a tendência no futuro é aumentar, principalmente, pela facilidade da manipulação genética e a descoberta de uma variedade de enzimas disponíveis de microrganismos encontrados em ambientes adversos. Muitas enzimas animais têm sido encontradas e desenvolvidas para substituir muitas outras enzimas existentes de origem animal e vegetal (CARVALHO, 1997). No que diz respeito às enzimas animais, ainda nos dias atuais, tecidos e órgãos de animais são excelentes fontes de lipases, esterases e proteases, as mais notáveis sendo pepsina, tripsina e quimosina. Ovos de galinha continuam sendo uma boa fonte para lisozima. Plantas cultivadas servem como fontes de proteases, como por exemplo a papaína do mamão, a bromelina do abacaxi e a ficina do *Ficus*. A Tabela 04 mostra outras fontes vegetais produtoras de enzimas com aplicação na indústria e pesquisa. (RODWEL, et alli 1985; TANAKA *et al.*, 1993).

TABELA 04 - FONTES VEGETAIS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS.

Fonte	Enzima	Aplicação
<i>Canavalia ensiformes</i>	Urease	Diagnóstico
<i>Carica papaya</i>	Papaína	Panificação, alimentos, tanino, amolecimento de carne, escurecimento de cerveja
<i>Ficus carica</i>	Ficina	Amolecimento de carne
<i>Ananas comosus</i>	Bromelina	Panificação (redução/glúten)
<i>Armoracia rusticana</i>	Peroxidase	Diagnostico
<i>Amygdalus communis</i>	β -glucosidase	Pesquisa
<i>Triticum aestivum</i>	Esterase	Hidrólise e síntese do éster
<i>Hordeum vulgare</i>	β -amilase	Panificação, xarope/maltose
<i>Glycine max</i>	β -amilase	Panificação, xarope/maltose

Fonte: TANAKA *et al.*, (1993).

Por outro lado, microrganismos são as fontes mais convenientes de enzimas. O número e a diversidade de enzimas é proporcional ao número e diversidade de microrganismos (LOWE, 1992). Microrganismos têm sido coletados de ambientes extremamente hostis como ártico, fontes termais, floresta tropical e desertos. O espectro de atividades enzimáticas é grande. Técnicas de engenharia genética tem contribuído com a indústria de enzimas aumentando a produtividade de fermentação enzimática. Mesmo as propriedades dessas enzimas podem ser alteradas e melhoradas pela engenharia da proteína (ARCHER *et al.*, 2001).

Inúmeras linhagens de *Aspergillus* são produtoras de vários tipo de enzimas. *Aspergillus niger*, por exemplo, é conhecida por produzir cerca de 40 diferentes enzimas comerciais. Na Tabela 05 são mostradas as mais comuns dessas enzimas.

TABELA 05 - TIPOS DE ENZIMAS PRODUZIDAS POR *Aspergillus niger*

ENZIMAS	
Lipase	Pectina estrase
Amiglucoxidase	Celulase
Pentonase	Catalase
Protease	α - galactosidase
α -amilase	Inulíase
Fosfolipase	β -glucanase
Glucoxidase	Galactomanase
Pectinase	Arabinase

Fonte: TANAKA *et al.*, (1993).

Enzimas similares podem ser produzidas por diferentes microrganismos. Na Tabela 06, por exemplo, são mostradas oito diferentes fontes para glucose isomerase e nove para α -amilase.

TABELA 06 - FONTES ENZIMÁTICAS PARA GLUCOSE ISOMERASE E α -AMILASE.

α -amilase	Glucose isomerase
<i>Cereal maltado</i>	<i>Actinoplanes missouriensis</i>
Pancreas de animal	<i>Bacillus coagulans</i>
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Mycobacterium arborescens</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Streptomyces murins</i>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Streptomyces olivochromogens</i>
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Streptomyces phoenics</i>
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Streptomyces olivaceous</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Endomyces spp</i>
<i>Rhizopus oryzea</i>	

Fonte : GODFREY E WEST, (1996)

Vários tipos de enzimas hemicelulases, por exemplo, em conjunto com pectinases e celulases podem ser utilizadas na indústria alimentícia para clarificação de sucos e vinhos (LINKO *et al.*, 1989; WONG & SADDLER, 1993; GATTI, 1997).

Com o desenvolvimento da biotecnologia o espectro de uso da amilase tem se expandido para o campo clínico, medicinal e da química analítica (PANDEY *et al.*, 2000). A estrutura molecular das amilases produzidas por fungos é uma glicoproteína contendo resíduos de manose. São menos estáveis ao calor do que as amilases bacterianas e são inativadas antes que a temperatura de gelatinização do amido seja alcançada, geralmente em torno de 68-70 °C (UHLIG, 1998; CARVALHO, 1997).

A β -amilase (α -1,4-glico-maltohidrolase, EC 3.2.1.2) é geralmente de origem vegetal, mas existem alguns microrganismos que podem produzi-la. α -Amilase (endo 1,4- α -D- glico-glicohidrolase, E.C. 3.2.1.1), por outro lado, pode ser derivada de várias bactérias, leveduras e fungos. As α -amilases termostáveis são, geralmente as preferidas uma vez que sua aplicação minimiza o risco de contaminação e reduzem o tempo de reação, proporcionando uma considerável economia de energia. A hidrólise em alta temperatura minimiza a polimerização da D-glucose em iso-maltose (PANDEY

et al., 2000). A produção da enzima endo β -1,4 xilanase também tem um papel importante nas indústrias de papel e celulose, uma vez que o seu uso reduz a utilização de substâncias organocloradas na etapa de biobranqueamento das polpas kraft. A ruptura de ligações de hemicelulose faz com que a polpa apresente uma estrutura mais flexível, facilitando a remoção da lignina e contribuindo, por conseguinte, com a redução do consumo de cloro nos vários estágios de branqueamento (VIKARI *et al.*, 1990; CARVALHO, 1997).

Em síntese, as enzimas podem ser úteis na nutrição animal para se preservar forragem, para hidrolizar substâncias anti-nutritivas e como aditivo alimentício – para suportar o processo digestivo- da mesma maneira que ajuda o processo digestivo em humanos.

2.1.3 - Enzimas Celulolíticas

Eriksson & Hamp (1978) *apud* Castro e Silva (1996), utilizando o fungo *Phanerochete chrysosporium* mostram que o sistema enzimático responsável pela degradação hidrolítica da celulose é uma combinação das enzimas endo e exo- β -1,4-glucanase com a participação de enzimas oxidativas. Apenas alguns fungos são conhecidos como celulolíticos verdadeiros, isto é, que possuem a capacidade de degradar a celulose natural. Algodão, Avicel e papel de filtro (Whatman nº1) são citados na literatura tanto como substrato para as exoglicanases como para medir a atividade do complexo celulolítico total. As exo- β -1,4-glucanases são também conhecidas como avicelases, celulases C1 ou exocelulases. Essas enzimas atuam sobre a celulose cristalina solubilizando-a (celulose suscetível) através da remoção de unidades celobioses da cadeia, mecanismo este conhecido como exo-eliminação (OLIVEIRA, *et al* 2003; MANDELS, 1975; ROBSON & CHAMBLISS, 1989).

Recentemente, Reis *et. al.* (2001) demonstraram que algumas enzimas, entre elas a celulases, reúnem propriedades que indicam seu potencial de uso na

alimentação animal. Eles avaliaram as propriedades bioquímicas de quatro celulases recombinantes provenientes das bactérias *Clostridium thermocellum* e *Cellvibrio mixtus* com vistas a sua futura utilização em processos biotecnológicos e concluíram que apresentam perfil de atividade que indicam seu potencial de uso na suplementação de dietas para frangos.

As enzimas celulolíticas, responsáveis pela hidrólise da celulose, constituem o segundo grande grupo de carboidrases exploradas comercialmente. Celulose é a substância orgânica renovável mais abundante na natureza. É um polímero natural composto de unidades de β -D-glicose, biossintetizado principalmente pelas células vegetais para constituição da parede celular.(ESPOSITO & AZEVEDO, 2004).

Dentre várias aplicações de celulases, pode ser destacada sua utilização na indústria de detergentes e na têxtil como agente de *peeling* da superfície das fibras de tecidos; na indústria de polpa de celulose e de papel, para melhorar as propriedades mecânicas das fibras ou ainda para facilitar o processo de reciclagem; em processos de hidrólise de biomassa para produção de reagentes químicos combustíveis e em silagem, entre outros. (LYND *et al*, 1999; RAMOS *et al*, 1999).

As celulases fúngicas têm sido as mais estudadas e exploradas industrialmente e, apesar de grande parte dos trabalhos estar voltada para a obtenção de enzimas de *Trichoderma reesi*, muitas outras espécies têm apresentado um bom potencial para produção de enzimas celulolíticas. (ESPÓSITO & AZEVEDO, 2004). Dentre os organismos vivos, os fungos são particularmente ativos como decompositores da celulose e podem ser responsáveis por cerca de 80% da quebra de celulose (WOOD, 1985; GATTI, 1997;).

2.1.4 - Mecanismo de degradação da Celulose

Os fungos tomam parte ativa na decomposição da celulose, hemicelulose, amido, assim como substâncias resistentes como as gomas vegetais, parafinas e lignina são atacadas por estes microrganismos. (SILVEIRA, 1981; ESPÓSITO & AZEVEDO, 2004).

A celulose pode ser hidrolisada com ácidos a seus monossacarídeos, porém este processo produz materiais tóxicos, com associados problemas de desperdício. Ao contrário, a degradação microbiana de celulose é completa e específica, embora cara. Entretanto, o potencial para converter resíduos celulósicos em substratos industriais tem estimulado interesse em fermentações celulolíticas (WEIGEL, 1982; OLIVEIRA, et al, 2003).

De acordo com Thiemann e colaboradores (1980), a hidrólise da celulose por celulasas, sendo específica, só resulta na produção final de glicose. Por se tratar de proteínas, as celulasas não conseguem penetrar com facilidade a barreira da lignina. Então o problema básico da hidrólise enzimática de materiais celulósicos é o difícil acesso das enzimas às fibras de celulose.

A completa degradação enzimática da celulose depende da ação conjunta de várias enzimas. Esse complexo celulolítico é, geralmente, formado pelas seguintes hidrolases: (ESPÓSITO & AZEVEDO, 2004).

- Endo-1,4- β -D-glicana glicanahidrolase (EC 3.2.1.4), endoglicanase ou carboximetil celulase. Responsável pela endoidrólise randômica das ligações glicosídicas β -1,4 da celulose.
- Glicana-1,4- β -glicohidrolase (EC 3.2.1.74) ou exo- β -glicosidase. Responsável pela remoção sucessiva de unidades de D-glicose em 1,4- β -D glicanas.

- β -D-glicosídeo glicohidrolase (EC 3.2.1.21) ou β -glicosidase. Responsável pela hidrólise de resíduos terminais de β -D-glicose em oligossacarídeos.
- 4- β -celobiohidrolase (EC 3.2.1.91) ou exo-glicanase. Responsável pela hidrólise de ligações glicosídicas β -1,4 da celulose e de celutetraoses com liberação de celobiose.

2.2 – Material Lignocelulósico: Estrutura e Biodegradação

A madeira caracteriza-se por seu alto teor de material lignocelulósico e por seu baixo teor de nitrogênio. Apesar desses fatores terem um efeito negativo tanto no crescimento como na atividade de degradação dos microrganismos existe um grande número destes que são capazes de decompor a madeira sob condições externas favoráveis devido ao complexo enzimático capaz de degradar os compostos químicos presentes nas células, tais como a celulose, lignina e hemicelulose.(LEPAGE, 1986).

2.2.1 Parede Celular

A parede celular de uma célula vegetal é formada por camadas individuais dispostas segundo um arranjo concêntrico. A estrutura típica de uma parede celular consiste de uma parede primária e uma parede secundária, apresentando uma camada de ligação entre as células chamada de lamela média. A lamela média é freqüentemente comparada com o cimento que liga tijolos de uma estrutura. É altamente lignificada, apresentando substâncias pécticas, principalmente no estágio inicial de formação. Sua espessura, com exceção dos cantos da célula é de 0,2 – 1,0 μm (SARKANEN, 1971; LEPAGE, 1986; CASTRO E SILVA, 1996).

A parede primária é uma camada fina, mais exterior, a qual é formada durante o desenvolvimento inicial da célula, com espessura estimada em 0,1 μm e constituída de

9% celulose incrustada numa matriz plástica-amorfa de hemicelulose, pectina e lignina, e cerca de 70% ou mais de água (PRESTON, 1974). Apresenta uma disposição simples, contrariamente à parede secundária que possui 3 camadas mais ou menos distintas: camadas S_1 , S_2 e S_3 (Figura 01). A camada S_1 é relativamente fina, cerca de $0,1 - 0,3 \mu\text{m}$. A camada S_2 é a mais espessa, com cerca de $2-5 \mu\text{m}$ e a camada S_3 é a mais exterior, tem $0,1 \mu\text{m}$ de espessura. (PANSHIN & DE ZEEUW, 1980; CASTRO E SILVA, 1996).

O arranjo das microfibrilas celulósicas que compõem a parede celular varia nas diferentes camadas. Na camada S_1 varia de $50 - 70^\circ$ em relação ao eixo longitudinal da célula; na camada S_2 o ângulo que as microfibrilas celulósicas fazem com o eixo da célula é menor variando de $10 - 30^\circ$ e tem uma relação inversa com o comprimento da fibra; na camada S_3 varia de $50 - 90^\circ$ (PANSHIN & DE ZEEUW, 1980; CASTRO E SILVA, 2002c).

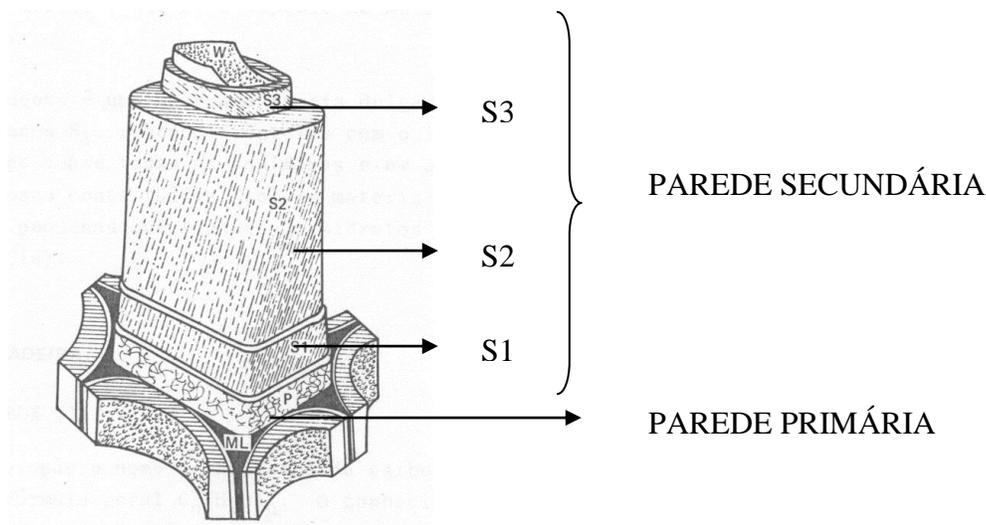


Figura 01 – Esquema tridimensional de uma parede celular mostrando a parede primária e as camadas que compõem a parede secundária (Adaptado de COTE, 1967).

2.2.2 Componentes Químicos da Madeira

2.2.2.1 Celulose

De forma simplificada pode-se dizer que a celulose forma um esqueleto imerso numa matriz de hemicelulose e lignina que é o material aglutinante. O comprimento mínimo de uma molécula de celulose nativa é de 5.000 nm, correspondente a uma cadeia com cerca de 10.000 unidades glicosídicas. As hemiceluloses são consideradas amorfas, embora sejam aparentemente orientadas na mesma direção das microfibrilas de celulose (LEPAGE, 1986).

Em 1970, Wenzel *apud* Payen (1838), reconheceu a celulose como sendo o principal componente químico da parede celular, sendo um polímero linear (parte amorfa e parte cristalina) com uma fórmula mínima de $C_6 H_{10} O_5$ e massa molecular 162. É um polímero homogêneo, não ramificado, cuja cadeia polimérica é constituída de centenas de unidades monossacarídicas, de apenas um tipo, D-glicose, ligadas covalentemente por ligações β - 1,4 glicosídicas (Figura 02). É uma substância microfibrilar, composta por moléculas de β - 1,4 – glucano, apresentando um complexo enzimático de celulase que constitui um dos mais importantes grupos de exoenzimas fúngicas. Este complexo é composto por celobiohidrolases que agem sobre a região cristalina e sobre a amorfa, e por endoglucanases, que agem somente sobre a região amorfa. As regiões cristalinas são muito menores do que as moléculas de celulose significando que uma molécula individual de celulose está incluída em 10 ou mais regiões desse tipo. Cerca as 60 – 70% da celulose na parede secundária está na forma cristalina. Entre as características das celulases podem ser citadas três que correspondem às características gerais das exoenzimas fúngicas: têm formas múltiplas, são glicoproteínas e são muito resistentes à desnaturação. O resultado final é a complexa digestão da celulose, formando glicoses. (PUTZKE,2002; FERRER, *et al* 1991; D'ALMEIDA, 1982; KOLLMAN & COTE, 1968).

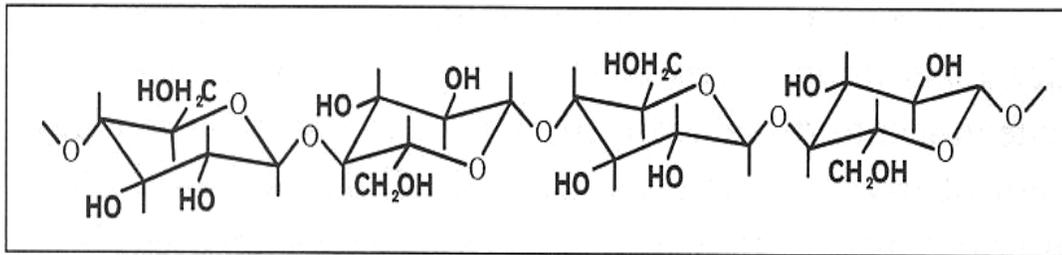


Figura 02 – Fórmula estereoquímica de um fragmento de celulose (FENGEL,1984).

Na natureza a celulose não é encontrada na sua forma pura, ou seja, está sempre associada com hemicelulose, lignina e polissacarídeos, como pectina e amido (ILMÉN et al., 1997; FENGEL,1984). É o recurso natural renovável mais abundante, disponível ao homem. Cerca de 40% de toda biomassa (matéria orgânica) está associada nas plantas superiores, o que significa uma produção anual média de resíduos celulósicos de 4×10^{10} toneladas (ROBSON & CHAMBLISS, 1989).

2.2.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose contém em sua arquitetura molecular diferentes polissacarídeos e vários tipos de resíduos de açúcares como o D-xilose, D-glucose, D-galactose, D-manose, L-arabinose e o ácido 4-O-metil-D-glucorônico, associados com a celulose e a lignina em tecidos vegetais. (TIMELL, 1964; WHISTLER & RICHARDS, 1970; PETTERSEN, 1984; SIAU, 1984).

A glicouranoxilana é o componente hemicelulósico majoritário das folhosas, que freqüentemente são, também denominadas xilanas e cujo teor, dependendo da espécie considerada, varia de 15 – 30% de sua massa seca. Por não possuir regiões cristalinas, as hemiceluloses são atingidas mais facilmente pelos produtos químicos. Entretanto, devido à perda de alguns constituintes da cadeia, as hemiceluloses podem sofrer cristalização induzida pela formação de pontes de hidrogênio, a partir de hidroxilas de

cadeias adjacentes, dificultando, desta forma, a atuação de um produto químico com o qual esteja em contato. Muitas enzimas diferentes são requeridas para degradar hemicelulose, enumerando-se a arabinosidase, galactanase, glucuronidase, acetil-esterase e xilanase. (PUTZKE, 2002; SIAU, 1984; SJÖSTROM, 1981).

2.2.2.3 Lignina

É um dos mais abundantes produtos naturais do tecido xilemático, representando cerca de 20 – 30% do total da madeira, sendo um polímero polifenólico tridimensional composto de unidades de fenilpropano. A lignina também é amorfa, além de ser isotrópica. A estrutura pode ser decomposta de várias maneiras por diferentes organismos, sua baixa higroscopicidade e sua presença na parede celular influenciam no comportamento da madeira. (SARKANEN & LUDWING, 1971 *apud* CASTRO E SILVA, 1996; KIRK & CHANG, 1981). É uma substância cuja molécula é extremamente complexa, polimérica, heterogênea, formada a partir de três tipos diferentes de unidades monoméricas, derivadas de 4-hidroxiarilpropenil álcoois, sendo eles; álcool trans-para-cumário, álcool trans-sinápílico e álcool trans-coniferílico (figura 03). Na molécula de lignina, tais unidades são distribuídas ao acaso e ligadas covalentemente por pelo menos dez tipos de ligações químicas diferentes. Os grupamentos funcionais que, portanto, definem as características estruturais e químicos de lignina são os grupos hidroxílicos de álcoois primários e secundários, hidroxílicos de fenóis, esterificados e livres, grupos carbonílicos de diferentes tipos, metoxilas ligadas à anéis aromáticos e insaturações. (ADLER, 1977; D'ALMEIDA, 1982; FENGEL, 1989; HIGUCHI, 1990).

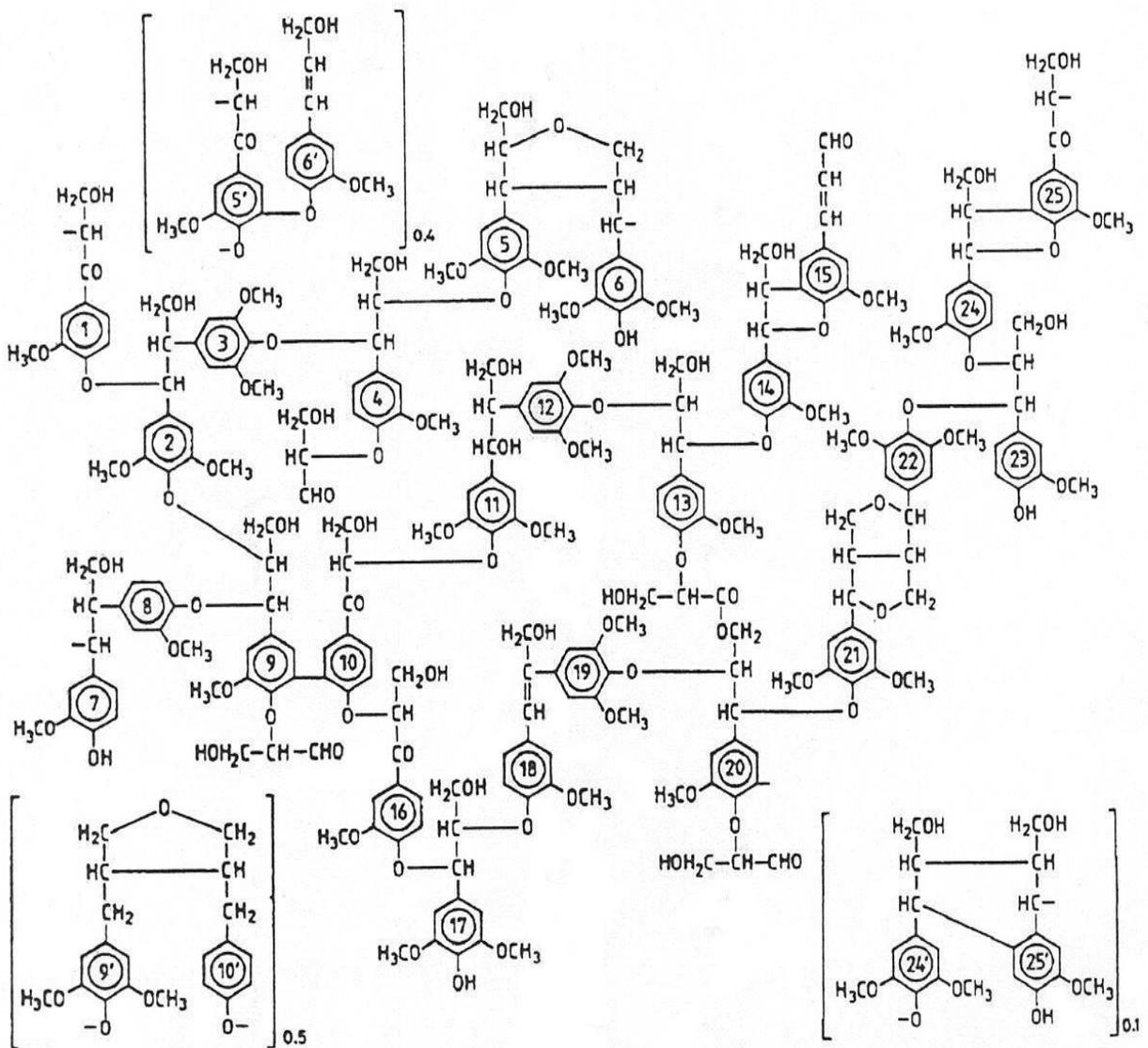


Figura 03 – Estrutura da lignina de uma folhosa proposta por Nimz (1974).

Os fungos ligninolíticos são conhecidos como degradadores de lignina em CO₂, apesar de algumas bactérias conseguirem cifras de até 20% de degradação. O processo de degradação da lignina pelos fungos ocorre como um ataque oxidativo e não hidrolítico, sem liberação de unidades monoméricas no meio e sem representar uma fonte primária de carbono e de energia para o crescimento do fungo, apesar de ela ser potencialmente capaz de prover energia para o crescimento. A degradação da lignina é realizada para facilitar o acesso do fungo aos demais polissacarídeos existentes na madeira e encobertos pela molécula de lignina. Fungos ligninolíticos não conseguem crescer em meio contendo somente lignina como fonte de carbono, e a adição de lignina a algumas culturas, com fonte de carbono limitada, não representou um ganho em peso seco, de acordo com Kirk *et al* (1975), em algumas espécies testadas. A degradação da lignina é um processo lento, e o conhecimento dessa esbarra na dificuldade de obter-se a substância pura. Os especialistas em decomposição da madeira têm distinguido três tipos principais de formas de degradação, nomeando-as de podridão branca, podridão marrom e podridão mole (ERICKSON, 1985; DURAN *et al.*, 1990; WAINWRIGHT, 1990; CASTRO E SILVA, 2001).

Os fungos degradam a lignina através de um processo denominado “cometabolismo da lignina”, visto que necessitam de uma fonte primária de energia para que isso ocorra. Muitas são as exoenzimas envolvidas no processo, incluindo a lignina-peroxidase, peroxidase manganês-dependente (ligninase) e lacase; para as duas primeiras existem, pelo menos, 10 isoenzimas. A ação conjunta de todas essas enzimas garante a despolimerização exocelular da lignina, tendo sido descrita para *Phanerochaete chrysosporium* por Kirk & Farrel (1987) e por Buswell (1991).

2.3 – Fungos Deterioradores de Madeira

A madeira é degradada biologicamente porque os organismos reconhecem os polímeros naturais da parede celular como fonte de nutrição, e alguns destes possuem sistemas enzimáticos específicos capazes de metabolizá-los em unidades digeríveis (BLANCHETTE, 1980; OLIVEIRA et al, 1986; CASTRO E SILVA, 1996).

Entre os organismos vivos, os que apresentam um grande potencial enzimático são os fungos. Dentre estes, temos os fungos *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes sp.* que causam grandes perdas de material estrutural devido seu ataque aos componentes químicos da madeira (KIRK & CHANG, 1981; CASTRO E SILVA, 1993; CASTRO E SILVA & AGUIAR, 2001b; OLIVEIRA et al., 1986).

Os fungos estão amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados na água, no ar atmosférico, no solo, sobre os animais e vegetais vivos parasitando-os, na matéria orgânica em decomposição, nos produtos alimentícios e produtos industriais. Eles necessitam, para se alimentarem, de substâncias orgânicas (hidratos de carbono) as quais são incapazes de elaborar, devido à falta de clorofila, pois, esta substância é que torna possível à planta assimilar o anidrido carbônico do ar atmosférico, o qual facilita a síntese dos hidratos de carbono. Eles não têm celulose na sua parede celular, exceto alguns aquáticos e não armazenam amido como substância de reserva. A presença de substâncias quitinosas na parede da maior parte das espécies fúngicas e a sua capacidade de depositar glicogênio os assemelham às células animais (ERIKSSON, 1985; TRABULSI, 1998 ; SILVEIRA, 1981).

Todos os fungos conhecidos, com poucas exceções, têm origem dos esporos, corpúsculos que podem ser comparados às sementes das plantas superiores. Os esporos germinam dando origem a filamentos finos chamados tubos germinativos, que ao ramificarem formam uma massa filamentosa conhecida como micélio, que constitui o corpo vegetativo dos fungos. Os filamentos simples ou ramificados que formam o

micélio denominam-se hifas, que podem ser septadas ou contínuas. (SILVEIRA 1981; GATTI, 1997; TRABULSI, 1998).

Basicamente os fungos são classificados com base na forma do corpo frutífero e nas estruturas sob as quais os esporos são formados (estágio sexual). Os fungos deterioradores da madeira estão classificados na classe dos Basidiomicetos, principalmente nas ordens Polyporales e Agaricales (SILVEIRA, 1981; PUTZKE, 2002)

Para a degradação dos componentes da parede celular esses fungos degradadores de madeira utilizam-se de enzimas que podem apresentar potencial para uso industrial. Cada componente químico pode ser metabolizado por diferentes enzimas, daí que, podemos classificar a podridão da madeira em função do tipo de componente químico que é atacado (CASTRO E SILVA, 1996).

2.3.1 – Tipos de Podridão Causadas por Fungos

Os tipos de fungos que deterioram a madeira e/ou tipo de podridão podem ser divididos em três classes baseado no tipo de deterioração que eles causam: podridão branca, podridão parda e podridão mole (CASTRO e SILVA & AGUIAR, 2001b; WILCOX, 1968).

Podridão Branca: Os fungos classificados neste grupo degradam tanto a lignina como os polissacarídeos. Alguns no estágio inicial da deterioração quebram enzimaticamente as estruturas da lignina para posterior acesso aos polissacarídeos. Portanto, este tipo de podridão pode sofrer a ação do fungo de duas maneiras distintas: uma envolvendo a remoção simultânea de todos os componentes e outra, menos freqüente, envolvendo a remoção seletiva de lignina e polioses, mantendo a celulose praticamente intacta. As células são atacadas inicialmente a partir da camada S₃ da parede secundária em direção à lamela média (WILCOX, 1968). A madeira atacada por

fungos nesta classe adquire uma aparência esbranquiçada e se rompem facilmente no sentido das fibras.



Figura 04 – podridão branca

Podridão Parda: neste grupo os fungos degradam principalmente os polissacarídeos da madeira. Mas há também uma certa mudança e degradação da lignina. A madeira torna-se escura e fissurada que conduz a aparência cúbica da podridão.



Figura 05 – podridão parda

A nível celular os fungos de podridão parda podem remover inicialmente a camada S_2 da parede secundária, antes de atacar as camadas S_1 e S_3 ou atacam simultaneamente as camadas S_2 e S_3 (WILCOX, 1968).

Segundo Castro e Silva, (1996), os fungos ainda são causadores de um terceiro tipo de podridão na madeira, chamada de podridão mole, que se caracteriza por apresentar hifas que penetram na parede secundária da célula.



Figura 06 – Podridão mole

2.3.2 Fungos Lignocelulolíticos

Os fungos são os mais efetivos biodegradadores de materiais lignocelulósicos na natureza, mais especificamente os fungos causadores de decomposição (podridão) branca, pois degradam todos os componentes da madeira (celulose, hemicelulose e lignina). (CASTRO E SILVA & AGUIAR, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 1986).

Em tecidos plenamente lignificados (teor de lignina maior ou igual a 20%) os mais importantes decompositores são os Basidiomicetos capazes de decompor a lignina. Estima-se em cerca de 1.800 o número destas espécies de Basidiomicetos para o hemisfério norte. Nas regiões tropicais e hemisfério sul o total deve ser bem maior. Em qualquer evento envolvendo a decomposição de materiais lignocelulósicos, é bastante alta a incidência deste grupo de microrganismos, o que revela a sua importância ecológica. (BLANCHETE, 1991; HATAKKA, *et al* 1994)

Geralmente, os filtrados de cultura de fungos apresentam alta concentração de hidrolases, denotando que existe um aparato bastante complexo atuando na secreção dessas enzimas. Após selecionadas, as enzimas são depositadas em vesículas associadas com o aparato de Golgi, daí deslocadas até a membrana, à qual se fundem, permitindo que as enzimas saiam para o espaço entre a membrana e a parede da célula fúngica (PUTZKE, 2002; TRABULSI, 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento metodológico do trabalho foi dividido em três etapas consecutivas. A primeira etapa envolve os microrganismos, meios de cultura para otimização, otimização de pH e temperatura, na segunda etapa temos a determinação da atividade enzimática e a terceira etapa envolve a quantificação do crescimento fúngico.

1ª etapa

3.1 Microrganismos

Foram utilizadas amostras dos fungos *Pycnoporus sanguineus* e *Panus crinitus*, obtidas a partir de linhagens que encontram-se armazenadas em meio Sabouraud no Laboratório de Microbiologia da UTAM (Instituto de Tecnologia do Amazonas/UEA). O estudo foi desenvolvido nos laboratórios de Microbiologia da Universidade do Estado do Amazonas – UEA e UTAM/UEA.

3.2 Meio de Cultura para Otimização

Para efetuar a inoculação do material fúngico foi utilizada a metodologia proposta por BETTUCCI & GUERRERO (1971). É necessário aquecer um estilete, molhar na água destilada e cortar amostras sempre próximas à chama do bico de Bunsen, verter o meio em placa de Petri casadas e vedadas com fita crepe, sendo que este procedimento foi executado utilizando uma câmara de fluxo laminar vertical e bico de Bunsen para diminuir a possibilidade de contaminação.

Cada amostra de fungo (3cm) utilizada para inoculação precisou passar por um procedimento de assepsia, que consta das seguintes etapas:

- 1- Mergulhar a amostra por 1 segundo em álcool 70%;
- 2- Em seguida, mergulhar também por 1 segundo, em hipoclorito de sódio a 3%;
- 3- Deixar imerso por 1 minuto em água destilada;
- 4- Colocar sobre papel filtro para absorver o líquido e secar amostra.
- 5- Inocular em placas casadas, vedadas com identificação.

Seguindo a metodologia proposta por Castro e Silva (1996a), a inoculação do fungo ocorreu em meio Agar Sabouraud 4% e meio Agar Extrato de malte Dextrose, ambos acrescidos de clorafenicol e/ou ampicilina 200g para evitar contaminação e mantidos em incubadora com variação de temperatura em torno de 25°C, 30°C e 35°C e ajuste de pH para ácido ou alcalino usando-se hidróxido de sódio (NaOH) 1,0 M e ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1,0 M.

Composição do Meio Sabourand (g/L):

Peptona de caseína ----- 5,0

Peptona de carne ----- 5,0

Glicose ----- 40,0

Agar ----- 15,0

pH a 25°C ----- 7,0

Composição do meio Agar Extrato de Malte Dextrose (g/L):

Extrato de malte ----- 20,0

Peptona ----- 1,0

Dextrose ----- 20,0

Água destilada ----- 1000 mL

Agar ----- 20,0

3.3 Otimização de pH e Temperatura

Baseado na metodologia proposta por Castro e Silva (1996a), com cada linhagem de fungos foram realizadas repicagens para determinação do pH e temperatura ótimos para o crescimento dos fungos. Para maior segurança na obtenção de resultados, como se trata de material fúngico e pode ocorrer fácil contaminação, a repicagem foi realizada utilizando-se triplicatas, tanto na determinação do pH, nas escalas de pH4, pH5, pH6 e pH7, quanto na temperatura, com variação de 25°C, 30°C

e 35°C, testando-se com isso ao mesmo tempo as duas variáveis. Ressaltando que no que diz respeito ao pH, o reajuste para cada caso foi realizado com NaOH 1,0 M ou H₂SO₄ 1,0 M. Para evitar a degradação do Agar abaixo de pH 5,0 o ajuste foi feito após a autoclavagem. Posteriormente as placas foram inoculadas e o crescimento ocorreu em temperatura ambiente e em incubadora.

Esta etapa da metodologia é observada na figura abaixo:

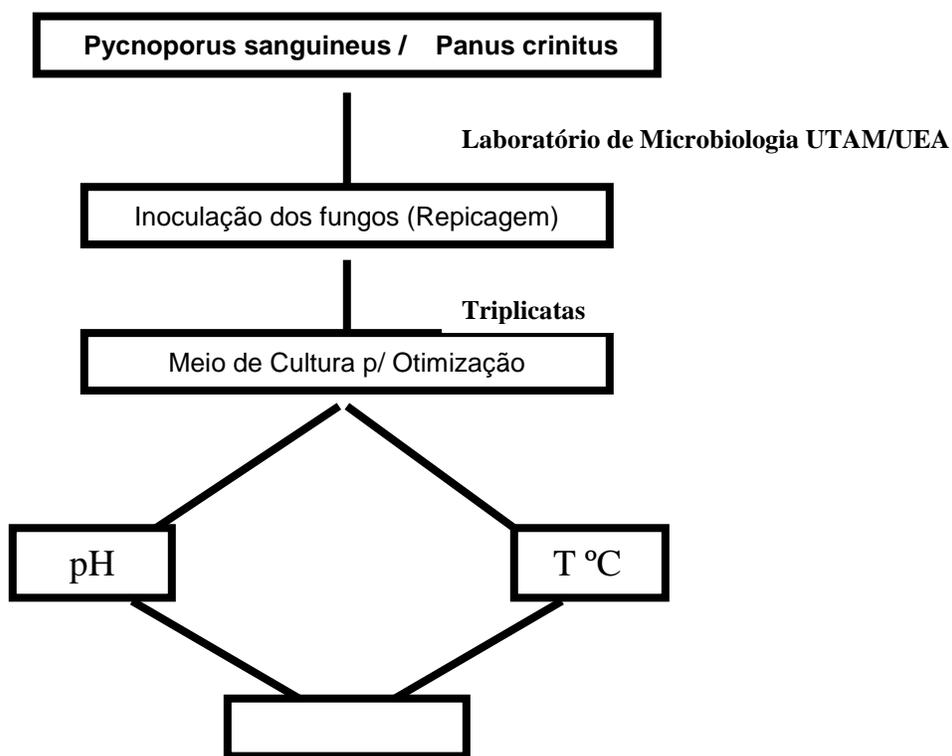


Figura 08: Esquema da primeira etapa metodológica

2ª Etapa

3.4 Determinação da atividade enzimática

3.4.1 Meio de Cultura

A inoculação do fungo ocorreu em meio malte líquido com e sem glicose como fonte de carbono. Amostras de 2 mL do meio de cultivo (caldo filtrado) foram consideradas como fonte enzimática, essas amostras foram coletadas no 2°, 4°, 6°, 8°, 10° e 12° dias para observação do período de maior produção enzimática.

3.4.2 Atividade em Papel Filtro (FPA) - Cellobiohydrolases

Essa atividade foi medida de acordo com a metodologia proposta por Mandels *et al.* (1976). Através desse ensaio é possível medir a atividade celulolítica total de um caldo de cultivo ou de uma solução de enzima, quando esta atua sobre um material celulósico (papel filtro Whatman n^o 1).

Um volume de 0,5 mL de caldo filtrado e 1,0 mL de tampão citrato sódio 0,05 M pH 4,8 foram adicionados num tubo com tampa de rosca contendo uma tira de papel filtro Whatman n^o 1 (1 x 6 cm). Após 1 hora de incubação a 50°C, os açúcares liberados

foram determinados pelo método do DNS através da adição de 3,0 mL de reagente DNS à 1,5 mL de amostra. A mistura foi incubada num banho de água a 100°C por 5 minutos, esfriada a temperatura ambiente e a absorbância lida a 575 nm e comparada com curva padrão de glicose. Uma unidade de atividade em papel filtro corresponde a 1 μ mol de açúcares redutores, expressos como glicose, liberados por minuto.

3.4.3 Atividade da Endo-1,4- β -D-Glucanase (carboxymethyl cellulase ou CMCase)

Foi utilizada a metodologia proposta por Mandels *et al.*, (1976). Este ensaio mede os açúcares liberados de uma celulose solúvel, após a ação de endo-glucanase. A 0,5 mL de uma solução 1,0% de carboximetilcelulose (CMC) em tampão citrato 0,5 M pH 4,8 foi adicionado 0,5 mL de caldo de cultivo filtrado. A mistura foi incubada por 30 minutos a 50°C e os açúcares liberados foram determinados pelo método do DNS através da adição de 3,0 mL de reagente DNS à 1,0 mL de amostra. A mistura foi incubada num banho de água a 100°C por 5 minutos, esfriada a temperatura ambiente e a absorbância lida a 575 nm e comparada com curva padrão de glicose. Uma unidade de atividade endo-1,4- β -glucanase corresponde à quantidade de enzima que libera 1 μ mol de açúcares redutores, expressos como glicose, por minuto.

3.4.4 Atividade β -Xilosidase

3.4.5

Para determinar a atividade da β -Xilosidase foi utilizada a metodologia proposta por Tan *et al.*, (1987). O método utiliza p-nitrofenil- β -Xilosideo (pNPX) como substrato para a atividade β - Xilosidase . Para determinação da atividade, 0,1 mL de caldo filtrado

e 0,4 mL de uma solução 0,2% (p/v) de pNPX, em 50 mM de tampão acetato de sódio (pH 4,8), foram incubados a 50°C durante 30 minutos. Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de uma solução 10% (p/v) de bicarbonato de sódio. O p-nitrofenil liberado foi medido por absorvância em 410 nm, e comparado com uma curva padrão de xilanose.

3.4.5 Atividade da β -Glicosidase

Foi utilizada a metodologia proposta por Tan *et al.*,(1987), que utiliza p-nitrofenil- β -D-Glicosideo (pNPG) como substrato para a atividade β -Glicosidase. Para determinação da atividade enzimática 0,1 mL de caldo filtrado e 0,4 mL de uma solução 0,2% (p/v) de pNPG, em 50 mM de tampão acetato de sódio (pH 4,8), foram incubados a 50^o C durante 30 minutos. Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de uma solução 10% (p/v) de bicarbonato de sódio. O p-nitrofenil liberado foi medido por absorvância em 410 nm, e comparado com curva padrão de glicose. Esta etapa da metodologia é observada na figura 09.

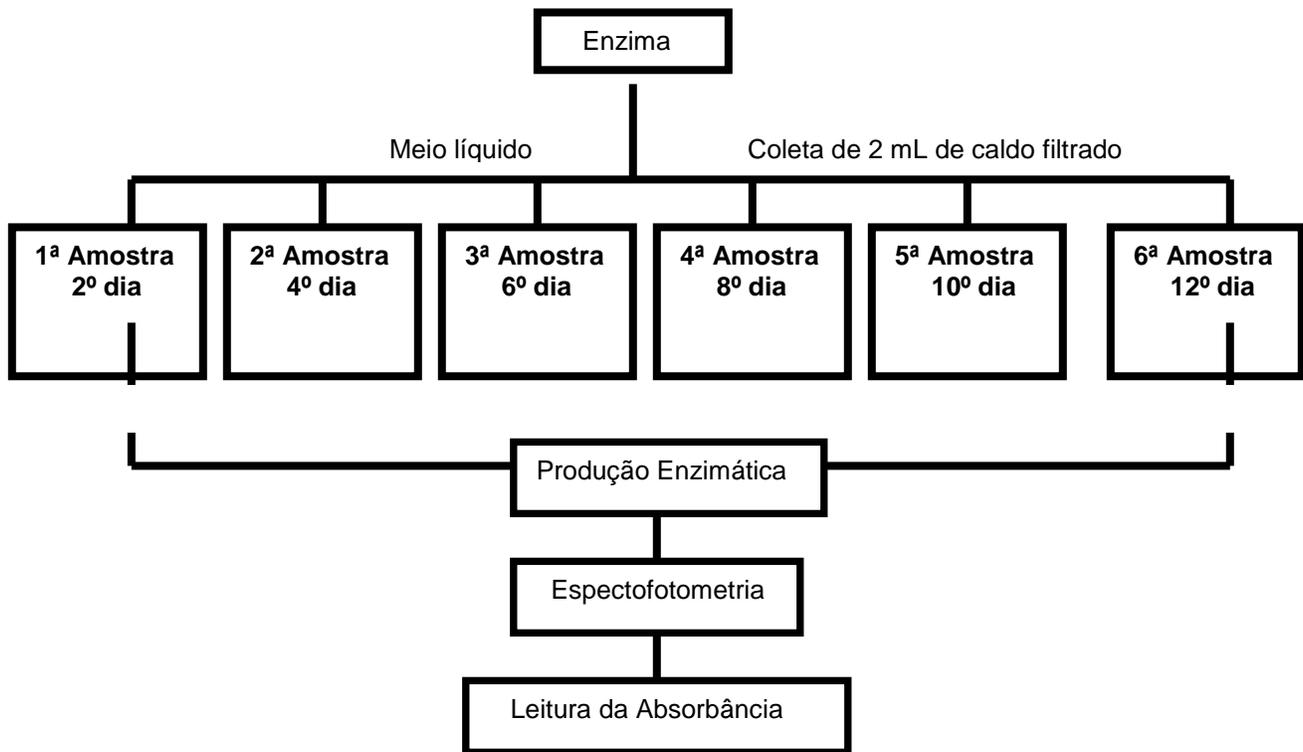


Figura 09: Esquema da segunda etapa metodológica.

3ª Etapa

3.5 Quantificação do Crescimento Fúngico

Para quantificar o crescimento fúngico foi utilizado o método da placa de petri e mensurada a progressão da fronteira micelial contra o tempo, como propõe a metodologia baseada em BETTUCCI & GUERRERO (1971). A progressão da fronteira micelial foi acompanhada através de medição diária do aumento do diâmetro da colônia em função do tempo, durante um período de sete dias, tanto para o *Pycnoporus sanguineus* (PIC 07) como para o *Panus crinitus* (CDG 07). Todos os experimentos foram realizados em triplicata (Figura 10).

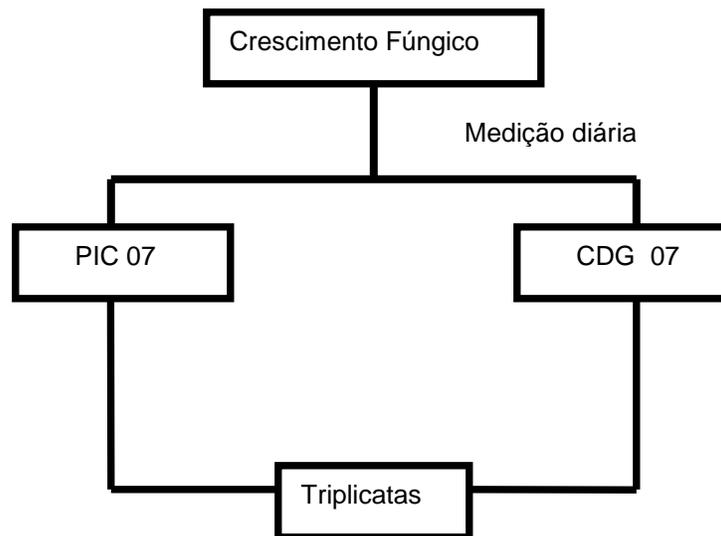


Figura 10: Esquema da terceira etapa metodológica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Observações sobre o Crescimento Fúngico

4.1.1 *Pycnoporus sanguineus* (L.:F.) Murr

O corpo frutífero do *P. sanguineus* possui um aspecto semelhante a uma flor de coloração alaranjada (Figura 07).



Figura 07: Corpo frutífero do fungo *P. sanguineus*

4.1.1.1 Influência do meio e pH no crescimento do *P. sanguineus* (L.F.) Murr

Dentre os meios testados o meio sabouraud foi onde se observou o menor avanço da fronteira micelial no período estipulado do experimento para todos os pH. Por outro lado, o maior avanço da fronteira micelial ocorreu neste meio quando acrescido de dextrose e ajustado para o pH 5. Neste meio de cultura (Sabouraud + dextrose), o *P. sanguineus* apresentou bom crescimento micelial em meio ácido (pH 4 e 5) diminuindo esse crescimento à medida que diminui a condição de acidez (pH 6 e pH 7). Comportamento similar foi observado com o meio Sabouraud acrescido de peptona (Figura 08).

A tabela 07 mostra os parâmetros descritivos de crescimento do *P. sanguineus* em diferentes pH e meio de cultura extrato de malte. Em termos absolutos o maior valor médio de crescimento aconteceu no pH ácido (pH 5) e o menor no pH 4. Este resultado está de acordo com aquele apresentado por Ferreira (2005) para diferentes cepas desse fungo.

TABELA 07: PARÂMETROS DESCRITIVOS DO CRESCIMENTO MICELIAL DO *P. sanguineus* EM DIFERENTES pH e MEIO DE CULTURA EXTRATO DE MALTE.

	MÉDIA	Min.	Max.	Varia.	Erro Padrão
pH4	2.73	0.5	6.2	3.988818	0.470745
pH5	5.32	1.8	9.3	7.962003	0.665082
pH6	4.64	1.6	8.7	7.969485	0.665394
pH7	4.58	1.5	8.4	7.928309	0.663673

Com o objetivo de verificar se existia diferença estatística entre os valores observados nos diferentes pH realizamos o teste estatístico ANOVA (Tabela 08) onde ficou evidenciado diferenças de os crescimentos nos diferentes níveis de pH.

TABELA 08: ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) COM EFEITO DO pH NO CRESCIMENTO MICELIAL DO *P. sanguineus*.

Causas de variação	Grau de liberdade (G.L)	SQ	QM	F	p
Entre Tratamentos	3	66,85	22,28	3,201	0,00286
Dentro de Tratamentos	68	473,39	6,96		
TOTAL	71				

* significativo ao nível $\alpha = 0,005$

Teste de Tukey (Tabela 09) para comparação pareada das médias, evidenciou-se diferenças estatística no crescimento do fungo entre os pH 4 e pH 5, enquanto que entre os demais crescimentos não há diferenças estatísticas. Assim, o *P. sanguineus* parece crescer em ambiente ácido à neutro. Resta saber se o ambiente alcalino também é propício ao crescimento desse fungo.

TABELA 09: TESTE DE TUKEY COM PAREAMENTO DAS MÉDIAS DOS pH TESTADOS

	{pH4} M=2,73	{pH5} M=5,32	{pH6} M=4,64	{pH7} M=4,58
G_1:1 {4}		0.022001 ^(*)	0.140243	0.163279
G_2:2 {5}	0.022001 ^(*)		0.864962	0.829297
G_3:3 {6}	0.140243	0.864962		0.999862
G_4:4 {7}	0.163279	0.829297	0.999862	

(*) significante a $p < 0,05$

Como é possível observar na figura 08, o fungo desenvolve crescimento significativo nos outros pH testados, sendo que se evidencia a sua afinidade por ambiente mais ácidos.

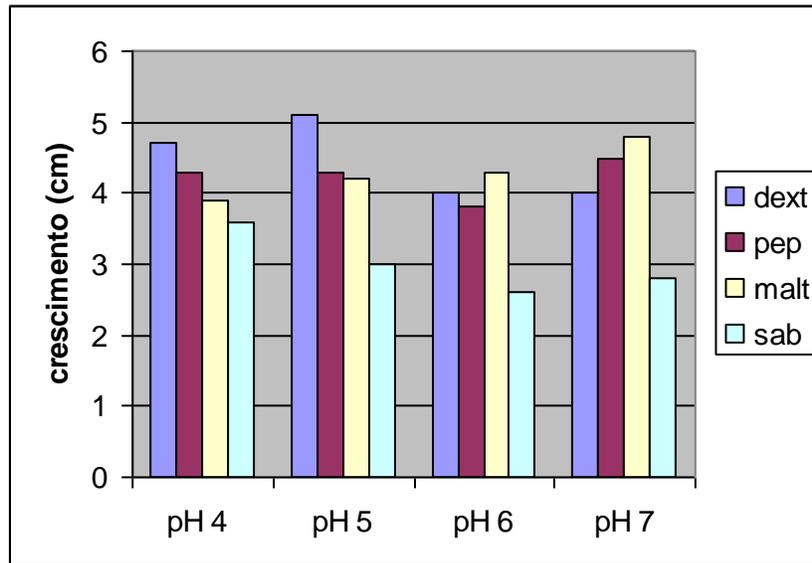


Figura 08: Crescimento micelial do *P. sanguineus* em diferentes meios de cultura e pH a temperatura ambiente.

4.1.2 *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer

O corpo frutífero do *P. crinitus* possui um aspecto semelhante a um cogumelo de coloração marrom (Figura 09).



Figura 09: Corpo frutífero de *P. crinitus* (L. ex. Fr.) Singer

4.1.2.1 Influência do meio e pH no crescimento do *Panus crinitus* (L. ex. Fr.) Singer

Em termos absolutos, assim como ocorreu para o *P. sanguineus*, o pH 5 foi onde ocorreu o maior crescimento micelial do fungo *P. crinitus* e o menor no pH 4 (Tabela 10).

TABELA 10 – PARÂMETROS DESCRITIVOS DO CRESCIMENTO MICELIAL DO *P. crinitus* EM DIFERENTES PH.

	Média	Min.	Max.	Varian.	Erro Padrão
pH4	2.42	0.4	6.1	3.576	0.445
pH5	4.45	1	9	7.682	0.653
PH6	3.69	0.7	8.55	6.955	0.621
pH7	3.14	0.5	7.4	5.462	0.550

Realizamos o teste estatístico ANOVA (Tabela 11) com o objetivo de verificar a existência de diferenças entre os crescimentos micelial nos diferentes níveis de pH ficando evidenciado que não existe diferenças estatísticas entre os crescimentos em diferentes pH. Diferentemente do fungo *P. sanguineus* para o fungo *P. crinitus* a faixa de pH estudada não influenciou seu crescimento.

TABELA 11: ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO EFEITO DO pH NO CRESCIMENTO MICELIAL DO *P. crinitus*.

Causas de variação	Grau de liberdade (G.L)	SQ	QM	F	p
Entre Tratamentos	3	39,912	13,30	2,24 ^(*)	0,0905
Dentro de Tratamentos	68	402,457	5,91		
TOTAL	71				

* não significativo ao nível $\alpha= 0,005$

Assim como ocorreu para o *P. sanguineus*, o maior avanço da fronteira micelial para o *P. crinitus* ocorreu também no pH 5, mas neste caso no meio extrato de malte. Por outro lado, o *P. crinitus* em meio Sabouraud acrescido de peptona, ao contrário do crescimento do *P. sanguineus* neste meio, foi o que apresentou menor valor médio para o crescimento micelial em todos os pH testados. Quando se retira a peptona do meio, o crescimento desse fungo apresenta-se maior do que aquele com acréscimo desse produto, o qual é oriundo da hidrólise parcial de proteína (Figura 10).

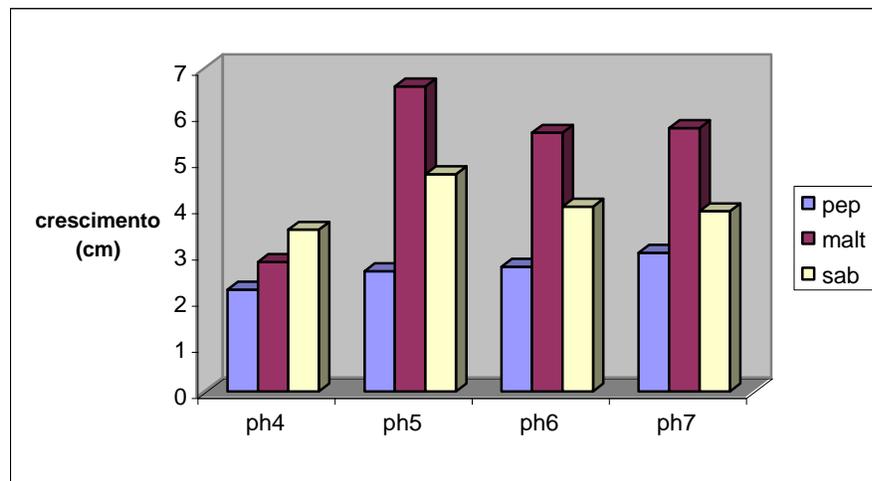


Figura 10: Crescimento do *P. crinitus* em diferentes meios e pH a temperatura ambiente.(+/-25°C)

4.1.3 Influência da Temperatura no crescimento dos fungos

Há limites de temperatura no qual os processos metabólicos de qualquer organismo fúngico, ou mesmo qualquer forma de vida, pode acontecer. Neste nível, portanto, poder-se-ia afirmar que qualquer mudança fisiológica ou processo de diferenciação em fungos é dependente da temperatura ou induzido pela temperatura. Entretanto, à parte da dependência básica geral do metabolismo sob temperatura ambiente adequada, instâncias específicas podem ser reconhecidas onde temperatura parece ter um papel adicional como indutor de mudanças em

fungos filamentosos (ANDERSON, 1978). Ressalta-se ainda que qualquer mudança na temperatura irá alterar simultaneamente outras características físico-químicas do ambiente e conseqüentemente a natureza dos processos de indução, o que torna as mudanças na temperatura um tanto complexas (ANDERSON & SMITH, 1976).

Embora não faça parte do presente trabalho estudar as possíveis mudanças morfológicas causadas pela variação da temperatura, mas sim verificar essa variação e determinar qual proporciona maior crescimento linear do micélio. Entretanto, é importante frisar que os efeitos resultantes dessa mudança de temperatura ocorre a nível de membrana celular (ANDERSON, 1978; CRISAN, 1973).

A observação da influência da temperatura no crescimento micelial do fungo *P. sanguineus*, foi realizada em meio sólido de extrato de malte e pH 5,2. Nestas condições, o maior valor médio do crescimento micelial foi obtido na temperatura de 35°C, muito embora, o fungo já apresente crescimento a partir de 25°C (Figura 11). De certo modo, esse resultado corrobora o que observamos durante a coleta desse fungo, onde o aparecimento do corpo frutífero sempre coincidiu com o início do período de alta temperatura (verão) na região.

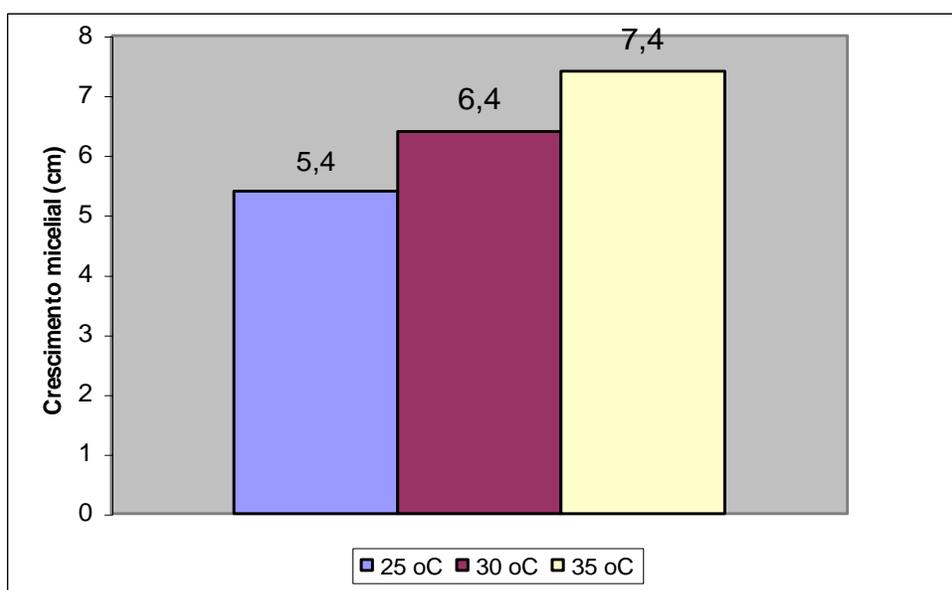


Figura 11 : Crescimento micelial do fungo *P. sanguineus* em meio Agar-malte, pH 5,2 em diferentes temperaturas.

Comparou-se o crescimento micelial do *P. sanguineus* no meio Agar-malte, considerando-se o pH e temperatura, verificou-se que este último parâmetro é o que exerce maior influência no crescimento micelial desse fungo.

Em relação ao fungo *P. crinitus* a observação da influência da temperatura no crescimento micelial foi realizada em meio Sabouraud e pH 5,6. Nestas condições, o maior valor médio do crescimento micelial foi obtido na temperatura de 35°C, muito embora, assim como o *P. sanguineus*, o fungo já apresente crescimento a partir de 25°C (Figura 12).

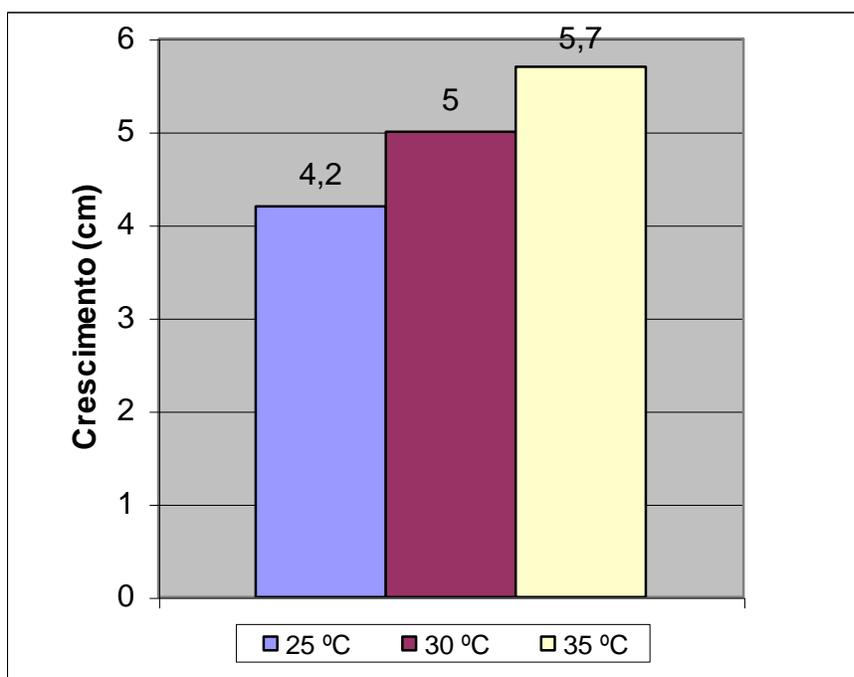


Figura 12: Crescimento micelial do fungo *P. crinitus* em meio Sabouraud, pH 5,6 em diferentes temperaturas.

Comparando-se também o crescimento micelial do *P. crinitus* nos dois parâmetros observados (pH e temperatura) considera-se o parâmetro para temperatura, também como com o *P. sanguineus*, aquele que exerceu maior influência no avanço da fronteira micelial desse fungo.

4.1 Determinação da Atividade Enzimática

Ambos os fungos apresentaram atividade enzimática similar de β -glicosidase e endo- β glucanase, sob condição de agitação e sem a presença de glicose como fonte de carbono. Por outro lado, o fungo *P. crinitus*, nesta mesma condição mostrou-se mais produtivo em β -xilosidase do que o *P. sanguineus*.

O crescimento de ambos os fungos na condição estacionária, não apresentaram atividade FPA porém o *P. sanguineus* apresentou atividade endo- β -glucanase nessa condição, na ausência de glicose.

O acréscimo de glicose ao meio utilizado para o crescimento sob condição estacionária aumentou em 37,31% a atividade de β -glicosidase do *P. sanguineus* e não contribuiu para aumento da atividade dessa enzima no *P. crinitus*. Nesta condição de crescimento a glicose não interferiu na atividade de β -xilosidase de ambos os fungos.

4.2.1 Atividade enzimática do *Pycnoporus sanguineus*

A Tabela 12 mostra o valor médio da produção enzimática do fungo *P. sanguineus* em meio de malte na temperatura ambiente sob duas condições de crescimento e sem acréscimo de glicose como fonte de carbono. O fungo mostrou capacidade de produzir quantidades mensuráveis de enzimas celulolíticas nas duas condições testadas, com exceção da atividade FPA na condição estacionária onde não foi detectada a presença dessa enzima durante o período do teste. Por outro lado, na condição sob agitação observou-se atividade dessa enzima. Na realidade, o crescimento sob agitação mostrou maior atividade enzimática para todas as enzimas. A atividade enzimática sob agitação foi cerca de 47% maior para β -glicosidase.

Tabela 12: Atividade enzimática do fungo *P. sanguineus* sob condição de agitação e estacionária em meio malte sem acréscimo de glicose como fonte de carbono a temperatura ambiente.

ENZIMA	ESTACIONÁRIO	
	AGITAÇÃO (U/ml)	(U/lm)
FPA	0.8208	nd
ENDO- β -GLUCANASE	1.7012	0.253
β -GLICOSIDASE	7.764	5.287
β -XILOSIDASE	3.821	2.461

Com o intuito de verificar a influência da glicose na atividade enzimática realizamos teste acrescentando a glicose ao meio líquido como fonte de carbono na condição estacionária (Tabela 13).

Tabela 13: Atividade enzimática do *P. sanguineus* sob condição estacionária em meio malte com e sem acréscimo de glicose como fonte de carbono

ENZIMA	ESTACIONÁRIA (U/ml)	
	Com Glicose	Sem Glicose
FPA	nd	nd
ENDO- β -GLUCANASE	nd	0.253
β -GLICOSIDASE	7.251	5.287
β -XILOSIDASE	2.551	2.461

Nestas condições verificou-se que a glicose, conhecido repressor de atividade celulolítica, possivelmente interfere na atividade da endo- β -glucanase e FPA. Para última enzima, assim como ocorreu para meio sem acréscimo de glicose, não foi detectada nenhuma atividade. Para a endo- β -glucanase na condição estacionária e meio acrescido de glicose não foi detectada atividade dessa enzima evidenciando a atividade repressora comentada anteriormente.

A β -glicosidase, uma enzima produzida em quantidades elevadas pela maioria dos fungos celulolíticos (Woodwar & Wiseman, 1982), esteve presente em maior quantidade na condição sob agitação. Ressalta-se, entretanto, que na condição estacionária e presença de glicose no meio de cultura, essa atividade enzimática alcançou patamar similar dessa enzima evidenciando o possível uso da glicose na atividade da β -glicosidase.

Com relação a endo-glucanase, o fungo *P. sanguineus* mostrou capacidade de produzir quantidades mensuráveis dessa enzima em meio sem a presença de glicose como fonte de carbono. Sob condição de agitação e sem glicose acrescida ao meio de cultura o fungo produziu 572% mais endo-glucanase do que sob a condição estacionária (Tabela 11). Este resultado é contrário àquele obtido por Herrera (1991) para uma cepa brasileira do fungo *Thermoascus aurantiacus* onde a máxima atividade endo-glucanase foi a obtida quando glicose foi utilizada como substrato de crescimento. Em crescimento estacionário e com a presença de glicose como fonte de carbono o *P. sanguineus* não apresentou atividade endo-glucanase.

Como forma de avaliação, duas atividades celulolíticas produzidas por *P. sanguineus*, foram comparadas com as do conhecido fungo celulolítico, *Trichoderma reesei* (MANDELS, 1974) (Tabela 14).

TABELA 14: Comparação da atividade enzimática de FPA e endo-glucanase de *P. sanguineus* e *Trichoderma reesei*

	<i>P. sanguineus</i>	<i>T. reesei</i>
<u>Substrato:</u> glicose		
FPA	0,8208	0,05
ENDO-GLUCANASE	1,701	0,90

Ressalta-se que o fungo *P. sanguineus* é conhecido como capaz de produzir de podridão branca na madeira classificando-o como ligninolítico, ou seja, capaz de produção de enzimas do complexo ligninocelulolítico para quebrar a estrutura da lignina (CASTRO E SILVA *et al.*, 1993).

O fungo *P. sanguineus* foi capaz de produzir celulase, em menor ou maior quantidade, quando cultivado em substrato sem a presença de glicose, mostrando, entretanto, um sistema celulolítico reprimido pela presença de glicose no meio de cultivo para cultura estacionária. Dekker (1989a), mostrou que *Trichoderma reesei*, conhecido fungo produtor de elevadas taxas de celulases, apresenta um sistema celulolítico induzido por celulose e fortemente reprimido pela presença da glicose no meio de cultivo.

De modo geral, o fungo *P. sanguineus* apresentaram atividades celulolíticas comparáveis às do fungo *T. reesei*, apesar de seus sistemas enzimáticos apresentaram grandes diferenças quando a indução e repressão. Ressalta-se, entretanto, que a regulação da produção celulolítica de *P. sanguineus* deve ainda ser esclarecida através de estudos mais detalhados. Nossos resultados concordam com o apresentado por Castro e Silva *et al.* (1993) no que diz respeito ao uso de um "pool" enzimático, por estes fungos, para penetrar na matriz "amorfa" que compreende a parede celular do tecido xilemático.

A produção de β -xilosidase mostrou-se similar na presença e ausência de glicose em crescimento sob condição estacionária. Quando o fungo foi cultivado sob agitação (180 rpm), produziu 382 U/mL de atividade xilosidase, sem a presença de glicose como fonte de carbono. A atividade foi maior aproximadamente 55% quando comparada com a cultura estacionária nas mesmas condições.

A capacidade de fungos que decompõem madeira produzir xilanases quando crescem em meios que contém glicose como fonte de carbono foi descrita por vários autores (CLEMONT *et al.*, 1970; BAILEY *et al.*, 1971; CASTRO E SILVA *et al.*, 1993). O *P. sanguineus* foi capaz de produzir xilosidase nos substratos em que ele foi cultivado. Entretanto, a maior atividade ocorreu na condição de agitação sem a presença de glicose, resultado contrário ao obtido por Herrera (1991) para

Thermoascus aurantiacus com o qual obteve a maior atividade com meio suplementado com 1,5% glicose.

Vários autores mostraram a relação existente a atividade xilosidase e endo-glucanase (DEKKER & RICHARDS, 1976; WONG *et al.*, 1988; ROGER & NAKAS, 1990). Para *P. sanguineus* a produção de atividade xilosidase nem sempre foi acompanhada de atividade endo-gluconase. No crescimento estacionário e presença de glicose no meio, não foi detectado atividade endo- β -glucanase. Podemos inferir que possivelmente a xilana esteja utilizando diferente sítio ativo na enzima, contrário a "especificidade cruzada, observada por Toda *et al.*, (1971) para *T. viridae* onde tanto carboximetilcelulose quanto xilana competiram pelo mesmo sítio ativo na enzima.

A Figura 13 mostra a atividade enzimática do *P. sanguineus* sob condição de agitação e sem acréscimo de glicose, durante o período de crescimento considerado (duas semanas). De modo geral, nestas condições a atividade β -glicosidase mostrou-se detectável vinte e quatro horas após o início da incubação com atividade crescente até o período final do experimento, onde apresentou o maior valor de atividade enzimática. A β -xilosidase também apresentou quantidade detectável já vinte e quatro horas após a inoculação, apresentando também um padrão de atividade crescente dessa enzima.

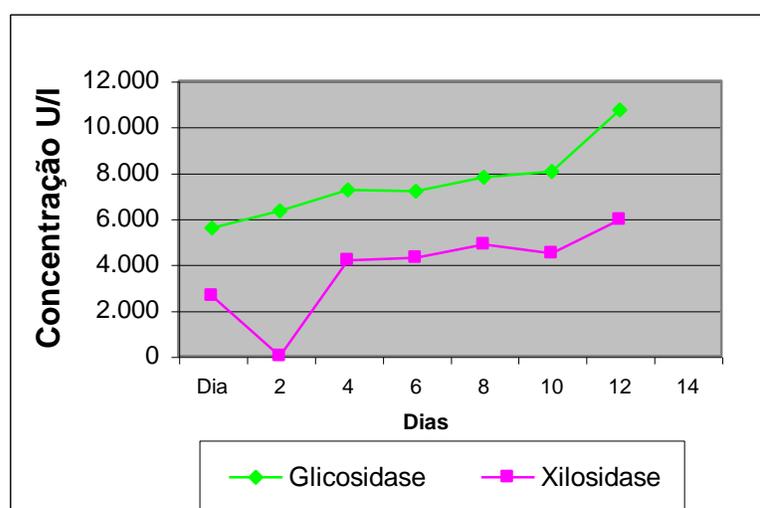


Figura 13: Atividade enzimática do *P. sanguineus* sob condição de agitação e sem acréscimo de fonte de carbono.

A endo- β -glucanase, por outro lado, apresentou quantidade mensurável somente a partir do quarto dia de incubação, alcançando valor máximo já no sexto dia, decrescendo lentamente a partir desse ponto. Nas condições de crescimento descritas, a enzima FPA só apresentou quantidade detectável também no oitavo dia de crescimento, alcançando valor máximo no décimo dia do experimento, quando a partir de então essa atividade começou a decrescer essa atividade (Figura 14).

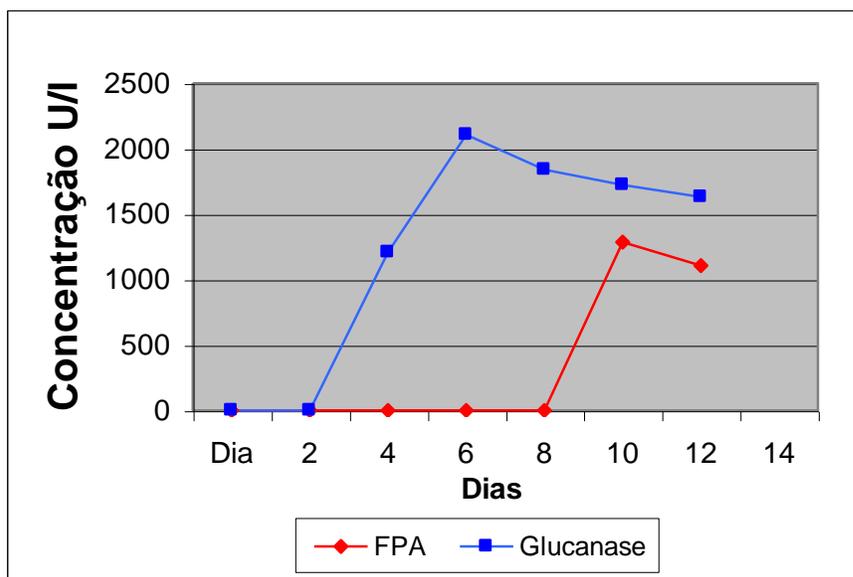


Figura 14: Atividade enzimática do *P. sanguineus* sob condição de agitação e sem acréscimo de fonte de carbono.

A atividade enzimática do *P. sanguineus* sob condição estacionária e em meio de cultura sem e com glicose como fonte de carbono é mostrada nas Figuras 15A e 15B. Nestas condições de crescimento não foi detectada atividade FPA nem com ou sem acréscimo de glicose como fonte de carbono ao meio de incubação utilizado. Para a endo- β -glucanase somente foi detectada uma pequena atividade no décimo quarto dia do experimento.

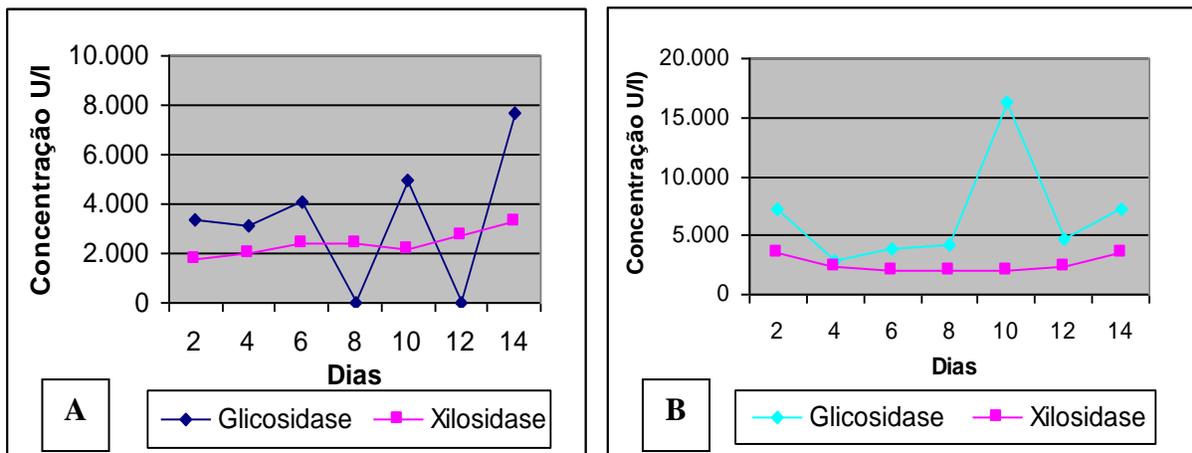


Figura 15: Atividade enzimática do *P. sanguineus* sob condição estacionária e em meio de cultura sem glicose (A) e com glicose (B) como fonte de carbono.

4.2.2 Atividade enzimática do *Panus crinitus*

A atividade enzimática do *P. crinitus* foi também avaliada sob as condições de crescimento sob agitação e estacionária e sem a presença de fonte de carbono.

Assim como ocorreu para o *P. sanguineus* nestas condições, esse fungo também mostrou maior atividade enzimática sob a condição de agitação. Nesta condição, o *P. crinitus* apresentou atividade β -xilosidase 118,86% maior do que o *P. sanguineus* nas mesmas condições. Assim como ocorreu para o *P. sanguineus*, no crescimento estacionário e meio contendo glicose como fonte de carbono a produção de β -xilosidase por *P. crinitus* não foi acompanhada de atividade endo-glucanase, embora vários autores tenham mostrado existir na relação entre atividade xilanase e endo-glucanase (HERRERA, 1991; ROGER & NAKAS, 1990). Montenecourt *et al.*, (1981) mostraram ainda que mutações que afetam a atividade celulase, freqüentemente também afetam a atividade xilanase.

As atividades β -glicosidase, FPA e endo-glucanase do fungo *P. crinitus* são similares àquela do *P. sanguineus* (Tabela 15).

O fungo *P. crinitus* apresenta uma maior atividade hemicelulolítica do que o *P. sanguineus* quando comparamos a produção de hemicelulase através da atividade xilosidase. O fungo *P. sanguineus* possui uma maior atividade celulolítica.

Herrera (1991) não detectou atividade β -xilosidase em cultura estacionário na presença de glicose para *Thermoascus aurantiacus*, enquanto que, no nosso estudo ocorreu a produção dessa enzima por *P. crinitus*, nas mesmas condições testadas por aquele autor, inclusive sem a presença de glicose. Praticamente não existe diferença na produção de xilosidase na presença ou não de glicose em condições estacionária (Tabela 15).

Tabela 15: Atividade enzimática dos fungos na condição de crescimento sob agitação e sem a presença de glicose e em temperatura ambiente.

ATIVIDADE (U/mL)	<i>P. sanguineus</i>	<i>Panus crinitus</i>
FPA	0,820	0,372
Endo- β -glucanase	1,7012	0,768
β -glicosidase	7,764	7,684
Xilosidase	3,821	8.363

Sob condições de agitação a atividade FPA foi detectada somente no sétimo dia de crescimento fúngico alcançando valor máximo no décimo segundo dia, quando a partir de então começou uma queda nos níveis enzimático (Figura 16). Na condição estacionária não foi detectada atividade FPA. A atividade endo- β -glucanase, em condição de agitação, foi detectada no quinto dia de crescimento, alcançando também valor máximo no décimo segundo dia.

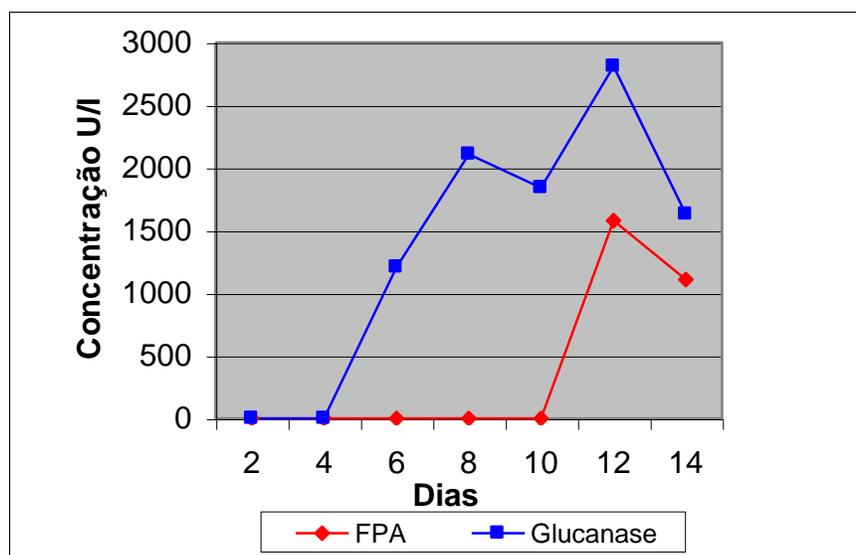


Figura 16: Atividade enzimática do *P. crinitus* sob condição de agitação e sem acréscimo de fonte de carbono.

As atividades β -glicosidase e β -xilosidase, por outro lado, foram detectadas vinte e quatro horas depois da incubação sob condição de agitação. Ambas enzimas alcançaram valores máximos no décimo quarto dia de crescimento (último dia do experimento) (Figura 17). Não foi possível determinar se a partir deste ponto essas enzimas começariam a apresentar valores menores.

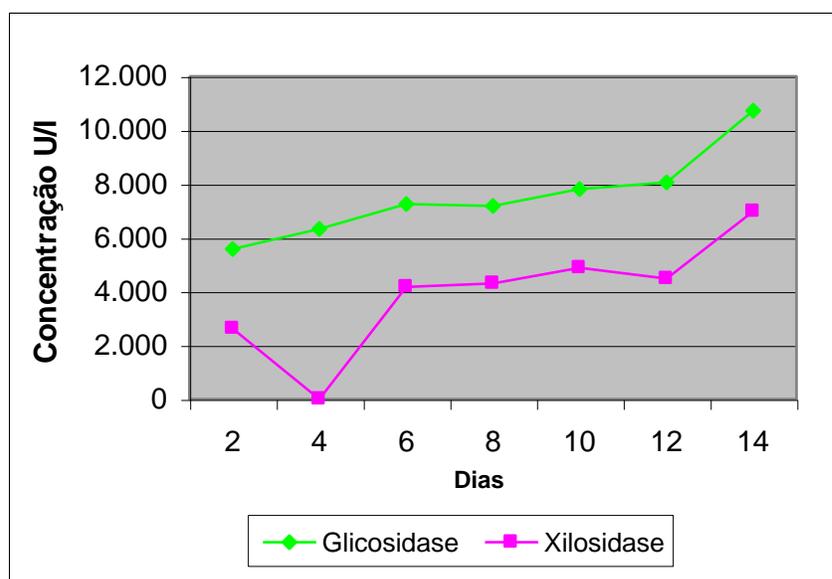


Figura 17: Atividade enzimática do *P. crinitus* sob condição de agitação e sem acréscimo de fonte de carbono.

Uma vez que na condição estacionária de crescimento e sem a presença de glicose o *P. crinitus* apresentou menor atividade enzimática, e no caso da FPA nenhuma atividade foi detectada, realizou-se o crescimento com acréscimo de glicose como fonte de carbono a fim de verificar se ocorreria uma maior atividade enzimática. Nesta condição (estacionária e presença de glicose), também não ocorreu atividade FPA e endo- β -glucanase. Parece que o crescimento do *P. crinitus* sob agitação tem mais influência na atividade de FPA e endo- β -glucanase do que a presença de glicose, uma vez que estas enzimas foram detectadas no crescimento sob agitação e sem a presença desse açúcar como fonte de carbono.

A atividade de β -glicosidase, mostrou-se 60,75% maior na condição de crescimento sob agitação (sem glicose como fonte de carbono) do que na condição estacionária. Nesta última condição, não houve diferença significativa dessa atividade enzimática com a presença e ausência da glicose (Tabela 16).

Tabela 16: Atividade enzimática do *P. crinitus* em condição estacionária e presença/ausência de fonte de carbono. Crescimento em temperatura ambiente.

Atividade (U/mL)	Estacionária	
	Com Glicose	Sem Glicose
FPA	nd	nd
Endo- β -glucanase	nd	nd
β -glicosidase	4,68	4,78
B-Xilosidase	2,28	2,38

Apesar do seu papel nos ecossistemas e suas aplicações na biotecnologia, o conhecimento sobre os fungos ainda permanece num nível incipiente, onde se estima que somente cerca de 5% das espécies é conhecida, e que muito pouco é conhecido sobre a sua biologia. Para a Amazônia, as estimativas apresentadas até hoje sobre a grandeza deste potencial biotecnológico dos fungos estão longe de significar o seu real potencial micológico, tendo em vista as grandes áreas e

diferentes ecossistemas que ainda não foram devidamente estudados, e que com toda certeza contém uma flora micológica que poderá nos revelar grande incidência de microrganismos ainda desconhecidos da ciência ou mesmo de ocorrência não citada para determinada área na Amazônia.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos confirmam a hipótese de que os fungos testados apresentam potencial hidrolítico. Apresentam ainda similaridade no que diz respeito a alguns parâmetros que possam influenciar no seu crescimento. Ambos, por exemplo, possuem a mesma faixa de temperatura ótima para crescimento nas condições testadas no presente experimento sendo que o meio de cultura difere entre os fungos. Para o *Pycnoporus sanguineus* foi o meio sabouraud acrescido de peptona, enquanto que para *Panus crinitus* foi extrato de malte. Além disso, mostraram preferência por meio ácido ressaltando-se, entretanto, sua capacidade de crescimento em meio mais próximos do pH neutro.

No que diz respeito as suas atividade enzimáticas concluímos que:

1. Ambos possuem uma apreciável atividade celulolítica sendo que o *Panus crinitus* evidencia uma maior atividade hemicelulolítica;
2. O crescimento sob agitação é onde se obtém a maior atividade enzimática para ambos os fungos;
3. A condição de crescimento influencia na atividade de certas enzimas . A atividade FPA, por exemplo, não foi detectada no crescimento em cultura estacionária de ambos os fungos;

4. O acréscimo de glicose ao meio de cultura no crescimento sob condição estacionária aumenta a atividade endo- β -glucanase no *P. sanguineus* mas não contribuiu para o aumento dessa atividade no *Panus crinitus*.
5. Diferentemente do que encontramos na literatura especializada a atividade de β -xilosidase em condição estacionária e meio de cultura suplementado com glicose não foi acompanhada pela atividade endo-glucanase.

Face ainda aos resultados obtidos podemos acrescentar a necessidade de novos estudos no que se refere:

- a) a possíveis indutores para maximização da atividade de algumas dessas enzimas que possuem interesse comercial;
- b) a busca de novos meios de cultura para maximização da atividade enzimática;
- c) ao crescimento desses fungos em condições alcalinas um vez que os resultados obtidos no presente projeto evidenciaram possibilidade nesse sentido (o meio alcalino é importante em certas atividades comerciais de interesse para as enzimas hidrolíticas);

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, E. **Lignin Chemistry – Past, Present and Future** – Wood Science Technology 11: 169-218. 1977.

ALMEIDA, Vera Maria Fonseca de - pesquisadora do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). 2001.

ANDERSON, J. & SMITH, J.E. effects of temperatura on filamentous fungi. IN: **Inhibition and inactivation of vegetative microbes**. Symposium Society for Applied Bacteriology pp. 191-218. Edited by F.A. Skinner and W.G.Hugo. London and New York: Academic Press. 1976.

ANDERSON, J.g. Temperature-induced development. IN.: **The filamentous fungi**. Vol.3. Developmental Mycology. Edited by John E. Smith & David R. Berry. London: Edward Arnod Punls. 1978.

ARCHER, David B.; MACKENZIE, D.A & JEENES, D.J. 2001. **Genetic engeneering: yeasts and filamentous fungi**. IN.: Basic Biotechnology, Edited by Colin Ratledge and Bjorn Kristiansen, Cambridge University Press. Cambridge, UK. pp 96-126.

ARNOLD, A E.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G.S. **Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity**. *Mycological Research* 105: 1502-1507. 2001

ARNOLD, A E.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G.S; Coley, P.D.; Kursar, T.A . **Are tropical fungal endophytes hyperdiverse ?** *Ecology Letters* 3: 267-274. 2000.

AUST, S.D. **Degradation of Environmental Pollutants** by *Phanerochaete*. 1990.

BAILEY,P.J; LIESE,W.; ROESCH, R.; KEILICH, G. ; AFTING, E.G. **Cellulase (β -1,4-glucan 4 glucanohydrolase) from the wood-degrading fungus *Polyporus schweinitzu* Fr.** *Biochim. Biophys. Acta* 185: 381-191. 1971.

BARATA, Lauro E. S. Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas.2000

BARR, D. P. **Mechanisms White Rot Fungi Use to Degrade Pollutants Environmental Groups of Fungi**. *Microbiology Ecology*. 21: 73-84. 1994.

BETTUCI, L. & GUERREO, R. T. **Hongos Xilófagos: Estúdio de Cultivos**. Bol. Univ. De la Rep. Montivideo, n. 188, p. 3-40, 1971.

BLANCHETTE, R. A. **Wood decomposition by *Phellinus pini*: a scanning electron microscopy study**. Can. J. Bot. 58: 1496-1503. 1980.

BLANCHETTE, R. A. **Delignification by Wood-Decay Fungi Annual Reviews Phytopatology** 29: 381-398. 1991.

BOOMINATHAN, K. e REDDY, A. **Fungal Degradation of Lignin: Biotechnological Applications**. Vol. 4. Editado por Marcel Dekker Inc, N. York. 1992).

BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Analytical Biochemistry v.72, p. 248-54, 1976.

CAO, W.G.; CRAWFORD, D.L. **Purification and some properties of b-glucosidase from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* strain SMF**. *Canadian Journal of Microbiology*, v.39, p. 529-35, 1993.

CARVALHO, S. M. S. **Análise das enzimas amilolíticas produzidas por microrganismos isolados do Tarubá**. Tese de Mestrado. Manaus – Amazonas. 1997.

CASTRO e SILVA, A; ESPOSITO, E.; FERRAZ, A : DURÁN, N. 1993. **Decay of *Parqkia oppositifolia* in Amazonian by *Pycnoporus sanguineus* and Potential Use for Effluent Decolorization**. *Holzforschung* 47(5): 361-368. 1993

CASTRO E SILVA, A. **Micromorfologia da degradação de madeira da espécie amazônica *Hura creptans* L. Por fungos lignolíticos pertencentes a classe Hymenomyces**. Tese de doutorado. Manaus: INPA/FUA. 1996a

CASTRO e SILVA, A. e AGUIAR, I. J. A. **Micromorfologia da Degradação da Madeira da Espécie Amazônica *Hura crepitans* L. Por Fungos Lignolíticos Pertencentes à Classe Hymenomyces** . *Acta Amazônia*, V 31, nº 3, p397 – 418, 2001b.

CASTRO E SILVA, et al. **O inexplorado potencial enzimático da biodiversidade amazônica**. 2002c.

CASTRO E SILVA, A. **Madeiras da Amazônia: características gerais, nome vulgar e usos**. Manaus: Edição SEBRAE. 2002d.

CLEMONT,S.; CHARPENTIER, M.; PERCHERON,F. **Polysaccharidases from *Sporocytophaga myxococcoides*: β -mannanase, cellulase and xylanase**. Bull. Soc. Chim. Biol. 52: 1481-1495. 1970.

COUGHLAN, M.P. **Cellulases: production, properties and applications**. *Biochemical Soc. Trans.*, v13, p.405-06, 1985.

COTÊ, W.A. **Wood ultrastructure – An atlas of electron micrographs**. Seattle: University of Washington Press, 1967, 96p.

CRISAN, E.V., **Current concepts of thermophilism and the thermophilic fungi**. *Mycologia* 16:1171-1198. 1973.

DAHM, H.; STREZELCZYK, E. **Impact of vitamins on cellulolytic, pectolytic and proteolytic activity of mycorrhizal fungi**. *Symbiosis*, v.18, p. 233-50, 1995.

D'ALMEIDA M.L.O. em **“Composição Química dos Materiais” em Celulose e Papel – Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica**. Vol.I. Ed. IPT – São Paulo, SP, 1982.

DEKKER, R.F.H.; RICHARDS, G.N. Hemicellulases: Occurrence, Purification, Physicochemical Properties and Mode of Action. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.** 32: 277-352. 1976.

DEKKER, R.F.H.. **Hidrólisis Enzimática de Lignocelulósicos**. Apostila do IX Curso International de Ingeniería Bioquímica. Escuela de Ingeniería Bioquímica. Universidad Católica de Valparaíso (Chile), p. 1- 132. 1989a.

DREYFUSS, M.M.; CHAPELA, I.H. **Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals**. *In: The Discovery of natural Products with Therapeutic Potential* (V.P. Gullo, ed.): 49-80. Butterworth-Heinemann, London. 1994.

DURÁN, N.; REYES, J.L; BAEZA, J & CAMPOS, V. **Biomass photochemistry- XII: Chemical and photochemical pre-treatment of rice hull and its fungal degradation**. *Biotechnol. Bioeng.* 32:564-568. 1987.

DURAN, N.; FERRAZ, A.; MANSILA, H. **Biopulping: A new view on wood delignification**. *Arch Biol. Technol.* 33: 295-315. 1990.

DURAND, H.; BARON, M.; CALMELS, T.; TIRABY, G. **Classical and molecular genetics applied to *Trichoderma reesei* for the selection of improved cellulolytic industrial strains**. *Biochemical General Cellulose Degradation*, p. 135-51, 1988.

ENZIMAS. Disponível em <http://enzimas2000vila.bol.com.br> . Acesso em junho de 2003.

ERIKSSON, K.E. **Swedish developments in biotechnology related to the pulp and paper industry**. *TAPPI* 68: 46-77. 1985.

ESPOSITO, Elisa & AZEVEDO, João Lúcio. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004.

FENGEL, D. ; Wegener, G. em **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. New York: Walter de Gruyter. 1989. 613p.

FERRAZ, André. **Biodegradação da Madeira e suas Aplicações Tecnológicas**. Disponível em www.abpm.com.br . Acesso em maio de 2003.

FERRER, I. et al . **Decolorization of kraft Effluent by free and Immobilized Lignin Peroxidase and Horseradish Peroxidase**. *Biotechnological Letters* 13: 577-582.1991.

GATTI, M.J. in **Micologia** Curso pós graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro.RJ. 1997.

GUERRERO, Rosa Trinidad. **Glossário de fungos: termos e conceitos aplicados à micologia**. -2 ed. - Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 2003.

GODFREY, T. & WEST, S. (eds.). **Industrial enzymology**, 2nd Edition. Macmillan Press, London. 1996.

HALLIWELL, N; HALLIWELL, G. **Biotechnological aspects of lignicellulose and biomass degradation**. *Outlook Agriculture* 24: 219-225. 1995.

HAMMOND, P.M. **Species inventory**. In: **Global Diversity: status of the Earth's Living Resources** (B. Groombridge, ed.) : 17-39. Chapman & Hall, London. 1992.

HAMMOND, P.M. **The current magnitude of biodiversity**. In **Global Biodiversity Assessment** (V.H. Heywood, ed.): 113-138. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 1995.

HATAKKA, A. et al. **Modification of Lignin by Laccase and Manganese Peroxidase**. **Proceedings of the 6th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry Advances in Applied and Fundamental Research**, Austria. 1994.

HAWKSWORTH, D.L. **The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation**. *Mycological Research* 95: 641-655. 1991.

HAWKSWORTH, D.L **The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revisited**. *Mycological research* 105(12): 1422-1432. 2001.

HERRERA, A E. M. **Thermoascus aurantiacus (CEPA BRASILEIRA: Aspecto do Crescimento, Produção Enzimática e Utilização no Tratamento de Materiais Lignocelulósicos**. Dissertação de Mestrado. Campinas: Universidade de Campinas. 1991.

HIGUCHI, T. **Lignin Biochemistry and Biodegradation Wood Science Technology** 24: 23-63. 1990.

ILMÉN, M.; SALHEIMO, A.; ONNELA, M-L.; PENTIILÄ, M.E. **Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, n.1, p.1298-1306, Apr. 1997.**

KIRK, T.K. *et al.* **Preparation and microbial decomposition of synthetic C-lignins.** Proc. Natl. Acad. C-lignins. Proc. Natl. Acad. Sci. 72: 2515-2519. 1975.

KIRK, T.K.;CHANG, H.M. Potential applications of biolignolytic systems. *Enzyme Microb. Technol.* 3: 189-196. 1981.

KIRK, T. K. & FARREL, R. L. Enzymatic "combustion". *The Microbiol. Degradation of lignin. Ann. Rev. microbial.* V. 41, p. 465-505, 1987.

KOLLMANN, F.F.P. & COTÉ Jr. **Principles of wood Science and Technology.** New York. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1968. 592p.

KURASAWA, T.; YACHI, M.; SUTO, M.; KAMAGATA, Y.; TAKAO, S.; TOMITA, F. **Induction of cellulase by gentiobiose and its sulfur-containing analog in *Penicillium purpurogenum*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, n.1, p.106-110, Jan. 1992.**WEIGEL, J. Ethanol from cellulose. *Experientia*, v.38, p. 151-55, 1982.

LAGUNA, Jose. **Bioquímica**, 2ª ed., Facultad de Medicina, UNAM, Mexico D.F., Fournier S.A., 1969.

LEHNINGER, Albert Lester et al. **Princípios de bioquímica.** 2 edição. São Paulo: SARVIER, 1995.

LEPAGE, E.S. **Química da Madeira.** In: Manual de Preservação da Madeira. Vol. I. Publicação IPT nº 1636. S. Paulo. SP. 1986.

LINKO, M.; POTANEN, K.; VIIKARI, L. **New developments in the application of enzymes for biomass processing.** In: M.P. Coughlan (ed.), *Enzyme Systems for Lignocellulose degradation.* Londres: Elsevier Applied Science, pp 331-346. 1989.

LOWE, D. A . **Production of enzymes.** IN.: Basic Biotechnology, Edited by Colin Ratledge and Bjorn Kristiansen, Cambridge University Press. Cambridge, UK. pp 392-408. 2001.

MANDELS, M. Microbial Sources of Cellulases. **Biotechnol. Bioeng. Symp.** 5: 81-105. 1974.

MANDELS, M. **Microbial sources of cellulase. *Biotechnology and Bioengineering*, v.5, p.81-105, 1975.**

MAY, R.M. **How many species?** *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, B 330: 293-304. 1991.

NIMZ, H. **Beech lignin: Proposal of a constitutional scheme.** *Angew. Chem.* 13(5): 313-329. 1974.

OLIVEIRA, A.M. *et al.* **Agentes destruidores da Madeira** In: IPT Manual de Preservação da Madeira. Vol. I. São Paulo, p 99 – 165, 1986.

OLIVEIRA, R. M, *et all.* **Produção de enzimas Hidrolíticas Extracelulares por Fusarium em Sistema de Batelada Simples.** Disponível em <http://interação.unis.Edu.br> . Acesso em junho de 2003.

PASCOE, I.G. **History of systematic mycology in Australia.** In *History of Systematic Botany in Australia* (P.S. Short, ed.): 259-264. Australian Botany Society, South Yarra. 1990.

PASCHOLATI, S.F. **Fitopatógenos: arsenal enzimático.** In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds). Manual de Fitopatologia – Princípios e Conceitos. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres. V.1, p. 343-64. 1995.

PANDEY, A .; NIGAM, P; SOCCOI, C.R; SOCCOI, V.T.; SINGH, D; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31: 131-152. 2000.

PANSHIN, A.J. & ZEEUW,C.**Textbook of wood technology.** New York: McGraw Hill Book Company Ltd. 1980.

PETTERSEN, R.C. The chemical composition of wood. In: Roger M. Rowell (ed). The Chemistry of Solid Wood. Advances in Chemistry Serie 207. Washington DC: American Chemicam Society. 1984.

PITSON, S. M.; SEVIOUR, R.J.; MCDUGALL, B.M.; STONE, B.; & SADEK, M. **Purification and characterization of na extracellular (1-6)- β -glucanase from the filamentous fungus Acremonium persicium.** *Biochem. J.* , Vol. 316, p. 841-846, 1996.

PRESTON, R.D. **The physical biology of plant cell walls.** London: Chapman & Hall Ltd. 1974.

PUTZKE, Jair. **Os reinos dos fungos.** Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2002. v.1 e v.2.

REIS, T.A.F.C. *et al.* **Avaliação do potencial biotecnológico de xilanases do Clostridium thermocellum e Cellvibrio mixtus : sua utilização na suplementação de dietas à base de trigo para frangos.** Revista Port. De Ciências Veterinárias. 2001.

RODWEL. et alli **Bioquímica de Harper**, 13ª ed., s.d. 1985.

ROBSON, L.; CHAMBLISS, G.: **Cellulases of bacterial origin**. *Enzyme Microb. Techn.*, v.11, p.626, 1989.

ROGER, J.C; NAKAS, J.P. **Interrelation of Xylanase Induction and Cellulase Induction of *Trichoderma longibrachiatum***. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2535-2539. 1990.

SARKANEN, K.V. & LUDWING, C.H. ed. **Lignins: occurrence, formation, structure and reactions**. New York, Wiley – Interscience, 1971, 916p.

SCOTT, D.; HAMMER, F.E; SZALKUCKI, T. IN: **Bioconversions: Enzyme technology in Food Biotechnology**. D. Knorr (ed.). New York: Marcel Dekker. p. 413. 1987.

SIAU, J.F. **Transport processes in wood**. Berlin, Springer-Verlag. 245p. (Springer Series in Wood Science). 1984.

SJOSTROM, E. **Wood Chemistry: fundamentals and applications**. New York, Academic Press. 223p. 1981.

SILVEIRA, F.Q.P. **Purificação e caracterização de uma xilanase termoestável de *Trichoderma harzianum***. Brasília: UNB, 1997. Dissertação, Universidade Nacional de Brasília, 1997.

SILVEIRA, Verlande Duarte. **Micologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: ed. Interamericana, 1981.

SMITH, D.; WALLER, J.M. **Culture collections of microorganisms: their importance in tropical plant pathology**. *Fitopatologia Brasileira* 17: 1-8. 1992.

TAN, L. U. L. et al **Purificación and Characterization of a Thermostable Xylanase from a Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus***. *Canadian Journal Microbiology* 33:689-694.1987.

TANAKA, A .;TOSA, T.; KOBAYASHI, T (eds.). **Industrial Applications of Immobilized Enzymes**. Marcel Dekker, New York. 1993.

TIMELL, T.E. **Wood hemicelluloses**. Part II. *Adv.Carb. Chem. Biochem.* 20: 409-469. 1964.

THIEMANN, J.E.; XAVIER, M.S.S.P.; COLEN, G.; GUIA, M.M. **Produção de celulases e hidrólise enzimática de resíduos celulolíticos**. In: FERMENTAÇÕES INDUSTRIAIS E TRANSFORMAÇÕES MICROBIANAS NO SOLO. Sociedade Brasileira de Microbiologia. p. 168-85. 1980.

TODA,S.; SUZUKI,H.; NISIZAWA, K. **Some Ezymatic Properties and the Substrate Specifications of *Trichoderma* cellulases with special reference to their activity towards xylan.** J. Ferment. Technol. 49: 499-521. 1971.

TRABULSI, L.R. **Microbiologia.** 2^a ed. Editora Atheneu. São Paulo. SP. 1998.

UHLIG, H. **Industrial Enzymes and Their Applications.** New York: John Wiley & Sons, Inc. p454. 1998.

VAN DER HEIJDEN, M.G.A. et al. **Mycorrhizal fungal diversity determines planr biodiversity, ecosystem variability and productivity.** Nature 396: 69-72. 1998).

VANDEVIVERE, P.; VERSTRAETE, W. **Environmental applications. IN: Basic Biotechnology,** eds Colin Ratledge e Bjorn Kristiansen, Cambrige University Press, 531 – 557 pp Cambridge, United Kingdom. 2001.

VIKARI, L. et al. **Charactrization of pulps treated with hemicellulolitic enzymes prior to bleaching. Biotech.** In: Pulp and Paper Manufacture. Applications and productivity. Nature. 1990.

WAINWRIGHT,M. Novel uses for fungi in biotechnology. Chemistry & Industry: 31 – 34. 1990.

WENZEL, H.F.J. **The Chemical Technology of Wood.** New York: Academic Press. 1970.

WILCOX, W.W. **Changes in wood microstructure through pregressive stages of decay.** USDA Forest Service. Research Paper FPL 70. 1968. 72p.

WHISTLER, R.L. & RICHARDDS, E.L.**Hemicelluloses.** In: W. Pigman; D. Horton. The Carbohydrates and Biochemistry. New York: Wiley-Interscience Publication, 1970.

WONG, K.K.Y.; SADDLER, J.N. In: M.P. Coughlan & G.P. Hazlewood (eds.) **Hemicellulose & Hemicellulases.** Page 127-139. London: Portand Press. 1993.

WONG, K.K.Y.; TAN, L.V.L.; SADDLER, J.N . **Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: Functions and Applications.** Microbial Rev. 52:305-317. 1988.

WOOD, T.M. **Properties of cellulolytic enzyme systems.** In: GOUCHLAM, M.P. (Ed) Cellulose: production, properties and application. Meeting Galway: Society Hast Colloquium. 611p. 1985.

WOODWARD, J.; WISEMAN, A . Fgal and Other β -glucosidases: their Properties and Applications. **Enzyme Microbiol. Technol.** 4: 73-79. 1982.