



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

Identificação de fungos produtores de enzimas extracelulares de interesse biotecnológico associados às formigas cortadeiras *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758)

MICHEL NASSER CORRÊA LIMA CHAMY

**COARI, AMAZONAS
2017**

MICHEL NASSER CORRÊA LIMA CHAMY

Identificação de fungos produtores de enzimas extracelulares de interesse biotecnológico associados às formigas cortadeiras *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758)

Orientador: Prof. Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Adriana Dantas Gonzaga

Dissertação apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, na área de concentração “Biotecnologias para a Área Agroflorestal”, como parte do requisito para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

**COARI, AMAZONAS
2017**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C453i Chamy, Michel Nasser Corrêa Lima
Identificação de fungos produtores de enzimas extracelulares de interesse biotecnológico associados às formigas cortadeiras *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758) / Michel Nasser Corrêa Lima Chamy. 2017
72 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Carlos Gustavo Nunes da Silva
Coorientadora: Adriana Dantas Gonzaga
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Amilase. 2. Lipase. 3. Celulase. 4. Protease. 5. Fungos. I. Silva, Carlos Gustavo Nunes da II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

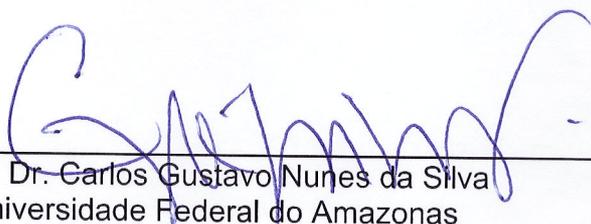
MICHEL NASSER CORREA LIMA CHAMY

Identificação de fungos produtores de enzimas extracelulares de interesse biotecnológico associados às formigas cortadeiras *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758)

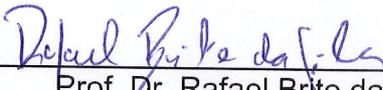
“Dissertação apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, na área de concentração “Biotecnologias para a Área Agroflorestal”, como parte do requisito para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia”.

Parecer: Aprovado em 28 de julho de 2017.

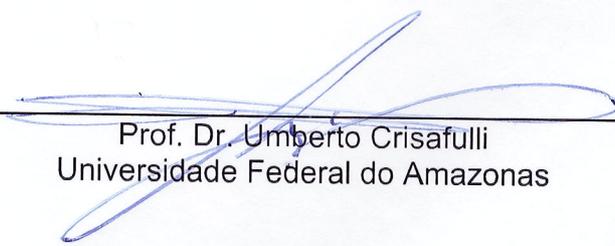
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva
Universidade Federal do Amazonas



Prof. Dr. Rafael Brito da Silva
Universidade Federal do Amazonas



Prof. Dr. Umberto Crisafulli
Universidade Federal do Amazonas

Dedico a minha esposa e filha, Patrícia dos Santos Guimarães e Alice Santos Chamy

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela força e suporte na tomada de decisões.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva e Profa. Dra. Adriana Dantas Gonzaga pelas orientações.

Aos professores Dr. Spartaco Astolfi Filho e Dra. Maria Francisca Teixeira Simas pelo suporte na realização deste projeto.

Aos membros da banca Prof. Dr. Rafael Brito da Silva e Prof. Dr. Umberto Crisafulli.

A todos os professores do Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas pelos ensinamentos.

Aos colegas do Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas que acompanharam essa jornada.

Ao Instituto de Saúde e Biotecnologia pelo apoio.

Aos amigos Uátyla Lima, Ricardo Brito e Rafael Pinto que estão comigo nessa jornada pioneira da Biotecnologia no município de Coari desde o curso de graduação.

A minha Avó Simonete, por sempre me acolher em sua casa em Manaus.

Aos meus pais e irmã, que estão comigo desde o início da minha vida acadêmica e sempre me incentivaram, amo vocês.

A minha amada esposa Patrícia Guimarães, que foi meu alicerce durante esse percurso, sempre prestativa e compreensiva, dando-me muito apoio nos momentos necessários, te amo.

A minha filha Alice Chamy, que foi responsável pela minha higiene mental durante todo esse percurso, te amo.

A todos, muito obrigado!!!!

A habilidade de alcançar a vitória mudando e adaptando-se de acordo com o inimigo é chamada de genialidade.

Sun Tzu

RESUMO

A relação mutualista entre as attines e micro-organismos apesar de muito estudada ainda não está completamente elucidada. O que se sabe é que as formigas da tribo Attini contêm pelo menos quatro micro-organismos associados e vários outros parasitas. Tendo em vista que, atualmente as enzimas de origem microbiana são as mais utilizadas em processos industriais e biotecnológicos, o presente trabalho tem por objetivo identificar fungos associados as formigas cortadeiras *Atta sexdens* produtores de enzimas de interesse biotecnológico, visando avaliar a produção extracelular dessas biomoléculas com atividade catalítica. As formigas cortadeiras foram coletadas no CAPMEDSOL/Coari-AM. Foram isolados 29 fungos e após triagem enzimática, os fungos mais promissores submetidos a análises morfológicas e moleculares. Os fungos com resultados mais expressivos foram: *Aspergillus zonatus* – I=4,4 (amilase), *Aspergillus aculeatus* – I=4,8 (lipase), *Rhizomucor variabilis* – I=5,33 (celulase) e *Penicillium citrinum* – I=5,46 (protease). Após a triagem, o melhor produtor de proteases foi submetido a quantificação e caracterização enzimática usando como substrato a azocaseína. O extrato enzimático bruto do fungo *Penicillium citrinum* apresentou melhor atividade enzimática em pH neutro (7,0) com temperatura de 40°C, com atividade catalítica equivalente a 326 U/mL. A curva de crescimento microbiana mostrou que o tempo ideal de fermentação foi 72 h.

Palavras-chave: Amilase, Lipase, Celulase, Protease, Fungos.

ABSTRACT

The mutualist relationship between the attines and microorganisms, although much studied, has not yet been fully elucidated. What is known is that the ants of the Attini tribe contain at least four associated microorganisms and several other parasites. Considering that microbial enzymes are currently the most used in industrial and biotechnological processes, the present work has the objective of identifying fungi associated with cutter ants *Atta sexdens* producing enzymes of biotechnological interest, aiming to evaluate the extracellular production of these biomolecules with catalytic activity. Cutting ants were collected in CAPMEDSOL / Coari-AM. Twenty - nine fungi were isolated and, after enzymatic screening, the most promising fungi submitted to morphological and molecular analyzes. The most expressive fungi were: *Aspergillus zonatus* - I = 4,4 (amylase), *Aspergillus aculeatus* - I = 4,8 (lipase), *Rhizomucor variabilis* - I = 5,33 (cellulase) and *Penicillium citrinum* - I = 5 , 46 (protease). After sorting, the best protease producer was subjected to quantification and enzymatic characterization using azocasein as the substrate. The crude enzymatic extract of the fungus *Penicillium citrinum* presented better enzymatic activity at neutral pH (7.0) with a temperature of 40 ° C, with catalytic activity equivalent to 326 U / mL. The microbial growth curve showed that the ideal fermentation time was 72 h.

Key words: Amylase, Lipase, Cellulase, Protease, Fungi.

Índice de figuras

Figura 1 - Localização da coleta dos insetos (CAPMEDSOL).....	33
Figura 2 - Resultados dos testes qualitativos.....	43
Figura 3 - Influência do pH na atividade proteásica.....	47
Figura 4 - Influência da temperatura na atividade proteásica.....	49
Figura 5 - Curva de crescimento microbiano/produção de proteases.....	50
Figura 6 - Gênero <i>Aspergillus</i> (A e B); gênero <i>Rhizomucor</i> (C); gênero <i>Penicillium</i> (D).....	51
Figura 7 - Identificação morfológica dos fungos.....	52
Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose da extração do DNA cromossomal.....	53
Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose da PCR.....	54

Índice de tabelas

Tabela 1 - Enzimas comerciais obtidas por fungos.....	23
Tabela 2 - Meios de cultivo para determinação de atividade enzimática pelo método cup-plate.....	36
Tabela 3 - Protocolo utilizado para amplificação por PCR.....	39
Tabela 4 - Fungos filamentosos isolados por parte de inseto.....	41
Tabela 5 - Quantificação de DNA cromossomal.....	53
Tabela 6 - Quantificação da PCR.....	54
Tabela 7 - Identificação molecular dos fungos.....	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1 Formigas Cortadeiras.....	15
3.2 O gênero <i>Atta</i>	16
3.3 Micro-organismos associados a formigas cortadeiras.....	18
3.4 Fungos filamentosos parasitas de formigas cortadeiras.....	20
3.5 Produção de enzimas por fungos.....	22
3.6 Enzimas de interesse biotecnológico.....	24
3.7 Amilases.....	27
3.8 Lipases.....	28
3.9 Proteases.....	29
3.10 Celulases.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.2 Isolamento dos fungos.....	34
4.3 Conservação dos micro-organismos.....	34
4.4 Determinação da atividade enzimática em meio sólido: meio para o crescimento microbiano e indução da atividade enzimática.....	34
4.5 Condições de fermentação em meio líquido e recuperação do extrato bruto.....	35
4.6 Avaliação da atividade enzimática através do método <i>cup-plate</i>	35
4.7 Revelação da atividade enzimática.....	36
4.8 Quantificação e avaliação da influência do pH e temperatura na atividade proteásica.....	37
4.9 Curva de crescimento.....	38
4.10 Identificação morfológica.....	38
4.11 Identificação molecular dos micro-organismos.....	38
4.11.1 Extração do DNA.....	38
4.11.2 Quantificação do DNA.....	39
4.11.3 PCR para o Sequenciamento.....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1 Avaliação qualitativa da produção de enzimas extracelulares.....	42
5.2 Análise quantitativa da produção de proteases.....	45
5.3 Avaliação da influência do pH na atividade proteolítica.....	46
5.4 Avaliação da influência da temperatura na atividade proteolítica.....	48
5.5 Curva de crescimento.....	49
5.6 Identificação morfológica e molecular.....	51
5.7 PCR para o sequenciamento.....	53
6 CONCLUSÕES.....	57
7 PERSPECTIVAS.....	58
REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras (Formicidae: Myrmicinae, Attini), conhecidas também como formigas cultivadoras de fungo ou saúvas, estão entre os insetos mais importantes e conhecidos dentro da família Formicidae. Sua importância está associada aos danos econômicos causados na agricultura e silvicultura, uma vez que apresentam hábitos alimentares de cortar folhas e flores frescas para alimentar seu fungo simbiote, que por sua vez é responsável por degradar os polissacarídeos vegetais em açúcares solúveis (BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES; SANHUDO, 2011; MOREIRA; ERTHAL JR.; SAMUELS, 2011).

Contudo, a importância dessas formigas não se restringe apenas aos danos causados por elas. Muitos estudos demonstram que formigas da tribo Attini podem trazer inúmeros benefícios ecológicos tais como: aumento da fertilidade do solo, alteração das propriedades físicas do solo e, principalmente na ciclagem de nutrientes. Além disso, seus ninhos representam também fonte extra de recursos minerais para a vegetação, de regiões que apresentam solos pobres em nutrientes, além de serem ótimas dispersoras secundárias de sementes (FARJI-BRENER; ILLES, 2000; SOUTO, 2007; CARVALHO, 2008; PETERNELLI et al., 2003).

A relação mutualista entre as attines e micro-organismos apesar de muito estudada ainda não está completamente elucidada. Até hoje sabe-se que as formigas da tribo Attini contêm pelo menos quatro micro-organismos associados: o fungo que elas cultivam *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer (Basidiomycota: Agaricales: Lepiotaceae) (DORNELAS, 2016); o fungo parasita do gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales) (CUSTODIO, 2016); a bactéria *Pseudonocardia* (Actinomycetes: Actinomycetales) e outras bactérias filamentosas (SEN et al., 2009); e a levedura negra do gênero *Phialophora* (Ascomycota: Chaetothyriales) (DUARTE, 2014; TOLEDO, 2016), contudo demonstrar a presença de novos micro-organismos é de grande interesse tanto para o entendimento da associação mutualista quanto para estudos voltados para o potencial desses micro-organismos em produzir enzimas de interesse biotecnológico (PAGNOCCA; RODRIGUES; BACCI JR., 2011).

Silva (2000), ao utilizar análises enzimáticas, conclui que o fungo contribui como uma fonte nutricional, bem como, produzindo enzimas necessárias para a manutenção das formigas, caracterizando, assim, uma relação mutualística. Tal associação se justifica também pela capacidade metabólica do fungo de converter celulose e outros polímeros vegetais em produtos que poderiam ser metabolizados pelas formigas.

Bon e colaboradores (2008), descrevem as enzimas como sendo as biomoléculas mais importantes produzidas por micro-organismos e quando comparadas com as fontes tradicionais (animais e vegetais) elas apresentam várias vantagens como: rendimento relativamente alto, eficiência de custo e susceptibilidade a manipulação genética, possibilitando o isolamento de genes e utilização via tecnologia do DNA recombinante visando a expressão heteróloga desses genes em outros micro-organismos hospedeiros.

O uso de enzimas como catalisadores de processos industriais e biotecnológicos é de fundamental importância para obtenção de produtos de maior valor agregado, por tecnologias limpas e em sintonia com as necessidades tecnológicas, de mercado e de preservação ambiental.

Com isso, podem ser empregadas em vários ramos da bioindústria, desde os setores de produtos de limpeza até indústria de alimentos e bebidas. Entre as enzimas mais demandadas, podemos destacar as proteases, lipases, celulasas e amilases, sendo as amilases responsável por 15% do mercado de enzimas nacional (BON; FERRARA; CORVO, 2008). As mais expressivas, no entanto, são as proteases, devido à ampla versatilidade de aplicação na indústria de detergentes, farmacêutica e de alimentos representando cerca de 60% deste mercado (HASAN et al., 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Identificar fungos produtores de enzimas de interesse biotecnológico associados às formigas cortadeiras *Atta sexdens*.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar fungos associados a *Atta sexdens*;
- Avaliar qualitativamente a produção de amilases, lipases, celulasas e proteases extracelulares dos micro-organismos associados as formigas cortadeiras;
- Quantificar a produção de proteases;
- Caracterizar as proteases quanto ao pH e temperatura;
- Identificar os fungos com resultados mais expressivos para cada enzima.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Formigas Cortadeiras

Cultivar o próprio alimento não é exclusividade dos seres humanos. Há 50 milhões de anos, antes que surgissem os primeiros povos agricultores, um grupo de formigas cortadeiras da subfamília Myrmicinae desenvolveu sua própria versão de agricultura (SCHULTZ; BRANDY, 2008; DELLA LUCIA; SOUZA, 2011). A expressão “formigas cortadeiras” refere-se ao hábito destes insetos (saúvas e quenquéns), de cortar e transportar partes de plantas para o interior de suas colônias, onde cultivam um fungo do qual se alimentam (DELLA LUCIA; VILELA, 1993).

As formigas pertencem a família Formicidae das quais estão divididas em 16 subfamílias com 296 gêneros descritos, 12.027 espécies catalogadas e 408 fosseis registrados, além disso estima-se que existam cerca de 20.000 espécies em todo o planeta das quais cerca de 10% são encontradas no Brasil (SILVEIRA et al., 2014).

As formigas cortadeiras possuem uma organização social considerada entre as mais complexas, mesmo se comparado com outros insetos eussociais. Isso está relacionado ao polimorfismo acentuado entre os insetos da colônia, o que faz com que as mesmas se organizem em grupos de indivíduos morfologicamente diferentes de acordo com o trabalho ou função (LATREILLE, 1798; WILSON, 1971; SOUZA; SANTOS; DELLA LUCIA; SOUZA, 2011; BONASIO et al., 2010).

Uma das características marcantes desse grupo é o hábito de cultivarem um fungo e se alimentarem dele (MUELLER, 2002). Somente as formigas do gênero *Atta* e *Acromyrmex*, são conhecidas como cortadeiras de folhas, pois cultivam seus fungos simbiotes sobre material vegetal coletado, geralmente fresco, que é transportado em pequenos fragmentos pelas formigas operárias para o ninho, onde é utilizado como substrato para o crescimento do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (Lepiotacea: Agaricales: Basidiomycota) que é usado como alimento e fonte de enzimas auxiliares no processo digestivo das formigas (MUELLER et al., 2001; SILVA-PINHATI et al., 2004; HOLLDOBLER; WILSON, 2009; MOREIRA; ERTHAL JR.; SAMUELS, 2011).

O sucesso da associação entre formigas cortadeiras e o *L. gongylophorus* provavelmente ocorre porque o fungo apresenta características favoráveis para gerar a grande quantidade de alimento necessário para sustentar um ninho que, muitas vezes, pode conter um número elevado de consumidores (WEBER, 1972). Nesse sentido, a habilidade metabólica do fungo é traduzida pela sua capacidade em degradar polissacarídeos vegetais, como celulose, amido, xilana e pectina (MARTIN; WEBER, 1969; MARTIN, 1970; MARTIN et al., 1975; DE SIQUEIRA et al., 1998; SILVA et al., 2006). Essa característica permite ao fungo acumular em suas hifas compostos solúveis que são importantes para a nutrição tanto de larvas quanto de adultos (MARICONI, 1970; QUINLAN; CHERRETT, 1979).

Fungo e formiga se beneficiam desta associação mutualística, onde o fungo é utilizado na dieta das formigas, que em retribuição fornecem substrato para o seu crescimento, proteção contra parasitas ou competidores e asseguram a sua reprodução ao ser transferido verticalmente pelas rainhas de seus ninhos de origem para os ninhos descendentes (WEBER, 1972).

As formigas cortadeiras apresentam grande importância econômica, pois desfolham várias espécies vegetais, sendo algumas cultivadas pelo homem (PEREIRA; SANTOS, 2008). Dentre as espécies de interesse econômico que são predadas por essas formigas estão o Eucalipto e a cana de açúcar (DELLA LUCIA; SOUZA, 2011; MATRANGOLO et al., 2010).

Os demais gêneros formigas (Formicidae:Myrmicinae) cultivadoras de fungos constroem seus ninhos superficiais, entre folhas na serapilheira, sob pedras, em troncos em decomposição, na vegetação ou no solo (DE FINE LICHT et al., 2010). Como é o caso das operárias do gênero *Cyphomyrmex* (Myrmicinae Attini) que forrageiam na serapilheira em busca de carcaças de pequenos insetos e excrementos de lagartas para utilização como substrato nos jardins de fungo. Outras tem hábitos crípticos como é o caso das *Acanthognathus* (Myrmicinae Attini) (BACCARO et al., 2015).

3.2 O gênero *Atta*

As formigas do gênero *Atta* são as mais derivadas da tribo Attini, sendo as

mais estudadas da tribo, ocorrendo exclusivamente nas Américas (MEHDIABADI; SCHULTZ, 2009). Essas formigas vivem em formigueiros formados por dezenas ou centenas de câmaras subterrâneas (panelas) interligadas entre si e com a superfície do solo, por meio de galerias (DELLA LUCIA; VILELA, 1993). As novas colônias são formadas após as revoadas que acontecem anualmente nos sauveiros adultos (após 38 meses da fundação), em razão da liberação de um grande número de formigas sexuadas aladas (içás e bitus) (AUTUORI, 1950).

As içás, ou futuras rainhas, são fecundadas em pleno vôo e descem ao solo para fundar os novos sauveiros. Porém, antes das revoadas, ocorre o período conhecido como 'pré-revoada', que se inicia de uma a cinco semanas antes e termina assim que as içás e os bitus (machos) iniciam o vôo nupcial. A "pré-revoada" é caracterizada pelo aspecto dos olheiros (entrada do formigueiro na superfície), que se apresentam limpos, abertos e com contornos bem delineados, além do alargamento dos canais abaixo dos olheiros (orifícios por onde as formigas tem acesso ao interior do ninho); e também pelo alvoroço das operárias fora do ninho e o aumento da agilidade e agressividade dos soldados. Esse comportamento é importante não só para a defesa dos alados como para a eliminação de rainhas que tentam se estabelecer muito próximas à colônia mãe (AUTUORI, 1947).

Cada içá inicia a escavação de um pequeno canal, retirando a terra da superfície do solo com a ajuda das mandíbulas. Terminando o canal, a içá inicia a construção da primeira câmara, cuja terra é aproveitada para obstruir todo o canal de entrada, permanecendo a saúva enterrada na "panela". A formação do sauveiro inicial é perfeitamente percebida devido à presença de pelotinhas de terra em volta do local de penetração da içá, entretanto, basta uma leve chuva para desmanchá-las, tornando assim difícil ou impossível a posterior localização de um sauveiro inicial (AUTUORI, 1942).

Terminado o trabalho de escavação, a saúva regurgita o fungo, que será cultivado primeiramente pela rainha que constantemente umidifica esses fragmentos por lambedura e pela deposição de gotas de fluido fecal sobre o mesmo (DELLA LUCIA et al., 1995).

3.3 Micro-organismos associados a formigas cortadeiras

Dentre os seres vivos na terra, um dos táxons mais abundantes e diversos do planeta é dos insetos, provavelmente devido a sua capacidade de se adaptar e prosperar em uma ampla variedade de nichos ecológicos. Provavelmente, um dos facilitadores dessa bem-sucedida “invasão” são seus micro-organismos simbiotes (DOUGLAS, 2015).

Os principais papéis atribuídos a esses micro-organismos são: auxiliar na digestão e desintoxicação de alimentos; fornecer nutrientes essenciais; contribuir para a higiene dos ninhos; além de desempenhar funções importantes na defesa contra patógenos e parasitas (KELLNER, 2015).

Nos insetos eussociais, como é o caso das formigas cortadeiras, essa associação mutualista fica mais complexa, pois a vida em grupo pode aumentar o risco de propagação de doenças, além disso, as formigas cultivadoras de fungos tem que defender não só a sua espécie, mas também seu fungo simbiote de onde a mesma obtém sua principal fonte de alimentação e que é constantemente atacada por organismos concorrentes (KONRAD, 2012).

Entre os micro-organismos associados às formigas cortadeiras, certamente o mais importante e estudado são os fungos pertencentes à ordem Agaricales (Basidiomycota), caracterizados pela produção de corpos de frutificação (cogumelos). No entanto, os cogumelos raramente ocorrem em ninhos de atíneos, pois as formigas suprimem as frutificações e rompem as conexões das hifas (WEBER, 1972). A maioria das formigas cultiva fungos pertencentes aos gêneros *Leucoagaricus* e *Leucocoprinus*, da tribo Leucocoprineae, família Lepiotaceae.

A única exceção são as formigas da espécie *Atta pilosum*, que cultivam um fungo pertencente à família Pterulaceae (SCHULTZ, BRADY, 2008). Esse fungo além de ser fator vital para as formigas cortadeiras, apresenta potencial biotecnológico pois produz várias despolimerases as quais promovem a degradação extracelular dos polissacarídeos foliares em carboidratos solúveis (SILVA et al., 2003; SILVA et al., 2006).

O mutualismo entre fungo e formigas vai além destes dois organismos, sendo muito mais complexo do que se supunha inicialmente, pois micro-organismos

adicionais foram identificados em ninhos de atíneos. As formigas da tribo Attini contém pelo menos mais três micro-organismos associados, dentre eles está o fungo anamórfico *Escovopsis* sp. do gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales), parasitas especializados dos jardins de fungos de quase todos os gêneros desta tribo (RODRIGUES et al., 2008). São fungos de crescimento rápido que ocasionam infecções persistentes, causando diminuição da taxa de crescimento do jardim de fungos.

Estudos demonstraram que em ninhos jovens de *A. sexdens* mantidos em condições de laboratório, o desenvolvimento micelial de *Escovopsis* sp. pode ocupar todo espaço disponível na câmara de fungos em cerca de 72 horas (PAGNOCCA; RODRIGUES; BACCI JR., 2011). Não se sabe a forma de transmissão desses fungos, mas, Currie e Colaboradores (1999), sugerem que seja através de outros artrópodes que visitam ou habitam o ninho como por exemplo, ácaros.

Outro micro-organismo que vive associado a essas formigas, mais especificamente aderidas a propleura ou no mesossoma, são as bactérias filamentosas (actinobactérias) do gênero *Pseudonocardia* (Família: Pseudonocardiaceae) (CAFARO; CURRIE, 2005). Esses simbiossomas bacterianos são os mais estudados nas formigas Attine devido ao seu potencial para produzir antibióticos contra uma diversidade de micro-organismos (MUELLER et al., 2010).

As bactérias do gênero *Pseudonocardia* e outras bactérias isoladas do exoesqueleto das formigas da tribo Attini podem apresentar atividade contra o próprio fungo simbiote, assim como serem antagonistas ao fungo parasita *Escovopsis*, como é o caso de algumas linhagens de actinomicetos (*Streptomyces* spp.) (SEN et al., 2009; KOST et al., 2007). Em estudo realizado por Ribeiro (2000), dezoito espécies de bactérias foram isoladas de ninhos de *A. sexdens* entre as quais estavam representantes dos gêneros *Bacillus*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Citrobacter*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus* e *Pantoe*. Ainda em seu estudo, o autor comprovou que muitas dessas espécies produziram *in vitro* enzimas hidrolíticas, o que demonstra que esses ninhos são ocupados também por bactérias não filamentosas.

Além dos micro-organismos citados acima, a relação mutualista das formigas-cortadeiras se estende ainda às leveduras. Os primeiros a relatarem tal associação foram Craven e Colaboradores na década de 70. Estudos realizados por Pagnocca; Rodrigues; Bacci Jr., 2011 identificaram leveduras basidiomicetas vivendo associado aos ninhos de attines, especialmente as do gênero *Trichosporon* e *Cryptococcus*. Recentemente, pesquisadores isolaram uma levedura negra (*black yeast*) relacionada ao gênero *Phialophora* (Ascomycota) vivendo associados as bactérias *Pseudonocardia* sp. na cutícula das formigas (RODRIGUES et al., 2014).

3.4 Fungos filamentosos parasitas de formigas cortadeiras

A maioria dos ninhos de formigas está localizado no solo, dentre eles os attíneos são considerados os mais sofisticados da natureza, pois, apresentam uma arquitetura que recebe considerável atenção, além de desempenharem funções importantes para sobrevivência do ninho, tais como: proteger seus descendentes e a rainha de inimigos naturais, controle da distribuição de alimentos além do controle do microclima os quais são importantes para regulação de temperatura, umidade e concentração de gases (NICKELE et al., 2013)

Além do *Escovopsis* sp., uma grande diversidade de microfungos, normalmente encontrada em vários habitats, especialmente no solo, e que pode ocorrer também nos jardins de fungos e nas câmaras de lixo das formigas cortadeiras (PAGNOCCA; RODRIGUES; BACCI JR, 2011).

O solo como um ambiente rico em micro-organismos, os quais são fundamentais para a manutenção dos ecossistemas e da cadeia alimentar. Assim, considerar-se que, evolutivamente, organismos com diversidade genética restrita são mais suscetíveis à exploração por vários parasitas. Este pode ser o caso das formigas attini, pois, uma vez que o ninho proporciona um microambiente propício para o cultivo do seu fungo simbiote, espera-se que fungos parasitas explorem esse ambiente (PAGNOCCA; MASIULIONIS; RODRIGUES, 2012). Além disso, o substrato que é favorável para o crescimento do fungo mutualista, também é para o desenvolvimento de outros micro-organismos (CARLOS et al., 2011).

Devido a essas condições, uma gama de fungos filamentosos tem sido encontrada vivendo associado as formigas cortadeiras (operárias, rainhas) e seu jardim de fungos (PAGNOCCA; RODRIGUES; BACCI JR, 2011; (PAGNOCCA; MASIULIONIS; RODRIGUES, 2012), que, sua grande maioria é fungo de solo (*Mucor*, *Arthrobotrys*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Syncephalastrum*, *Syncephalastrum*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*) (CARLOS et al., 2011; HUGHES et al., 2004; PAGNOCCA et al., 2008; RIBEIRO et al., 2012; RODRIGUES et al., 2005).

Acreditava-se que esses fungos eram contaminantes cujos esporos eram carregados pelo ar e encontravam na esponja um ambiente favorável ao crescimento, no entanto, muitos desses realmente pertencem aos ninhos (RODRIGUES, 2004).

A princípio, todos esses fungos não estariam presentes na forma micelial, somente em conídios, e só no caso de haver um desequilíbrio no ninho, alguns se tornem oportunistas como é o caso dos fungos entomopatogênicos facultativos, ou seja, podem ou não utilizar insetos como hospedeiros em alguma fase da vida (HUGHES et al., 2004).

Os fungos entomopatogênicos do gênero *Metarhizium* e *Beauveria*, estão entre os mais estudados, pois são considerados patógenos virulentos e generalistas que se estabelecem infectando uma grande variedade de insetos não sociais e sociais como é o caso das Atines (JACCOUD; HUGHES; JACKSON, 1999). Ambos os gêneros são assassinos obrigatórios, reproduzindo-se paralelamente a morte de seus hospedeiros e geralmente estão associados a insetos terrestres, sendo os mais suscetíveis a contaminação aqueles que constroem ninhos no solo (AUGUSTIN, 2011).

Outros microfungos de considerável interesse para o estudo do mutualismo das formigas cortadeiras são os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Trichoderma*. São comumente encontrados em diversos tipos de solos de regiões tropicais e subtropicais, especialmente naqueles ricos em matéria orgânica (AUGUSTIN, 2011). Algumas espécies como *A. flavus* e *F. oxysporum* foram isolados de operárias vivas, moribundas, assim como no depósito de lixo e vivendo associado

ao jardim de fungos, como é o caso do *Trichoderma* sp. (HUGHES et al., 2004; RODRIGUES et al., 2005).

Essas observações indicam parasitas generalistas, sem preferência pelo fungo ou formiga, comprovando que grande parte da diversidade encontrada de alguma forma em associação com as formigas cortadeiras é composta por fungos de solo que atuam principalmente como saprófitos ou mutualista. Segundo Augustin (2011), ainda não tem dados que comprovem a ação antagônica desses fungos ante ao fungo simbiote das attini, assim é possível especular que: 1) sejam simbioses dessas formigas, agindo como parasitas ou mutualistas ainda desconhecidos; 2) sejam simplesmente comensais ou inquilinos da colônia, sem causar-lhe prejuízos ou benefícios; e ou, 3) que as colônias se contaminem acidentalmente a partir do contato direto com o solo ou material vegetal que as operárias trazem para dentro do ninho.

3.5 Produção de enzimas por fungos

A produção de enzimas é uma área da biotecnologia que está em constante expansão e movimenta milhares de dólares anualmente graças a grande diversidade natural desses compostos, e também devido a disponibilidade de técnicas que extraem de maneira simples e com baixo custo, das mais diversas espécies de seres vivos (SANTOS et al., 2016).

Embora alguns biocatalizadores sejam extraídos de tecidos animais (pancreatina, tripsina, pepsina, renina) e vegetais (papaína, bromelina, ficina, malte), as enzimas industriais são, na sua maioria obtidas a partir de micro-organismos, e entre eles os fungos estão em destaque (CORTEZ; CASTRO; ANDRADEB, 2017; ORLANDELLI et al., 2012). Como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 - Enzimas comerciais obtidas por fungos

Fungo Produtor	Enzimas Comerciais
<i>Aspergillus aculeatus</i>	β -glucanase, pectinase
<i>Aspergillus melleus</i>	protease
<i>Aspergillus niger</i>	aminopeptidase, α -amilase, α -galactosidase, catalase, celulase, fitase, β -glucanase, glucoamilase, hemicelulase, inulase, lipase, pectinase, protease, xilanase
<i>Aspergillus oryzae</i>	aminopeptidase, α -amilase, lactase, protease
<i>Aspergillus pulverulentus</i>	pectinase
<i>Chaetomium erraticum</i>	dextranase
<i>Chryphonectria parasítica</i>	protease aspártica
<i>Humicola insolens</i>	celulase, β -glucanase, xilanase
<i>Penicilium camembertii</i>	lipase
<i>Penicilium citrinum</i>	irotease
<i>Penicilium funiculosum</i>	pactinase, xilanase
<i>Penicilium lilacinum</i>	dextranase
<i>Penicilium roqueforti</i>	lipase
<i>Rhizopus delemar</i>	Glucoamilase
<i>Rhizopus niveus</i>	clucoamilase, protease
<i>Rhizopus oryzae</i>	aminopeptidase, glucoamilase, lipase
<i>Talaromyces emersonii</i>	β -glucanase
<i>Trichoderma reesei</i>	celulase, xilanase
<i>Trichoderma viride</i>	celulase

Fonte: Orlandelli et al., 2012

Na natureza, os fungos, principalmente aqueles encontrados no solo, são os principais produtores de enzimas responsáveis pelo o aproveitamento da matéria orgânica (NEVES; PORTO; TEIXEIRA, 2006). Tais micro-organismos, representam excelente fonte de enzimas para aplicações industriais em virtude dos menores tempos de geração para produção, da facilidade de manipulações genéticas, do aumento de escala e purificação, além de apresentarem alta estabilidade e especificidade (REINEHR; TREICHEL, 2016).

Segundo *Generally Recognized as Safe* (GRAS), um micro-organismo para ser utilizado na produção industrial de enzimas deve ser: 1) preferencialmente, seguro sob o ponto de vista biológico; 2) apresentar elevada capacidade de síntese e excreção da enzima; 3) suportar condições ambientais adversas relacionadas com a pressão osmótica, a temperatura e a força iônica do meio; e 4) ser tolerante à presença de substâncias tóxicas, que podem ser geradas no processo de tratamento da matéria-prima ou pelo próprio metabolismo celular (SEWALT et al.,

2016).

Dentre os processos utilizados para a produção enzimática, a fermentação submersa (FS) é a técnica majoritariamente utilizada, devido a facilidade de crescimento dos micro-organismos em condições controladas de pH e temperatura, além de tornar fácil a recuperação das enzimas extracelulares. Essa técnica também apresenta vantagens em relação as outras pois, podem ser facilmente ampliada em grande escala (industrial), já que garante a homogeneidade do meio e facilita o controle dos parâmetros do processo, principalmente se monitorados remotamente (ORLANDELLI et al., 2012).

Os fungos, dentre os micro-organismos, são fontes preferenciais de enzimas de aplicação industrial, pois geralmente, secretam uma variedade de enzimas extracelulares em resposta a estímulos ambientais, essa característica permite aos fungos colonizar um amplo espectro de tecidos vivos (como patógenos) ou mortos (como saprófitos) de plantas, animais, insetos, produtos de madeira, papel e solos em decomposição (COLEN, 2006) e também por serem considerados micro-organismos seguros para manipulação, além da expectativa de seu emprego como biocatalizadores na forma de células viva, simplificando e reduzindo os custos nos processos de *downstream* (RODRIGUES et al., 2016).

Vale a pena ressaltar também que as enzimas fúngicas excretadas são geralmente mais estáveis e produzidas em maiores quantidades.

3.6 Enzimas de interesse biotecnológico

As enzimas são catalizadores biológicos, sendo, em sua maioria, polímeros constituídos por aminoácidos ligados covalentemente por ligações peptídicas, com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA catalítico. Esses catalizadores atuam diminuindo a energia requerida para ativação de uma determinada reação, tornando, dessa maneira, mais rápida a obtenção do produto (NELSON; COX, 2014).

Podem ser divididas em seis classes, segundo as reações que catalisam: oxidorreduções (catalisam reações de óxido-reduções); transferases (catalisam reações de transferência de grupos de uma molécula a outra); hidrolases (catalisam

reações de hidrólise); liases (catalisam reações de quebra de ligações); isomerases (catalisam reações de mudança intramolecular, onde um substrato transforma-se em um produto isômero) e ligases (catalisam a ligação covalente de moléculas, com simultânea quebra de uma ligação de alta energia) (NELSON; COX, 2014)

A identificação das enzimas como proteínas com atividade catalítica permite compreender várias rotas ou vias metabólicas, cujo conjunto é denominado de metaboloma e nessa corrente de pensamento foi introduzido a ideia de que a ação enzimática envolve a etapa inicial de formação de um complexo enzima-substrato (VENTURA; FREITAS; FREIRE, 2008). Esse complexo é hoje considerado o princípio de todas as reações enzimáticas realizadas pelo metabolismo de qualquer ser vivo.

No início dos anos 1970, a tecnologia enzimática foi influenciada diretamente pelo desenvolvimento industrial, dirigindo-se a produção de aminoácidos. Atualmente verifica-se uma grande expansão da aplicação da tecnologia enzimática a muitos setores industriais e atualmente, as enzimas são os compostos mais importantes produzidos após os antibióticos (DE OLIVEIRA et al., 2006; BON et al., 2008; COELHO; ALICE; SALGADO, 2008).

As enzimas apresentam propriedades que tornam o seu uso altamente desejável como catalisadores (ORLANDELLI et al., 2012). São consideradas moléculas bastante ativas, versáteis e executam uma variedade de transformações de modo seletivo e rápido, em condições brandas, controladas e otimizadas de reação (BON, FERRARA; CORVO, 2008; BARATTO et al., 2012). Do ponto de vista industrial, as enzimas apresentam características notáveis, em relação aos catalisadores químicos, devido à sua especificidade tanto por dado substrato, quanto na promoção de apenas uma reação bioquímica, permitindo a síntese de um produto específico, sem contaminante ou formação de um co-produto (COELHO; ALICE; SALGADO, 2008).

Além disso, a atividade enzimática pode ser regulada de maneira simples e fácil, bastando modificar a natureza do meio de reação, adicionando algum efector ou alterando o pH (DZIEZAK, 1991; COLEN, 2006). Toda enzima, em razão da sua grande especificidade, catalisa as transformações moleculares sem ocorrência de reações paralelas indesejáveis que são comuns em sínteses químicas e segundo

Nelson e Cox (2014), alteram a velocidade da reação e sem alterar o equilíbrio fazendo com que os processos industriais que empregam essas biomoléculas sejam em geral, relativamente simples, fáceis de controlar, eficientes energeticamente e de investimentos de baixo custo.

Tradicionalmente, as enzimas mais estudadas são aquelas de origem animal ou vegetal, contudo as de origem microbiana apresentam grande potencial para a aplicação industrial, já que podem ser facilmente produzidas em larga escala, via fermentação. São também mais facilmente expressas (clonadas) em organismos de cultivo já estabelecido (SENA et al., 2006; GANDHI, 1997) e não estão sujeitas às limitações de produção ou de suprimento, sendo que a produção de enzimas microbianas é um dos principais setores atual da Biotecnologia Industrial.

A investigação e o desenvolvimento de enzimas com aplicações industriais e o seu espaço de mercado está subdividido em três segmentos: enzimas técnicas, destinadas principalmente aos setores de produtos de limpeza, têxtil, de couros, de álcool como combustível e de papel e celulose; enzimas para alimentos e bebidas; e enzimas para ração animal.

A aplicação das enzimas no mercado industrial está diretamente ligada a biotecnologia e essas aplicações visam o uso de novas matérias primas e a melhoria de processos e das características físico-químicas do produto. Do ponto de vista industrial, uma enzima comercialmente viável é aquela que garante a obtenção de um produto final de melhor qualidade que o produto tradicional; a melhoria do processo de produção, reduzindo custos laboratoriais; a produção de produtos disponíveis de forma reduzidas ou indisponíveis no mercado (ORLANDELLI et al., 2012).

Essas enzimas vêm sendo utilizada há muitos anos em diversos ramos e suas aplicações industriais que vão desde indústrias têxteis, passam pelo processamento de couro, envelhecimento de tecidos, papel e celulose, detergentes até tratamento de efluentes (ORLANDELLI et al., 2012). Dentre as principais enzimas industriais estão as proteases, amilases, lipases, celulases, xilanases e fitases, sendo que as proteases e amilases lideram o mercado respondendo por 60% e 15% do mercado, respectivamente (BON; FERRARA; CORVO, 2008; HASAN et al., 2014).

3.7 Amilases

O amido, depois da celulose, é o carboidrato mais abundante na natureza o mesmo é considerado a principal reserva de carboidrato das plantas, sendo encontrado em várias espécies tais como, trigo, milho, cevada, arroz, mandioca entre outros e segundo Zeoula e Colaboradores (1999), são encontrados em maiores quantidades em grão do que em raízes.

Esse carboidrato é constituído por uma mistura de polissacarídeos de massa molecular elevada, amilose e amilopectina que representa de 15% e 85% do polímero respectivamente (FERNANDES, 2007; BON; GÍRIO; PEREIRA JR., 2008), sendo a primeira um polímero linear constituído de cerca de 6000 resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo α -1,4, e a segunda, muito similar ao glicogênio (forma de armazenamento de açúcar nas células animais), é altamente ramificada contendo ligações α -1,4 entre os monômeros de glicose e do tipo α -1,6 unindo pequenas cadeias laterais de 15 a 45 resíduos de glicose (BULÉON, et al., 1998; MYERS et al., 2000).

As enzimas responsáveis pela degradação desse carboidrato são as amilases, essas enzimas são utilizadas pelas plantas, animais e micro-organismos procariotos e eucariotos que usam o amido como fonte de carbono (PEIXOTO et al., 2003).

As amilases podem ser divididas em duas categorias, quanto ao seu modelo de ação: as endoamilases que atacam a molécula a partir do interior da cadeia e as exoamilases que atacam a partir de suas extremidades (GUPTA et al., 2003). A ação das α -amilases, que pertencem ao primeiro grupo, dá origem a oligossacarídeos lineares e ramificados de diversos tamanhos, esta enzima é amplamente distribuída entre os micro-organismos. Já as exoamilases atacam o substrato a partir do terminal não redutor, em etapas sucessivas, resultando em produtos de baixa massa molecular, dentro desse grupo estão as β -amilase, glicoamilase e α -glicoamilase (GOMES et al., 2007; VAN DER MAAREL et al., 2002).

Amilases apresentam grande importância biotecnológica tais como aplicações nas indústrias têxteis (ANDREAUS; CAVACO-PAULO, 2008), papel e

celulose (DURAN et al., 2008), cervejas, bebidas destiladas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, ração animal (COURI et al., 2008), indústria química e farmacêutica (CRUZ et al, 2008; BON et al., 2008). Apesar de poderem ser derivadas de diversas fontes, incluindo plantas e animais, enzimas microbianas geralmente encontram grande demanda industrial. Atualmente, grandes quantidades de amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e têm aplicação quase completa na hidrólise do amido em indústrias de processamento do amido (GUPTA, et al., 2003; PANDEY, et al., 2005).

3.8 Lipases

As lipases (EC: 3.1.1.3) são enzimas que vêm se destacando cada vez mais no cenário da Biotecnologia enzimática. Depois das proteases e carboidrases, as lipases constituem o terceiro maior grupo em vendas no mundo (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; MESSIAS et al., 2011). Impulsionado por sua versatilidade, que permite a catalise de reações de hidrólises e de síntese, as lipases são aplicadas em muitas indústrias. Essas enzimas são biocatalisadores que atuam por definição, na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas de triacilglicéris levando através de uma sequência de reações a formação de diacilglicerol, monoacilglicerol e glicerol (HASSAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Dependendo das condições do meio, as lipases podem catalisar hidrólise de ésteres tanto em meio aquoso, quanto, em meios não aquosos ou restritos em água e essa característica permite que essas enzimas sejam utilizadas na síntese regiões seletiva ou na resolução estereosseletiva de álcoois, ácidos carboxílicos e aminas. Geralmente para serem cataliticamente ativas não requerem cofatores, atuam em ampla faixa de pH e são estáveis à altas temperaturas ampliando consideravelmente as possibilidades de aplicações comerciais (GOTOR-FERNÁNDEZ et al., 2006).

As lipases são encontradas em micro-organismos, em animais e em vegetais, porém industrialmente os micro-organismos são a fonte mais utilizada, uma vez que tem alta velocidade de síntese, alto rendimento de conversão de substrato em

produto, grande versatilidade e maior simplicidade na manipulação ambiental e genética de sua capacidade produtiva (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; SAXENA et al., 2003). Essas características fazem com que as lipases sejam uma excelente alternativa para aplicações industriais, que vão desde as indústrias alimentícias (JAEGER; EGGERT, 2002), detergentes (HASSAN; SHAH; HAMEED, 2006; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001), oleoquímica (DEUTSCHE, 2000), farmacêutica, química fina, cosméticos e fragrâncias, de poupa e papel (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004), tratamento de efluentes ricos em óleos e graxas (MENDES; CASTRO, 2005; ROSA; CAMMAROTA; FREIRE, 2006; CASTRO; MENDES; SANTOS, 2004).

Com a ampla utilização das lipases nas indústrias, pesquisas vêm desenvolvendo estudos voltados para a caracterização estrutural e elucidação do mecanismo de ação das mesmas assim como, na expressão de genes de lipases de características interessantes em organismos de fácil cultivo, em larga escala, o que torna interessante a bioprospecção de micro-organismos que tenham potencial para a produção dessas enzimas.

3.9 Proteases

Segundo Nelson e Cox (2014), as proteínas são as macromoléculas biológicas mais abundantes, ocorrendo em todas as células e em todos os compartimentos celulares em diversas formas e uma única célula pode armazenar milhares de tipos diferentes de proteínas. Os autores também definem as proteínas como sendo polímeros que compreendem uma sequência contendo vários aminoácidos ligados covalentemente entre si através de ligações peptídicas.

A função dessas macromoléculas biológicas está diretamente ligada a conformação tridimensional nativa, qual vai determinar as funções biológicas exercidas por elas, e vai depender exclusivamente da sequência de aminoácidos que a compõe (NELSON; COX, 2014).

Nas células as proteínas possuem diferentes funções, essenciais para a manutenção e propagação da vida: a) estruturais – compõem estruturas biológicas como o colágeno; b) defesa – bloqueiam eventos danosos e, ou, inativam

substâncias nocivas ao organismo; c) transporte – carregam substâncias nos tecidos e nas células; d) regulatórias – regulam as atividades de outras proteínas e vias metabólicas; e) armazenamento – atuam como reservatório de aminoácidos essenciais; f) contráteis – promovem movimentos nas células e tecidos; g) catálise enzimática – modificam a velocidade das reações químicas celulares (QUIRÓS; LANGER; LÓPEZ-OTÍN, 2015). Tais funções são de grande importância, pois essas moléculas podem exercer o papel de catalisadores biológicos em importantes processos biotecnológicos e industriais, tais como, processamento de alimentos, bebidas, formulação de detergentes, processamento de couro, formulação de medicamento, entre outros (COELHO et al., 2016; NEVES; PORTO; TEIXEIRA, 2006).

Segundo o Comitê de Nomenclatura Enzimática (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, as peptidases pertencem à classe 3 (hidrolases) e subclasse 3.4 (peptídeo-hidrolases ou peptidases). As enzimas da subclasse EC3.4 são subsequentemente classificadas como exopeptidases (EC3.4.11-19) e endopeptidases, (EC 3.4.21-99). Estes grupos referem-se à capacidade das enzimas em clivar ligações peptídicas nas extremidades ou no interior da cadeia polipeptídica, respectivamente. Também podem ser classificadas de acordo com a faixa de pH em que atuam: ácidas (pH 2,0 – 5,9), neutras (pH 6,0 – 7,9) e alcalinas (pH 8,0 – 13,0) (SOUZA, 2015).

Dentre as enzimas industriais, 75% pertencem ao grupo das hidrolases e destas, dois terços são proteases, é considerada um dos grupos mais importantes industrialmente devido a sua ampla diversidade de aplicação (WERNECK, 2016). São fontes de proteases, os animais, vegetais e micro-organismos. As proteases de origem vegetais são governadas por vários fatores que consomem tempo e as de origem animal estão diretamente relacionada com o abate desses organismos, nesse contexto as proteases microbianas são preferíveis por expressarem características desejadas para ampliação em escala industrial e aplicações biotecnológicas (SEWALT et al., 2016).

3.10 Celulases

A celulose é considerada o maior carboidrato sintetizado pelos vegetais e está entre os compostos orgânicos mais abundantes na biosfera, abrangendo mais da metade de todo carbono orgânico do planeta (CHANG et al., 2009). São polissacarídeos formados por resíduos de β -D-glicose unidos entre si por ligações β -1,4, que mantem uma estrutura linear e plana, sendo a celobiose, o dissacarídeo 4-O- β -D-glicopiranosil-D-glucopiranosose, a unidade repetitiva do polímero (GAUTAM et al., 2011). É considerado um polímero muito rígido e estima-se que em sua estrutura pode ser encontrado de 4.000 a 8.000 moléculas de glicose (ARISTIDOU; PENTTILÄ, 2000).

A conformação β permite que a celulose forme cadeias bem longas e retas, dispostas paralelamente e interligadas por pontes de hidrogênio, formando as microfibrilas que dão a resistências a essas moléculas. Essas fibras por sua vez, apresentam regiões cristalinas e amorfas, sendo essa região amorfa a mais propícia a hidrólise enzimática (O'SULLIVAN, 1997).

A celulose, é degradada pela hidrólise enzimática das celulases (membro da família das glicosil-hidrolases, que hidrolisam oligossacarídeos e polissacarídeos), um complexo celulolítico composto por endoglicanases, celobio-hidrolases e celobiasas. As endo- β -1,4glicanases (E.C. 3.2.1.4) partem aleatoriamente as cadeias de celulose e diminuem o comprimento das cadeias; as celobio-hidrolases (E.C. 3.2.1.91) atacam as extremidades do polímero com o grupo final redutor ou não; as β -glicosidades (E.C. 3.2.1.21) hidrolisam a celobiose a glicose (GAUTAM et al., 2011; POTPROMMANEE et al., 2017; SONG; LEE; LEE, 2016), sendo os três componentes celulolíticos atuando em sinergismo (MESA et al., 2016).

Entretanto, os vertebrados não possuem enzimas capazes de degradar celulose, por isso, esses polissacarídeos apresentam baixo valor nutricional para os humanos e animais, além disso, o Brasil é um país agroindustrial e destaca-se pela produção de soja, milho, cana-de-açúcar, mandioca, café, entre outros, gerando assim grandes quantidades de resíduos ricos em celulose.

Na maioria das vezes, esses resíduos são incorporados ao solo para decomposição natural, contudo, esse é um processo demorado e exige grandes

áreas aos redores das indústrias. Neste sentido, as celulases têm sido investigadas no que diz respeito ao seu potencial para degradação biológica desses compostos, pois essa degradação resulta na liberação de glicose e outros açúcares fermentáveis (HAN et al., 2016; LIU et al., 2017), que apresentam aplicabilidade nas indústrias de alimentos e alcooleiras, assim como aditivos nas indústrias de detergentes têxteis, papel e celulose e também na bioconversão de biomassa agrícola em produtos de valor agregado (BUZAŁA et al., 2016; DILLON et al., 2011; GAUTAM et al., 2011; MESA et al., 2016; TIRADO-GONZÁLEZ et al., 2016).

Os tecidos vegetais em decomposição e a superfície do solo constituem o principal habitat da microflora celulolítica. Sistemas celulolíticos completos são produzidos por diferentes gêneros e espécies de micro-organismos (CHANG et al., 2009; JA'AFARU, 2013). A produção de celulases por fungos é amplamente disseminada na natureza, pela alta eficiência em produzir enzimas celulolíticas ativas, incluindo uma grande variedade de espécies de fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus* (BULAKHOV et al., 2017; DILLON et al., 2011).

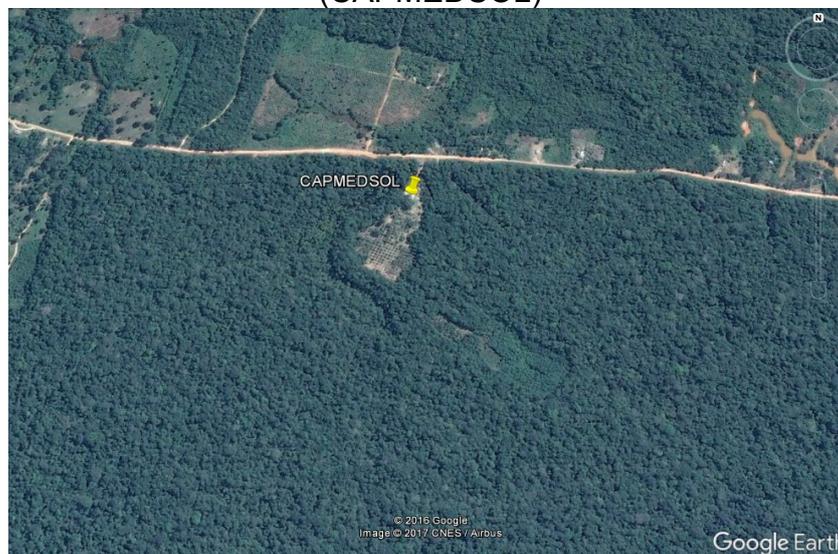
O fungo *Trichoderma reesei* é, provavelmente, o micro-organismo cujo o sistema celulolítico foi mais investigado, juntamente com o *Neurospora*, *Penicillium* e *Aspergillus*, devido ao grande potencial de aplicação industrial (HAN et al., 2016). Entretanto, as preparações enzimáticas brutas, provenientes destes fungos apresentam um desbalanceamento entre as atividades de Fpase e CMCase com relação a atividade de β -glicosidase, já que a produção de β -glicosidase nas culturas de *Trichoderma* é baixa. Esse fato limita a completa sacarificação da celulose a glicose, sendo as preparações de celulases de *Trichoderma* suplementadas com β -glicosidase produzidas por *Aspergillus* (SAINI et al., 2015). O que demonstra a necessidade prospecção de fungos que produzam um extrato bruto com atividade balanceado entre o sistema celulolítico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta dos insetos

Os ninhos foram escavados com auxílio de ferramentas manuais de acordo com a metodologia utilizada por Autuori (1942); Pereira-da-Silva (1979); Pretto (1996) afim de não causar prejuízos aos mesmos. A coleta dos insetos foi realizada no centro de Apoio à pesquisa do Médio Solimões – CAPMEDSOL (4°7'10.94"S e 63°4'29.57"O), pertencente ao Instituto de Saúde e Biotecnologia (ISB), da Universidade Federal do Amazonas, Campus Coari (Figura 1).

Figura 1 - Localização da coleta dos insetos (CAPMEDSOL)



Os ninhos foram acondicionados em recipientes plásticos transparentes e aclimatados de acordo com Bento et al., (1991) e Della Lucia e Villela, (1993) com temperatura de 25°C +- 2°C e umidade relativa 75 a 85% recebendo água, alimento e outros cuidados. A alimentação foi basicamente de folhas novas de laranja (*Citrus sinensis* L.) e manga (*Mangifera indica* L) de acordo com Gonzaga e Colaboradores (2015).

4.2 Isolamento dos fungos

Para o isolamento dos fungos filamentosos das formigas cortadeiras, os insetos foram divididos em cabeça, tórax e abdômen os quais foram submetidos a processos de assepsia de acordo com Gonzaga et al., (2015), imersos em água destilada autoclavada por um minuto, etanol 70% por um minuto, hipoclorito de sódio (NaOCl) 3% por um minuto, novamente lavados em etanol 70% por 30 segundos e por último em água destilada esterilizada. Também foram isolados micro-organismos dos insetos sem assepsia, o procedimento de inoculação foi o mesmo para ambos. Após, os insetos foram inoculados em placa de Petri com o meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) suplementado com 150 µL/mL-1 de antibiótico (RODRIGUES et al., 2008, 2011). As culturas foram transferidas para estufa tipo B.O.D (Biological Oxygen Demand) a 26°C. Após o inóculo foram realizados repiques até a obtenção de colônias puras.

4.3 Conservação dos micro-organismos

Os isolados foram conservados por meio de 3 métodos: (1) conservação em água destilada e autoclavada; (2) método de congelamento comum em glicerol a 15%; (3) conservação em óleo mineral (CASTELLANI, 1939; KITAMOTO et al., 2002; SOLA et al., 2012).

4.4 Determinação da atividade enzimática em meio sólido: meio para o crescimento microbiano e indução da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática qualitativa foi adaptada de Teixeira e Colaboradores (2011).

Para o crescimento dos fungos filamentosos e indução da atividade enzimática, foi utilizada a solução de Manachini (MANACHINI et al., 1987; MACIEL et al., 2010; SANTOS et al., 2013), conforme descrito a seguir:

KH₂PO₄ - 2,0 g; (NH₄)₂SO₄ - 1,0 g; MgSO₄.7H₂O - 0,1 g; NaH₂PO₄.H₂O - 0,9 g; Extrato de Levedura - 1,0 g; Água destilada - 1000 ml.

Para a indução de amilases foi adicionado o substrato amido solúvel (SIGMA)

na concentração final de 0,5% (p/v) e pH ajustado para 6,0.

Para a indução de lipases foi adicionado o substrato Tween 80 na concentração final de 0,5% (v/v) e pH ajustado para 5,0.

Para a indução de celulases foi adicionado o substrato carboximetilcelulose-CMC (SIGMA) na concentração final de 0,5% (p/v) e pH ajustado para 5,0.

Para a indução de protease foi adicionado o substrato gelatina incolor na concentração final de 0,5% (p/v) e pH ajustado para 5,0.

4.5 Condições de fermentação em meio líquido e recuperação do extrato bruto

Os cultivos foram realizados em frascos tipo Erlenmeyer de 100 mL, utilizando 30 mL de meio de cultivo com seus respectivos substratos indutores. Para inoculo, foi utilizado um fragmento de colônia de 8 mm em cada frasco e incubado em agitador de bancada (Shaker) por 72 H, às 28 °C, sob agitação de 150 rpm. Ao término da fermentação, a biomassa fúngica foi separada do extrato bruto através de filtração em membrana de vidro Whatman (47mm Ø circles), e posteriormente centrifugada a 4000 rpm por 20 min para separação total dos esporos remanescente. O sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma pipeta e conservado em microtubo de 2 mL a -10 °C até a inoculação em meio sólido para determinação da atividade enzimática.

4.6 Avaliação da atividade enzimática através do método *cup-plate*

No ensaio qualitativo (*cup-plate*) para detecção da atividade enzimática, quatro perfurações circulares (5 mm) foram feitas em placa de Petri contendo 20 mL de meio específico para cada enzima testada (Tabela 2). Em cada poço foi inoculado 100 µL do extrato enzimático bruto. Os testes foram realizados em triplicatas e as placas foram incubadas em B.O.D. a 37°C por 36 horas. A produção enzimática foi avaliada pela formação de halos, após revelação de acordo com o item 4.7.

Tabela 2 - Meios de cultivo para determinação de atividade enzimática pelo método cup-plate

Celulases - Ágar Celulose	
Ágar	18 g
Carboximetilcelulose (CMC)	10 g
Tampão Acetato de Sódio (pH 5,0)	1000 mL
Lipase – Ágar lipase	
Ágar Nutriente	2,0 g
CaCl ₂ .H ₂ O	0,01 g
Tween 80	1,0 MI
Água destilada	99,0 mL
Amilase – Ágar Amido	
Ágar	18 g
Amido solúvel	10 g
Tampão Acetato de Sódio (pH 5,0)	1000 mL
Protease – Ágar Gelatina Leite	
Solução 1	
Ágar	18 g
Tampão Citrato Fosfato (pH 5,0)	900 mL
Solução 2	
Gelatina	10 g
Tampão Citrato Fosfato (pH 5,0)	50 mL
Solução 3	
Leite desnatado	10 g
Tampão Citrato Fosfato (pH 5,0)	50 mL

4.7 Revelação da atividade enzimática

Para celulases, foi utilizada solução aquosa de vermelho congo 0,1% (p/v) e NaCl 1M.

Para lipases não há necessidade de substancia reveladora. Para evidenciar a observação do halo formado a partir de pequenos cristais, a placa foi mantida a 4°C por 24 horas.

Para amilase, foi utilizada solução de iodo a 0,1 M.

Para proteases não há necessidade de substâncias reveladoras, há a formação de um halo translúcido ao redor de cada *cup-plate*.

Para determinação da atividade enzimática foi medido o diâmetro do halo (mm) no reverso da placa, com o auxílio de um paquímetro e determinou-se o Índice de Atividade enzimática (I), conforme Lima (2006), dado pela fórmula abaixo:

$$I = \frac{\text{diâmetro do halo (mm)}}{\text{diâmetro do poço (mm)}}$$

Segundo Soares e Colaboradores (2010), para considerar um micro-organismo produtor de enzimas extracelulares em meio sólido, o valor do Índice de atividade enzimática (I) deve ser maior ou igual a 2,0.

4.8 Quantificação e avaliação da influência do pH e temperatura na atividade proteásica

O melhor produtor de protease foi selecionado para determinar quantitativamente a atividade enzimática e caracterizar melhor pH e temperatura.

A atividade das proteases foi determinada adicionando-se 150 µL de extrato enzimático e 250 µL de substrato (azocazeína a 1% (p/v) em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,2). Após 60 min de incubação a 25°C, em câmara escura, a reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL ácido tricloroacético a 10% (p/v) e o resíduo remanescente foi removido por centrifugação a 4000 rpm por 20 min. Foi retirado 800 µL do sobrenadante e adicionado em 1,4 mL de hidróxido de sódio 1M, procedendo-se a leitura em espectrofotômetro a 440 nm. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorvância de 0,01 em uma hora (COURI et al., 2000).

Para determinar o melhor pH da atividade proteolítica, o extrato bruto foi adicionado nos seguintes tampões contendo azocazeína 1% (p/v): solução tampão citrato 0,1M (pH 5 e 6), solução tampão fosfato 0,1 M (pH 7 e 8) e solução tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M (pH 9 e 10). As análises foram realizadas por uma hora, a 25°C em câmara escura, procedendo-se a leitura em espectrofotômetro a

440 nm. Após a determinação do melhor pH, foi avaliado a melhor temperatura, incubando o extrato enzimático em tampão ótimo contendo azocaseína 1% (p/v) nas seguintes temperaturas (25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C), durante uma hora, seguindo-se a leitura em espectrofotômetro a 440 nm.

4.9 Curva de crescimento

Para determinação da produção de proteases e biomassa microbiana, foi realizada uma curva de crescimento onde o fungo foi cultivado em solução Manachini com gelatina 0,5% (p/v), incubado a 28°C e 150 rpm. O procedimento foi realizado em triplicata, onde a cada 24 horas três frascos eram retirados e submetidos a etapa realizada no item 4.5 para obtenção do extrato bruto. A medição da concentração de biomassa foi realizada pela técnica de peso seco (LIMA, 2009), onde a membrana contendo a massa microbiana foi colocada em estufa a 100°C e pesado em intervalos de 12 – 24h na estufa e 30min do dessecador até a obtenção do peso constante. A produção de proteases foi realizada de acordo com o item 4.8.

4.10 Identificação morfológica

A identificação dos fungos foi feita por meio de microcultivos (GONZAGA, 2012; GUEDES, 2010), e a partir desses microcultivos as colônias foram observadas macroscopicamente (crescimento, coloração, textura e pigmento difuso) e microscopicamente (hifas e gongilídeos).

4.11 Identificação molecular dos micro-organismos

4.11.1 Extração do DNA

As amostras de fungos crescidos em placa com sete dias de cultivos, foram raspadas com o auxílio de um bisturi e submetidos a maceração com nitrogênio líquido, o macerado foi transferido para microtubo de 2 mL e reservado a – 80°C até

o momento da extração. O objetivo desse processo é romper a parede celular dos fungos para facilitar a extração do material genético.

Após, as amostras foram submetidas a extração pelo *Kit Wizard Genomic DNA Purification* (PROMEGA). Em seguida, o DNA foi submetido a eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta para confirmação. Ao final da extração, o pellet foi ressuspensionado em solução tampão (*DNA Rehydration Solution*) e congelado para análises posteriores.

4.11.2 Quantificação do DNA

A concentração das amostras de DNA foi determinada por fluorimetria com 2 μL da solução de DNA total extraído, utilizando o *Kit Qubit® dsDNA HS Assay* (*Molecular Probes – Life Technologies*).

4.11.3 PCR para o Sequenciamento

A metodologia para amplificação dos ácidos nucleicos foi adaptada de Montero-Lomelí e Rumjanek (2013). Os reagentes e concentrações utilizados para a reação estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 - Protocolo utilizado para amplificação por PCR

Reagente	Concentração das Soluções	Volume para uma reação (25 μL)
Água Mili-Q	-	6,2 μL
Tampão para Taq DNA polimerase	10X	2,5 μL
Mistura de dNTP	2,5mM	2,5 μL
Iniciador senso	5pmol/ μL	2,0 μL
Iniciador antisenso	5pmol/ μL	2,0 μL
MgCl ₂	25mM	2,5 μL
Taq DNA polimerase	5U/ μL	0,3 μL
DNA-molde	50ng	7 μL

A região amplificada foi a ITS (*internal transcribed spacer*), usando os primers descritos por White et al. (1990) para a região ITS1 e ITS4. A PCR foi realizada de acordo com Pagnocca e Colaboradores (2008) composta por 1 ciclo inicial de 95 °C

por 3 minutos seguido de 35 ciclos de: 96°C por 3 minutos, 61°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto.

O produto da PCR foi revelado por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8 %, corado com brometo de etídio 1% e visualizado sob luz ultravioleta usando o marcador molecular como padrão de comparação, seguido de uma nova quantificação por fluorimetria de acordo com o método anteriormente realizado.

Para o sequenciamento, o DNA genômico extraído dos 4 fungos foram submetidos a purificação com “exosap” o qual permaneceu *overnight* em termociclador com ciclos de 30 min a 37°C; 15 min a 80°C. Após isso, seguiu-se para o sequenciamento

Para as reações de sequenciamento foi utilizado um total de 10µL de solução, contendo 5,0 µL do produto da reação, 2,0µL de *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Fisher Scientific)*, e 10 pmoles de cada iniciador ITS1 e ITS4. Os produtos das reações de sequenciamento foram lidos por sequenciador *3500 Genetic Analyzer (Thermo Scientific)*.

As sequencias foram editadas e usadas para montar os *contigs* no programa Bioedit e os *contigs* foram usados para pesquisar sequências homólogas nas bases de dados para identificação taxonômica molecular, feitas pelo *BOLD system* e o *Fungal Barcode*, ambos online, utilizando-se o algoritmo BLAST, confrontados com os resultados das análises morfológicas para proceder-se a identificação final.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas 8 cepas de fungos no G1 e 21 no G2, como mostra a Tabela 4.

Tabela 4 - Fungos filamentosos isolados por parte de inseto

Parte do inseto	Fungos isolados
Grupo 1	
Cabeça	CCA6; CCA4; CCA5; CCA1; CCA3;
Tórax	TCA1;
Abdômen	ACA1; ACA2;
Grupo 2	
Cabeça	CSA5; CSA8; CSA9; CSA10; CSA6; CSA0; CSA2; CSA3;
Tórax	TSA2; TSA3; TSA5; TSA9; TSA10; TSA1; TSA8; TSA7;
Abdômen	ASA3; ASA4; ASA5; ASA7; ASA1;

O mesmo substrato que o fungo simbiote cresce pode ser favorável para o desenvolvimento de outros micro-organismos, e alguns estudos comprovam essa teoria, dentre a microbiota presente no ninho das formigas cortadeiras, os microfungos são encontrados em abundância (DELLA LUCIA; SOUZA, 2011).

Inicialmente, acreditava-se que esses fungos eram contaminantes, os quais eram carregados pelo ar, ou outras vias, e alojavam-se no jardim de fungos por tal ambiente apresentar condições físico-químicas favoráveis ao seu desenvolvimento. No entanto, estudos comprovam que muitos desses contaminantes, na verdade são parasitas oportunistas ou especializados que permanecem nos ninhos, como parte dessa simbiose (PAGNOCCA; RODRIGUES; BACCI JR, 2011).

Pagnocca e Colaboradores (2008), em estudo realizado para avaliar a quantidade de fungos e leveduras que são transportados pelas *gynes* de *A. laevigata* e *A. capiguara* no voo nupcial, achou resultados interessantes. Foram usados 267 *gynes* das quais foram aplicados dois métodos de isolamento, no

método 1 foram isolados fungos e leveduras do exoesqueleto e no método 2 os isolados foram feitos a partir do pellet transportado pelas futuras rainhas para fundação do novo ninho. No método 1 foram isolados 142 cepas, entre eles os mais comuns foram *Trichoderma* sp., *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., pelo método 2 apenas 7 cepas foram isoladas, entre elas estavam *Cladosporium cladosporioides*, *Chaetomium funicola*.

Estudos realizados por Rodrigues e Colaboradores (2008), aplicando técnicas básicas de isolamento de fungos filamentosos no jardim de fungos de ninhos de formigas cortadeiras, isolou 85 cepas de microfungos vivendo associado à espoja, o que compreendeu 33 espécies de 16 gêneros diferentes identificados por análises morfológicas e moleculares.

Guedes e Colaboradores (2011), conseguiram isolar 56 cepas fúngicas de *A. laevigata* em meio de cultura BDA, sendo 32 fungos negros e 14 espécies hialinas de soldados, a maioria da cabeça, além de 10 isolados dos trabalhadores sendo 4 da cabeça dos insetos e 6 do tórax. Ribeiro e Colaboradores (2012), isolaram 90 cepas de fungos filamentos de forrageiras de *Atta bisphaerica*, para tal estudo foram usados 300 insetos da referida casta, e dentre os fungos mais comumente encontrados estavam *Aspergillus ochraceus*, *Cladosporium* sp, *Mucor racemosus*.

Após o isolamento, todas as cepas foram avaliadas macroscopicamente quanto a morfologia da colônia e selecionados os morfotipos diferentes para triagem enzimática. As cepas selecionadas foram: TSA9; ASA3; CCA3; CCA5; ACA1; CCA4; CSA10; CCA1; TSA2; CCA6; CSA0; CSA2; TSA5; CSA6.

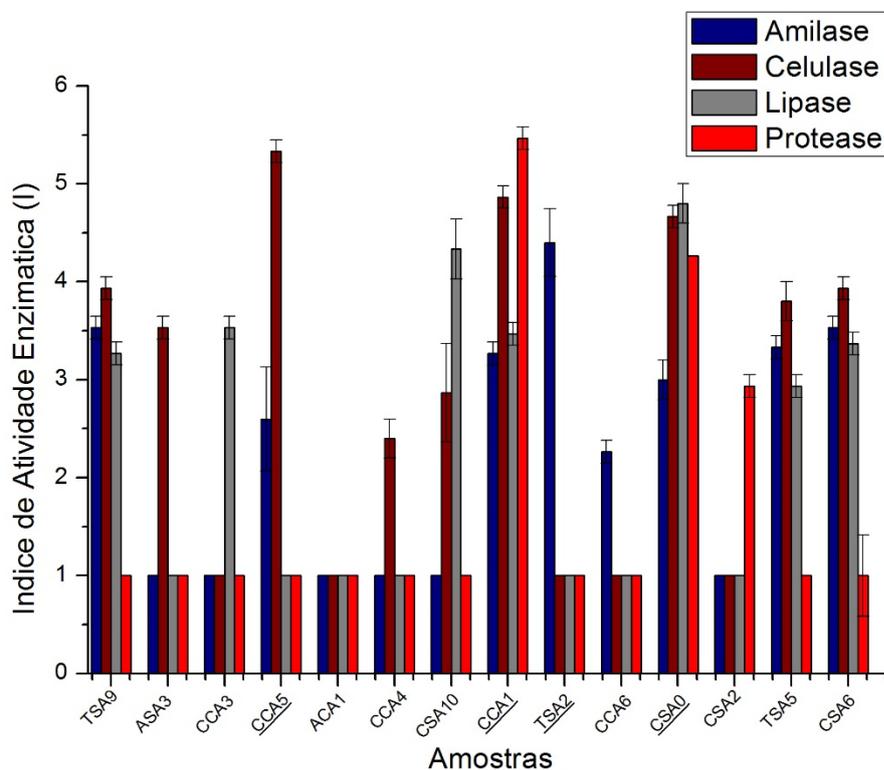
5.1 Avaliação qualitativa da produção de enzimas extracelulares

A avaliação qualitativa da produção extracelular das enzimas foi verificada 36 horas após o inóculo do extrato bruto (EB) de cada microfungos isolado da formiga cortadeiras em meio ágar-amido, ágar-lipase, ágar-CMC e ágar-leite para amilase, lipase, celulase e protease respectivamente. Com isso, foi possível avaliar que das 14 amostras testadas, 13 apresentaram resultado positivo para pelo menos uma enzima testada e somente a amostra ACA1 não apresentou resultado positivo para as enzimas testadas. As amostras ASA3, CCA4, CCA3, TSA2, CCA6 e CSA2

apresentaram resultados positivos para apenas uma enzima, sendo elas, celulase, lipase, amilase e protease respectivamente, sendo o fungo TSA2 o melhor produtor de amilase, com (I) igual a 4,4.

As amostras CCA5 e CSA10 apresentaram resultados satisfatórios para duas enzimas amilase/celulase e celulase/lipase, sendo o fungo CCA5 a amostra que apresentou um resultado mais expressivo para celulase com (I) igual a 5,33. Os microfungos TSA9, TSA5 e CSA6 apresentaram resultados positivos para amilase, celulase e lipase. Por sua vez, as amostras CCA1 e CSA0 apresentaram resultados positivos para todas as enzimas testadas sendo o CCA1 o melhor produtor de protease, com (I) igual a 5,46 e o CSA0 o melhor produtor de lipase, com (I) igual a 4,8. Como mostra na Figura 2.

Figura 2 - Resultados dos testes qualitativos



Índice de Atividade Enzimática (I) ≤ 1 indica resultado negativo

Usualmente, as enzimas mais estudadas são aquelas de origem animal e/ou vegetal, contudo as de origem microbiana são consideradas uma ótima alternativa

do ponto de vista industrial devido a algumas vantagens. Primeiramente são facilmente produzidas em larga escala via fermentação, podem ser mais facilmente expressas via engenharia genética em organismos de cultivos já estabelecidos e aparentemente não estão sujeitas a limitações de produção ou suprimentos.

Orlandelli e Colaboradores (2012), afirmam que a primeira etapa para a produção de enzimas a partir de micro-organismos consiste na identificação e aquisição do micro-organismo produtor, que pode ser uma linhagem selvagem, além disso, o autor salienta que a descoberta de novos micro-organismos produtores de enzimas, significa encontrar uma nova função para o mesmo, portanto, o maior número possível de micro-organismos deve ser investigado.

Os biomas brasileiros abrigam uma das microbiotas mais diversificadas do planeta e apresentam um potencial microbiológico imensurável. Devido a esse potencial e a crescente aplicabilidade das enzimas na área industrial, torna-se viável a seleção de novas linhagens produtores de complexos enzimáticos de interesse.

Segundo Neves, Porto e Teixeira (2006), na natureza, grande parte da atividade necessária para o aproveitamento da matéria orgânica é realizada por fungos produtores de enzimas, nos ninhos de formigas cortadeiras não é diferente, grande parte dos fungos encontrados nessa simbiose são bons produtores de enzimas.

Estudos sugerem que a ação enzimática sinérgica de vários micro-organismos associados ao jardim de fungos das formigas cortadeiras podem influenciar no crescimento do fungo mutualista, uma vez que esses organismos podem atuar na degradação de vários polissacarídeos se tornando assim um aspecto relevante a ser considerado da nessa interação.

Costa (2014), em seus estudos, avaliou a produção de enzimas extracelulares de 235 estirpes de fungos, compreendendo 91 espécies de 51 gêneros, isolados de ninhos attíneos, foram testadas dentre as enzimas, celulasas e amilases. Do total, 94% (221) produziu, pelo menos, uma das enzimas testadas, sendo que 72% dos isolados apresentam resultados positivos para celulasas. Segundo o autor, o elevado número de fungos produtores de celulasas observados no estudo sugerem que eles também atuem na degradação de polissacarídeos dentro do ninho, assim

como as leveduras. Nos testes para amilases, as amostras apresentaram resultados negativos, o autor deduziu que o papel dos fungos provenientes da esponja não está relacionado com a degradação do amido, o que presume que o metabolismo desse polissacarídeo está mais relacionado com o fungo mutualista.

Além disso, os fungos filamentosos, em geral são bons produtores de enzimas extracelulares, Pereira (2012), avaliou a produção de enzimas por fungos filamentosos de 6 gêneros (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cladosporium* e *Rhizopus*). Das amostras avaliadas, 15 produziram celulases, 13 produziram proteases, 13 produziram pectinases e não foram observados halos que comprovassem a produção de amilases, segundo o autor, a avaliação qualitativa da produção de enzimas, muitas vezes, não corresponde à produção propriamente dita, sendo necessária a análise quantitativa para obter um resultado mais confiável.

O que pode ser confirmando nos estudos de Stroparo e Colaboradores (2012), que avaliou quantitativamente a produção de enzimas de interesse biotecnológico de fungos *Penicillium glabrum*, *P. glabrum*, *Penicillium verruculosum*, *Penicillium herquei*, *Penicillium miczynskii*, *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger* e *A. niger*, e somente *Penicillium herquei* não apresentou resultados positivos para amilases, o restante apresentaram resultados satisfatórios.

Colen, Junqueira e Moraes-Santos (2006), avaliaram a produção de lipases de 25 cepas fúngicas isoladas de solo, desses 84% (21) apresentaram resultados satisfatórios para enzimas extracelulares. Resultados similares foram encontrados em estudos de Da Silva e Colaboradores (2016), dos 16 fungos testados quanto à produção de lipase, 12 (75% dos isolados) apresentaram resultados positivos.

5.2 Análise quantitativa da produção de proteases

Dos 14 fungos analisados para produção de proteases, apenas 3 apresentam resultados positivos, sendo o resultado mais expressivo o obtido pela amostra CCA1, o mesmo foi submetido ao ensaio enzimático para quantificar a produção da enzima de interesse. O resultado obtido foi satisfatório, utilizando azocazeína como substrato, a cepa CCA1 apresentou atividade catalítica equivalente a 186 U/mL.

De acordo com Coêlho e Colaboradores (2016), o uso da azocaseína como substrato para analisar atividade biológica de enzimas proteolíticas é um dos métodos mais confiáveis, pois o mesmo utiliza de forma simples a correlação da massa entre o substrato usado e a densidade ótica observada na amostra após a digestão.

O resultado obtido no presente trabalho, demonstra que o fungo é um bom produtor de protease extracelular, tendo em vistas os resultados encontrado nas bibliografias pesquisadas. Werneck (2016), avaliou quantitativamente a produção de proteases de 36 fungos, somente dois fungos não apresentaram atividade, sendo os melhores resultados obtidos pelo fungo codificado com BR com atividade enzimática de 41 U/mL, seguido pelo fungo OH03 com 24,76 U/mL e a cepa PT02 com atividade de 23,47 U/mL.

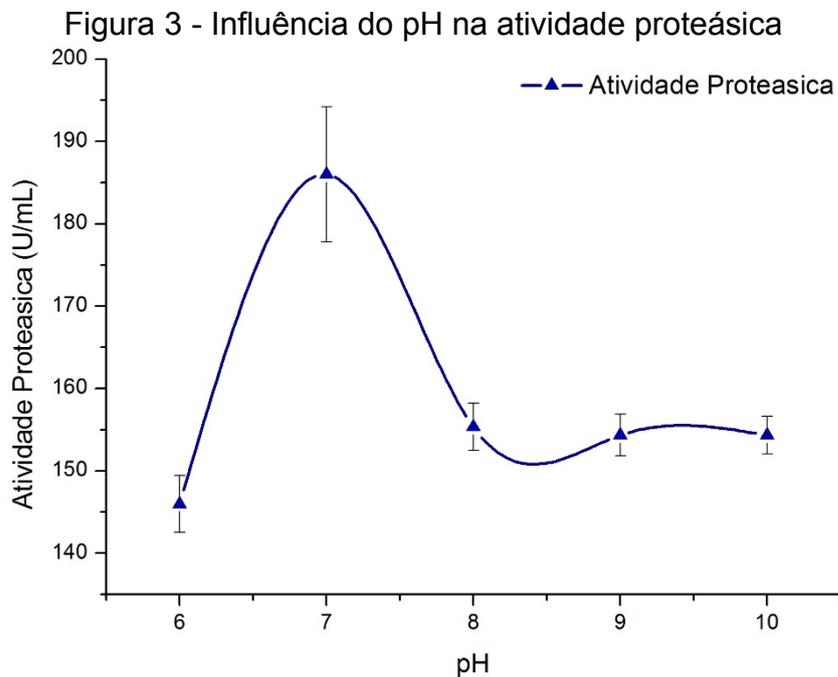
Lario e Colaboradores (2015), demonstraram em seus estudos que *Rhodotorula mucilaginosa* produziu protease extracelular com atividade 33,36 U/mL. Resultados similares foram encontrados nos estudos de Souza e Colaboradores (2015), o mesmo investigaram a produção de proteases extracelulares de *Aspergillus foeditus*, o fungo mostrou atividade proteolítica de 55,67 U/mL. Novelli, Barros e Fleuri (2016), avaliaram a produção de proteases em outras espécies do gênero *Aspergillus*, sendo ela *Aspergillus brasiliensis* e *Aspergillus flavipes* os quais apresentaram atividades catalíticas de 11,89 U/mL e 27,78 U/mL respectivamente.

Outros estudos também comprovam que os fungos filamentosos, de uma forma geral são bons produtores de enzimas de interesse industrial, como é o caso dos resultados encontrados por Nascimento (2014), tal autor quantificou proteases produzidas por microfungos isolados do fruto de Macaúba (*Acrocomia aculeata*), dos 19 fungos analisados no estudo, 16 apresentaram resultado positivo, sendo o melhor 5,14 U/mL.

5.3 Avaliação da influência do pH na atividade proteolítica

Devido a importância da caracterização enzimática para aplicação da mesma em processos industriais, foi avaliado a influência do pH na atividade proteásica do

extrato bruto da amostra CCA1. O extrato bruto produzido pela amostra supracitada apresentou atividade enzimática em todos os valores de pH testados, sendo eles, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0, apresentando atividade proteolítica de 146, 186, 155, 154 e 154 U/mL respectivamente. Figura 3.



O pH no qual o extrato bruto apresentou maior atividade foi de 7,0, tais resultados estão de acordo com os encontrados na literatura. Nos estudos realizados por Werneck (2016), foi avaliado o pH ótimo para proteases extracelulares presentes no extrato bruto de 5 cepas de fungos filamentosos, todas as amostras apresentaram maior atividade proteolíticas nas faixas de pH entre 6,0 e 9,0.

Proteases extracelulares produzidas por *Clonostachys rósea* tem o pH ótimo entre 9,0 e 10,0, confirmam estudos realizados por Li e Colaboradores (2006). Anitha e Palanivelu (2013), avaliando proteases queratinosas purificadas obtidas de *Aspergillus parasiticus* demonstrou a atividade catalítica máxima em pH 6,0 e 7,0, enquanto que em faixa de pH mais elevado, mais de 83% da atividade foi mantida.

Outras literaturas, justificam o uso de tais micro-organismos para aplicação industrial devido a ampla faixa de pH de suas proteases, como demonstrados nos

resultados obtidos por Novelli, Barros e Fleuri (2016), enzimas obtidas a partir dos fungos *A. oryzae*, *A. flavipes*, *P. roquefortii* mostraram atividade ótima em pH alcalino, enquanto *A. niger* e *A. brasiliensis* tiveram melhor atividade em pH ácido.

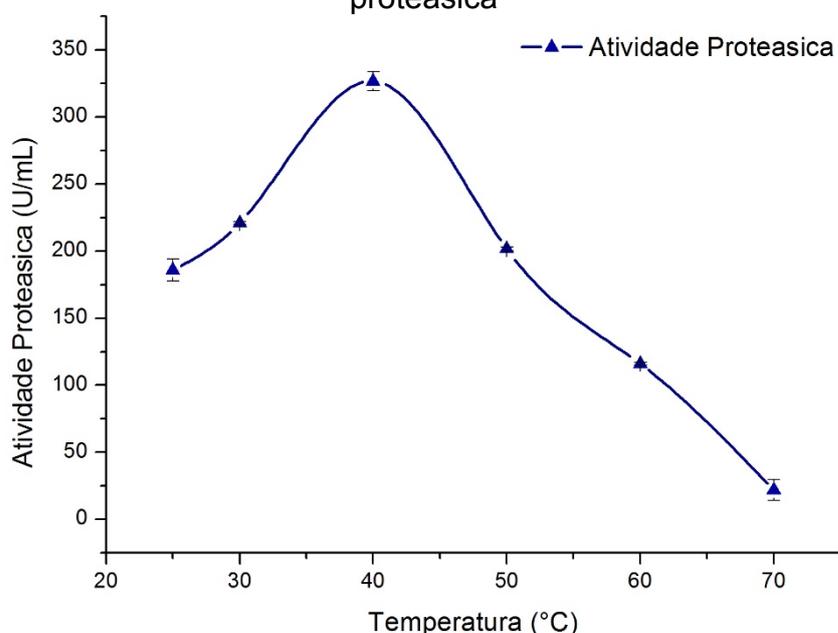
Resultados similares foram encontrados em estudos realizados por Hayet e Colaboradores (2011) e Dadshahi e Colaboradores (2016) em proteases de origem animal (*Sardinella aurita* e *Litopenaeus vannamei*), ambas mostraram atividade na faixa de pH entre 5,0 e 10,0, sendo o pH ótimo de 7,0 para proteases de *Litopenaeus vannamei* e pH ótimo de 8,0 para proteases de *Sardinella aurita*.

5.4 Avaliação da influência da temperatura na atividade proteolítica

A temperatura é uma variável de grande importância em processos industriais e deve ser considerada, uma vez que cada enzima tem uma temperatura ótima para atuação e uma mudança seria indesejada do ponto de vista produtivo, por esse motivo, torna-se viável a compreensão da faixa de temperatura que a enzima atua, e quanto maior for essa faixa, mais interessante, para aplicações industriais, a mesma será. A temperatura ótima da atividade de protease da amostra CCA1 foi realizada no pH ótimo.

Conforme a Figura 4, o extrato bruto produzido pela amostra supracitada apresentou atividade enzimática em todas as temperaturas testadas, sendo elas, 25, 30, 40, 50, 60 e 70°C apresentando atividade proteolítica de 186, 221, 326, 201, 116 e 22 U/mL respectivamente. Sendo a temperatura ótima a 40°C, porém o extrato enzimático apresentou boa atividade nas temperaturas de 25, 30, 50 e 60°C em comparação aos resultados encontrados na literatura.

Figura 4 - Influência da temperatura na atividade proteásica



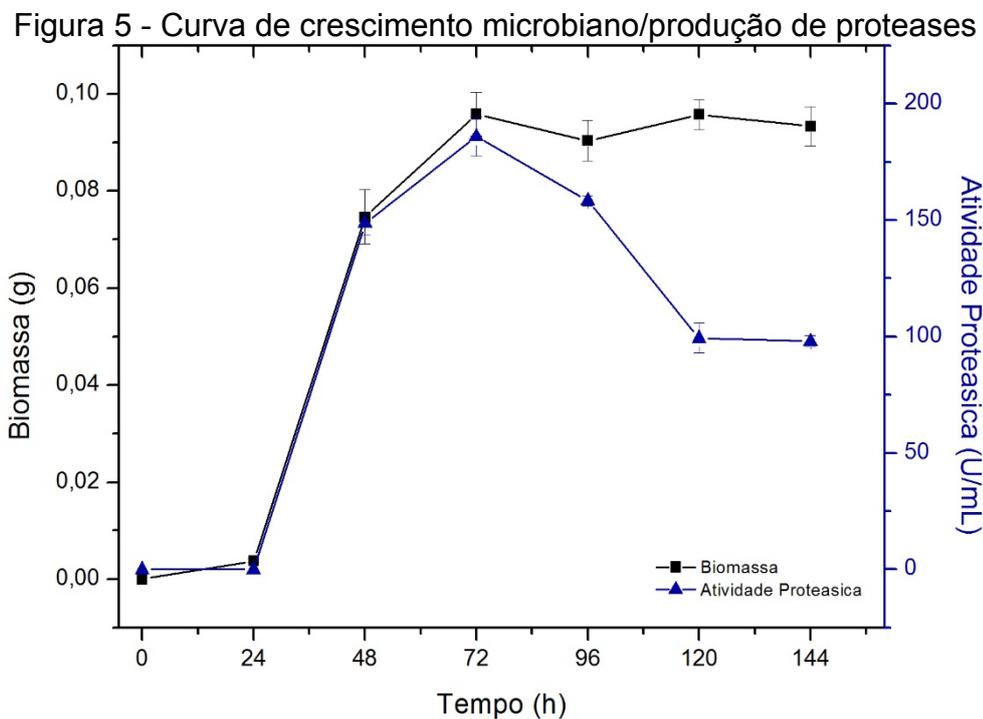
Lima (2016), avaliou a influência da temperatura na atividade de proteases extraídas de duas stirpes de *Aspergillus terreus*, um endofítico e um saprofítico, ambos apresentaram o pico de atividade na faixa de temperatura de 50°C, resultados similares foram encontrados nos estudos de Lima e Colaboradores (2014), em que as proteases obtidas de *Bacillus stearothermophilus*, com atividade máxima apresentada a 50°C.

Dos Santos Gama e Colaboradores (2016), em seus estudos com proteases de *Bacillus* da Amazônia, encontraram valores de atividade determinados entre 40 e 50°C, exibindo ótima atividade em 45°C. Outros resultados compatíveis com o do estudo em questão foram encontrados nas pesquisas de (ANITHA; PALANIVELU, 2013; GIONGO, 2006; LI et al., 2006; WERNECK, 2016).

5.5 Curva de crescimento

Na curva de crescimento foi observado dois parâmetros, biomassa fúngica e produção da enzima. A curva foi realizada seguindo o procedimento do item 4.9 e foi analisado diariamente durante 6 dias. Foi observado crescimento fúngico a partir do segundo dia após o inóculo com peso seco de 0,004 g, presumindo uma

fase Lag de 24 horas, chegando a fase estacionária no terceiro dia com o peso seco de 0,096 g, após o dia 3 o peso não apresentou variação considerável até o sexto dia. Em relação a produção enzimática, observou-se que a mesma tem início durante a fase logarítmica, onde foi observado uma atividade enzimática de 148,6 U/mL, a maior quantidade de enzima produzida foi observada no terceiro dia de experimento com a atividade enzimática chegando a 185,9 U/mL, nos dias 4, 5 e 6 o extrato apresentou atividade enzimática de 158,3, 99,3 e 97,9 respectivamente, confirmado o procedimento metodológico aplicado Figura 5.

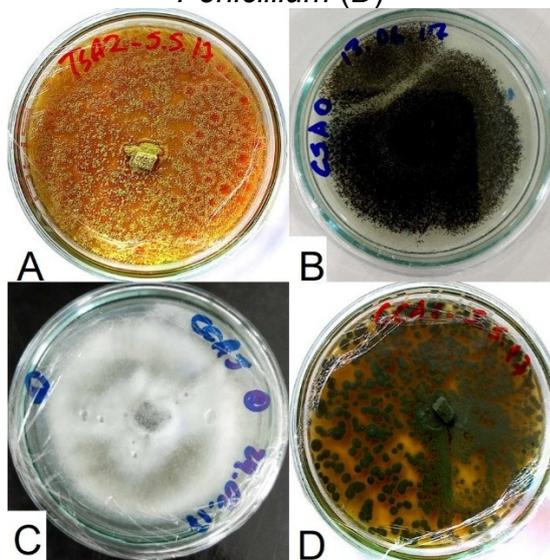


Resultados similares foram obtidos nos estudos de Souza (2015), em que a produção de proteases iniciou-se dentro de 48 horas e atinge valores máximos depois de cerca de 144 e 168 horas, assim como em estudos de Werneck (2016), onde a produção também se iniciou com 48 horas obtendo sua máxima produção em 432 hora (66,4 U/mL), valor relativamente inferior ao encontrado no presente estudo, e com o pico de produção em 72 horas.

5.6 Identificação morfológica e molecular

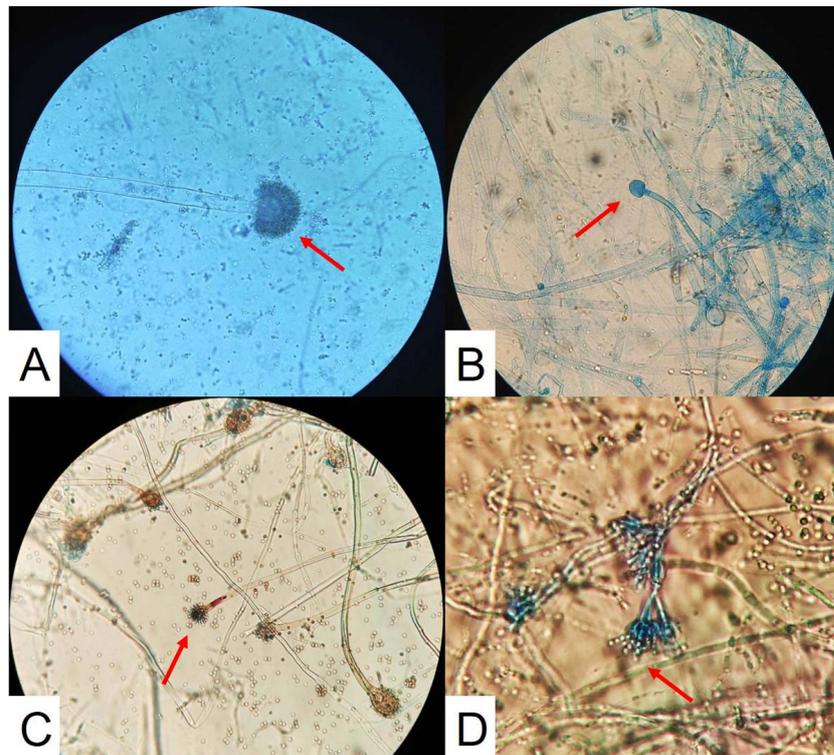
Os fungos considerados melhores produtores para cada enzima testada foram selecionados para identificação morfológica e molecular, sendo as amostras selecionadas: TSA2 como melhor produtor de amilase; CCA5 como melhor produtor de celulase; CSA0 como melhor produtor de lipase e CCA1 como melhor produtor de protease. Figura 6.

Figura 6 - Gênero *Aspergillus* (A e B);
gênero *Rhizomucor* (C); gênero
Penicillium (D)



A identificação morfológica foi feita através de análise das laminas avaliando as estruturas fúngicas coradas com lactofenol, após a análise foi identificado os gêneros *Aspergillus* (amostras CSA0 e TSA2); *Penicillium* (amostra CCA1); e *Rhizomucor* (amostra CCA5). Figura 7.

Figura 7 - Identificação morfológica dos fungos

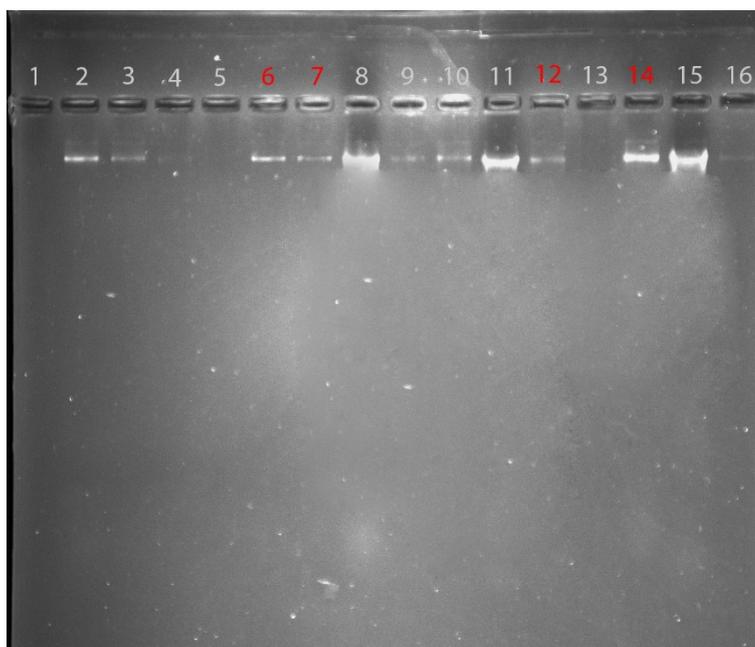


Conídio e conidióforo do gênero Aspergillus (A e C); Conídio e conidióforo do gênero Rhizomucor (B); Conídio e conidióforo do gênero Penicillium (D)

Para a confirmação das análises morfológicas, as amostras foram submetidas as técnicas de biologia molecular para identificação das espécies.

O kit de extração *Wizard Genomic DNA Purification* (PROMEGA) utilizado para extração do DNA cromossomal, mostrou-se eficiente com as adaptações feitas, uma vez que o kit não é específico para fungos filamentosos (Figura 8). A adaptação feita foi a substituição do método de rompimento da parede celular, o qual foi feito com nitrogênio líquido, sendo o indicado no protocolo o uso da líticase.

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose da extração do DNA cromossomal



CCA1 (6); CSA0 (7); CCA5 (12); TSA2 (14)

Além da eletroforese, a extração do DNA fúngicos foi confirmada por fluorimetria, tal método, serviu também para quantificar o DNA extraído, como mostra na tabela abaixo.

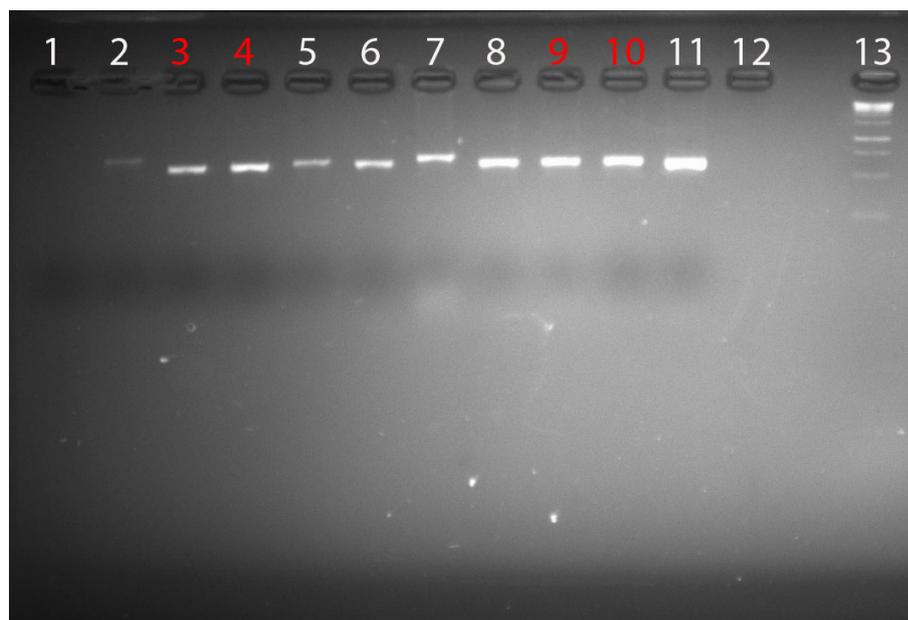
Tabela 5 - Quantificação de DNA cromossomal

Amostra	Concentração (ng/μL)
CCA1	3,17
CSA0	21,2
CCA5	13,7
TSA2	21,3

5.7 PCR para o sequenciamento

O DNA fúngico extraído das 4 amostras apresentou-se íntegro e sem contaminação. O mesmo foi submetido a PCR da região ITS do rDNA com os primers ITS2 e ITS4, com isso foi possível amplificar fragmentos de aproximadamente 600 pares de bases. Figura 9.

Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose da PCR



CCA1 (3); CSA0 (4); CCA5 (9); TSA2 (10)

Após a PCR, as amostras foram novamente submetidas a quantificação por fluorimetria. Resultado encontra-se na Tabela 5.

Tabela 6 - Quantificação da PCR

Amostra	Concentração (ng/μL)
CCA1	27,8
CSA0	27,4
CCA5	28,2
TSA2	23,2

O resultado do sequenciamento segue na Tabela 6.

Tabela 7 - Identificação molecular dos fungos

Amostras	Família	Gênero	Espécie	Score	Similaridade	E-Value
CCA1	Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>	<i>citrinum</i>	415	99.07	0
CSA0	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>	<i>aculeatus</i>	436	99.12	0
CCA5	Mucoraceae	<i>Rhizomucor</i>	<i>cf. variabilis</i>	555	98.14	0
TSA2	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>	<i>zonatus</i>	555	99.47	0

Os fungos são micro-organismos de grande importância do ponto de vista comercial, sendo amplamente distribuídos na natureza e podem ser encontrados em diversos substratos e com várias funções biológicas. Com isso, a busca de novas fontes fúngicas produtoras de enzimas vem aumentando notavelmente nos últimos anos. Isso graças a possibilidade de enzimas fúngicas serem facilmente produzidas em larga escala via fermentação, sendo intermediários para vários processos industriais além de participarem da degradação de resíduos industriais, agregando assim um grande valor comercial a um produto da natureza (ORLANDELLI et al., 2012).

Recentemente, as enzimas se tornaram uma biomolécula mediadora para obtenção de vários produtos/processos industriais e os fungos filamentosos estão entre os micro-organismos mais utilizados, devido a facilidade de cultivo e por serem bons produtores de enzimas extracelulares (BON; GÍRIO; PEREIRA JR, 2008).

Segundo a literatura, os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* estão entre os fungos filamentosos com maior diversidade na produção de enzimas extracelulares, dentre as espécies de *Aspergillus* estão: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus ustus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus clavatus*; dentre as espécies do gênero *Penicillium* estão: *Penicillium echinulatum*, *Penicillium brasilianum*, *Penicillium pinophilum*.

Já os fungos do gênero *Rhizomucor* são mais discretos quanto a produção de enzimas extracelulares, poucos trabalhos são encontrados sobre tais fungos, dentre eles estão (BERNARDES et al., 2014; OLIVEIRA, 2015; RODRIGUES et al., 2016; WANG et al., 2012), em que todos avaliaram a produção de lipases, com exceção de Bernardes e Colaboradores (2014), que testou a produção de amilase.

Com exceção do gênero *Rhizomucor*, há vários relatos de espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* encontrados em ninhos de formigas cortadeiras em estudos (GONZAGA et al., 2015; GUEDES; ATTILI-ANGELIS; PAGNOCCA, 2012; HUGHES et al., 2004; PAGNOCCA et al., 2008; PAGNOCCA; MASIULIONIS; RODRIGUES, 2012; RIBEIRO et al., 2012; RODRIGUES et al., 2011).

Dentre as literaturas pesquisadas, a espécie *Penicillium citrinum* foi encontrada em ninhos attíneos nos estudos de (CARLOS et al., 2011; RODRIGUES et al., 2005, 2008).

Em relação as espécies *Aspergillus zonatus* e *Aspergillus aculeatus* não há evidências dessas espécies vivendo em ninhos de formigas cortadeiras, sugerindo novos parasitas oportunistas para esses ninhos na região amazônica.

Também não há evidências de espécies do gênero *Rhizomucor* vivendo associado as formigas da tribo attine, dentre as bibliografias pesquisadas vários estudos foram realizados a fim de compreender a relação simbiótica das formigas cortadeiras e não foi encontrado fungos do gênero supracitado.

Contudo, espécies desses gêneros tem características de parasitas oportunistas, comumente encontrados em solos tropicais ou subtropicais, onde atuam principalmente como decompositores, podendo está associado ao depósito de lixo dos ninhos assim como no próprio jardim de fungos das formigas cortadeiras na forma de conídios.

6 CONCLUSÕES

- Foram isolados um total de 29 fungos do corpo da formiga cortadeira;
- Dos 29 fungos isolados, 14 foram testados, dos quais apenas a amostra ACA1 não apresentou atividade para nenhuma das enzimas;
- Os fungos isolados dessa simbiose apresentam grande potencial para a produção de enzimas extracelulares, visto os resultados obtidos no presente estudo;
- As espécies *Aspergillus aculeatus* (CSA0), *Rhizomucor variabilis* (CCA5) e *Aspergillus zonatus* (TSA2) apresentaram resultados satisfatórios para produção de lipase, celulase e amilase respectivamente;
- O fungo *Penicillium citrinum* mostrou-se ser bom produtor de protease extracelular em comparação aos resultados obtidos na literatura;
- O extrato bruto de proteases produzida pelo *Penicillium citrinum* apresentou boas características quanto ao pH e temperatura, o que pode ser explorado do ponto de vista industrial;

7 PERSPECTIVAS

- Quantificar as celulasas, lipases e amilases produzidas pelos fungos identificados no presente estudo;
- Purificar a protease obtida pelo *Penicillium citrinum*;
- Testar a aplicabilidade da enzima em produtos comerciais;
- Avaliar a produção em escala industrial da protease do *Penicillium citrinum*;
- Explorar as ferramentas de engenharia genética visando aumentar o rendimento da produção enzimática;

REFERÊNCIAS

- ANDREAUS, J.; CAVACO-PAULO, A. Enzimas no processamento de fibras têxteis. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro, RJ : Ed. Interciência, 2008.
- ANITHA, T. S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. **Protein Expression and Purification**, v. 88, n. 2, p. 214–220, 2013.
- ARISTIDOU, A.; PENTTILÄ, M. **Metabolic engineering applications to renewable resource utilization** *Current Opinion in Biotechnology*, 2000.
- AUGUSTIN, J. D. E. O. Novas Espécies de *Escovopsis*, sua dispersão e virulência na simbiose formigas attini –. **Tese**, 2011.
- AUTUORI, M. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp. – Hymenoptera – Formicidae) II: o sauveiro inicial (*Atta sexdens rubropilosa*, Forel, 1908). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 13, n. 7, p. 67-86, 1942.
- AUTUORI, M. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp. Hymenoptera-Formicidae) V. Número de formas aladas e redução dos sauveiros iniciais. **Arq. Inst. Biol**, v. 19, p. 325-331, 1950.
- AUTUORI, M. Contribuição para o conhecimento da sava (*Atta* spp. Hymenoptera: Formicidae). IV. **O sauveiro depois da primeira revoada (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908)**. **Inst Biol**, v. 18, p. 3970, 1947.
- BACCARO, F. B. FEITOSA, R. M., FERNÁNDEZ, F., FERNANDES, I. O., IZZO, T. J., SOUZA, J. L. P., & SOLAR, R. Guia para os gêneros de formigas do Brasil. **Manaus: Editora INPA**, 2015.
- BARATTO, C. M., SALAMONI, S. P., COSTA, R., OLIVEIRA, C. B., LOCATELLI, G. O. Seleção de micro-organismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência-Ciência e Biotecnologia**, 11(2), 15-28, 2012.
- BENTO, J. M. S.; DELA LUCIA, T. M. C.; MUCHOVEJ, R. M. C.; VILELA, E. F. **Influência da composição química e da população microbiana de diferentes horizontes do solo no estabelecimento de sauveiros iniciais de *Atta laevigata* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) em laboratório**. Anais da Sociedade Entomológica de Brasil. Jaboticabal. V. 20, n. 2, p. 307-317. 1991.
- BERNARDES, A. V. et al. UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE α -AMILASE POR *Rhizomucor miehei*. p. 1439–1451, 2014.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F. PEREIRA JR., N. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro, RJ : Ed. Interciência, 2008.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 506p, 2008.

BONASIO, R.; ZHANG, G.; YE, C.; MUTTI, N. S.; FANG, X.; QIN, N.; DONAHUE, G.; YANG, P.; LI, Q.; LI, C.; ZHANG, P.; HUANG, Z.; BERGER, S. L.; REINBERG, D.; WANG, J.; LIEBIG, J. Genomic comparison of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*. **Science**, Washington, v. 329, n. 5995, p. 1068-1071, 2010.

BRANDÃO, C. R. F., MAYHPE-NUNES, A. J., SANHUDO, C. E. D. Taxonomia e filogenia das formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed). **Formigas-Cortadeiras: da biotecnologia ao manejo**. Viçosa, MG : Ed. UFV, 2011.

BULAKHOV, A. G. et al. Using an Inducible Promoter of a Gene Encoding *Penicillium verruculosum* Glucoamylase for Production of Enzyme Preparations with Enhanced Cellulase Performance. p. 1–14, 2017.

BULÉON, A., COLONNA, P., PLANCHOT, V., BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, 23:85-112, 1998.

BUZAŁA, K. P. . et al. Effect of Cellulases and Xylanases on Refining Process and Kraft Pulp Properties. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1–14, 2016.

NASCIMENTO, C. S., V. L. DOS SANTOS. E M. H. C. A. Análise Da Produção De Protease E Lipase Por Fungos Filamentosos Isolados Do Fruto Da Macaúba (*Acrocomia Aculeata* (Jacq) Lood. Ex Mart). **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, p. 1–8, 2014.

CAFARO, M. J.; CURRIE, C. R. Phylogenetic analysis of mutualistic filamentous bacteria associated with fungus-growing ants. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 441-446, 2005.

CARLOS, A. A. et al. Filamentous fungi found in *Atta sexdens rubropilosa* colonies after treatment with different toxic bait formulations. **Journal of Applied Entomology**, v. 135, n. 4, p. 326–331, 2011.

CARVALHO, K. S. **Influências Dos Ninhos De Saúva (Formicidae: Attini) Na Nutrição, Crescimento E Proteção Da Vegetação Contra O Fogo, Em Uma Floresta De Transição Amazônia-Cerrado**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Pará.

CASTELANI, A. Viability of mold culture of fungi in distilled water. **Journal Tropical Medicine Hygiene**. 42: 225. 1939.

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química nova**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CHANG, C.-C. et al. Activity of cellulase from Thermoactinomyces and Bacillus spp. isolated from Brassica waste compost. **Scientia Agricola**, v. 66, n. June, p. 304–308, 2009.

COELHO, D. F. et al. Azocasein Substrate for Determination of Proteolytic Activity: Reexamining a Traditional Method Using Bromelain Samples. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

COELHO, M. A. Z., ALICE, M., SALGADO, A. M., RIBEIRO, B. D. **Tecnologia enzimática**. Editora EPUB, 2008.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. Belo Horizonte. Faculdade de Farmácia da UFMG, 2006. 206p. (Tese, Doutorado em Ciências de alimentos), 2006.

COLEN, G.; JUNQUEIRA, R. G.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 8, p. 881–885, 2006.

CORTEZ, D. V.; CASTRO, H. F. DE; ANDRADEB, G. S. S. POTENCIAL CATALÍTICO DE LIPASES LIGADAS AO MICÉLIO DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM PROCESSOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO. v. 40, n. 1, p. 85–96, 2017.

COSTA, R. R. DA [UNESP]. Perfil enzimático e potencial biotecnológico de fungos isolados de jardins das formigas cortadeiras. **Aleph**, p. 87 f. : il., , 2014.

COURI, Sonia et al. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 255-261, 2000.

CRUZ, M. E. M.; MARTINS, M. B.; CORVO, M. L.; GASPAR, M. M.; OLIVEIRA, E. M. M.; FERRARA, M. A. Enzimas em medicamentos e diagnóstico. In: BON, E, P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro, RJ : Ed. Interciência, 2008.

CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 7998–8002, 1999.

CUSTODIO, Bruna Cristina; RODRIGUES, André. ANTAGONISMO DE ESCOVOPSIS FRENTE AO FUNGO CULTIVADO PELAS FORMIGAS ATÍNEAS BASAIS. **Ciência & Tecnologia**, v. 8, n. esp., 2016.

DA SILVA, M. B. et al. Isolamento de micro-organismos e estudo da produção de lipase utilizando resíduos agroindustriais. **Scientia Plena**, v. 12, n. 5, p. 1–9, 2016.

DADSHAHI, Z. et al. Extraction and purification of a highly thermostable alkaline caseinolytic protease from wastes *Litopenaeus vannamei* suitable for food and detergent industries. **Food Chemistry**, v. 202, p. 110–115, 2016.

DE FINE LICHT, H. H., SCHIOTT, M., MUELLER, U. G., BOOMSMA, J. J. Evolutionary transitions in enzyme activity of ant fungus gardens. **Evolution**, 64(7), 2055-2069. 2010.

DE OLIVEIRA, A. N., DE OLIVEIRA, L. A., ANDRADE, J. S., JÚNIOR, A. F. C. Enzimas Hidrolíticas Extracelulares De Isolados De Rizóbia Nativos Da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, 26(4), 853-860, 2006.

DE SIQUEIRA, C. G., BACCI, M., PAGNOCCA, F. C., BUENO, O. C., HEBLING, M. J. Metabolism of Plant Polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the Symbiotic Fungus of the Leaf-Cutting Ant *Atta sexdens* L. **Applied and environmental microbiology**, 64(12), 4820-4822, 1998.

DELLA LUCIA, T. M. C., SOUZA, D. J. Importância e História de Vida das Formigas-Cortadeira. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed). **Formigas-Cortadeiras: da biotecnologia ao manejo**. Viçosa, MG : Ed. UFV, 2011.

DELLA LUCIA, T. M., OLIVEIRA, M. A., ARAÚJO, M. D. S., VILELA, E. F. Avaliação da não-preferência da formiga cortadeira *Acromyrmex subterraneus subterraneus* Forel ao corte de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, 19(1), 92-99. 1995.

DELLA LUCIA, T.M.C., E.F. VILELA, N. 1993. **Criação de formigas cortadeiras em laboratório**, p. 151-162. In T.M.C. Della Lucia (ed.), *As formigas cortadeiras*. Viçosa, Editora Folha de Viçosa, 262p.

DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR FETTWISSENSCHAFT. **Enzymes in lipid modification**. Weinheim: Wiley-VCH, 2000.

DILLON, A. J. P. et al. A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. v. 2, n. 1977, p. 48–53, 2011.

DORNELAS, Aline Silvestre Pereira et al. Fungos Filamentosos Associados às Espécies *Atta sexdens* (Linnaeus) e *Atta laevigata* (F. Smith)(Hymenoptera: Formicidae). **EntomoBrasilis**, v. 9, n. 1, p. 26-30, 2016.

DOS SANTOS GAMA, J. et al. Produção e caracterização de proteases de bacilos da Amazônia com potencial fibrinolítico. p. 15–21, 2016.

DOUGLAS, Angela E. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. **Annual review of entomology**, v. 60, p. 17-34, 2015.

DUARTE, A. P. M.; ATTILI-ANGELIS, D.; BARON, N. C. et al. Leaf-cutting ants: an unexpected microenvironment holding human opportunistic black fungi. *Antonie van Leeuwenhoek*, Amsterdam, v.106, n.3, p.465–73, 2014.

DURAN, N.; MARQUES, S.; SALLES, B. C.; MEDEIROS, R. G.; FERREIRA-FILHO, E. X. Enzimas na indústria de polpa e papel. In: BON, E, P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro, RJ : Ed. Interciência, 2008.

DZIEZAK, J. D. Enzymes: catalyst for food processes. **Food Technology**, Chicago, v. 45, n. 1, p. 78-85, jan. 1991.

ELBA, P. S. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT, 2008.

FARJI-BRENER, A. G., ILLES, A. E. Do leaf-cutting ant nests make "bottom-up" gaps in neotropical rain forests?: a critical review of the evidence. **Ecology Letters**, 3(3), 219-227, 2000.

FERNANDES, L. P. Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 1, 2007.

GANDHI, N. N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 74, n. 6, p. 621-634, jun. 1997.

GAUTAM, S. P. et al. Optimization for the Production of Cellulase Enzyme from Municipal Solid Waste Residue by Two Novel Cellulolytic Fungi. v. 2011, 2011.

GIONGO, J. L. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp . Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp . **Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, p. 95, 2006.

GOMES, E., GUEZ, M.A.U., MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 30: 136-145, 2007.

GONZAGA, A. D. **Antagonismo de bactérias endofíticas de plantas da Amazônia contra o jardim de fungos associados a formigas cortadeiras *Atta sexdens* Hymenoptera (Formicidae: Attini)**. 2012. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Centro de Apoio a Pesquisa (CAM), Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM, 2012.

GONZAGA, A. D. et al. Microrganismos Associados às Formigas Cortadeiras *Atta sexdens* Fabricius (Hymenoptera, Formicidae: Attini) no Município de Manaus, Amazonas. p. 85–90, 2015.

GONZAGA, A. D., DE SOUZA, A. Q. L., MAKI, C. S., PEREIRA, J. O., DA SILVA, N. M. **Microrganismos Associados às Formigas Cortadeiras *Atta sexdens Fabricius* (Hymenoptera, Formicidae: Attini) no Município de Manaus, Amazonas**, 2015.

GOTOR-FERNÁNDEZ, V., BRIEVA, R., GOTOR, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 40(3), 111-120, 2006.

GUEDES, F. L. A. **Fungos melanizados associados a formigas cortadeiras (Formicidae: Tribo Attini)**. 2010.

GUEDES, F. L. A.; ATTILI-ANGELIS, D.; PAGNOCCA, F. C. Selective isolation of dematiaceous fungi from the workers of *Atta laevigata* (Formicidae: Attini). **Folia Microbiologica**, v. 57, n. 1, p. 21–26, 2012.

GUPTA, R; MOHAPATRA, H; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial α -Amylases: Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**. Jan. 2003.
HAN, X. et al. Improving cellulase productivity of *Penicillium oxalicum* RE-10 by repeated fed-batch fermentation strategy. **Bioresource Technology**, v. 227, p. 155–163, 2016.

HASAN, F., SHAH, A. A., HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, 39(2), 235-251. 2006.

HASAN, S. M.; SANTOS, J. P.; ZEMPULSKI, M. L. F. GOMES, S. D.; LUCENA, S. L. Otimização da extração de proteases fúngicas obtidas por fermentação em estado sólido de resíduos de cervejaria. **ENGEVISTA**, v. 16, n. 2, p.244- 254, 2014.

HAYET, B. K. et al. Low molecular weight serine protease from the viscera of sardinelle (*Sardinella aurita*) with collagenolytic activity : Purification and characterisation. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 788–794, 2011.

HÖLLDOBLER, B; WILSON, E. O. **The superorganism: the beauty, elegance, and strangeness of insect societies**. WW Norton & Company, 2009.

HOUDE, Alain; KADEMI, Ali; LEBLANC, Danielle. Lipases and their industrial applications. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 118, n. 1-3, p. 155-170, 2004.

HUGHES, W. O. H. et al. Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a neotropical forest , with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var . *anisopliae*. v. 85, n. 2004, p. 46–53, 2004.

JA'AFARU, M. I. Screening of fungi isolated from environmental samples for xylanase and cellulase production. **ISRN microbiology**, v. 2013, p. 283423, 2013.

JACCOUD, D. B.; HUGHES, W. O. H.; JACKSON, C. W. The epizootiology of a *Metarhizium* infection in mini-nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. p. 51–61, 1999.

JAEGER, Karl-Erich; EGGERT, Thorsten. Lipases for biotechnology. **Current opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.

JAIME, N.G. **Levantamentos Mirmecofaunísticos em três Ambientes Antrópicos nos Estados de Goiás e Tocantins, Brasil**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, 131 p, 2010.

KELLNER, K., ISHAK, H. D., LINKSVAYER, T. A., & MUELLER, U. G.. Bacterial community composition and diversity in an ancestral ant fungus symbiosis. **FEMS microbiology ecology**, v. 91, n. 7, p. fiv073, 2015.

KITAMOTO, Y. et al. A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. **Mycoscience**, v. 43, n. 2, p. 143–149, 2002.

KONRAD, M., VYLETA, M. L., THEIS, F. J., STOCK, M., TRAGUST, S., KLATT, M., ... & CREMER, S. Social transfer of pathogenic fungus promotes active immunisation in ant colonies. **PLoS Biol**, v. 10, n. 4, p. e1001300, 2012.

KOST, C., LAKATOS, T., BÖTTCHER, I., ARENDHOLZ, W. R., REDENBACH, M., & WIRTH, R. **Non-specific association between filamentous bacteria and fungus-growing ants**. *Naturwissenschaften*, 94(10), 821-828, 2007.

LARIO, L. D. et al. Production, purification, and characterization of an extracellular acid protease from the marine Antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. **Fungal Biology**, v. 119, n. 11, p. 1129–1136, 2015.

LATREILLE, P. A. **Essai sur l'histoire des fourmis de la France**. Brive: F. Bourdeaux, 1798.

LI, J. et al. Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 4, p. 925–929, 2006.

LIMA, E. E. **Produção, Caracterização Bioquímica de Proteases Produzida por Fungos Filamentosos e Aplicação Biotecnológica**. CAMPO GRANDE/MS. 2016.
LIMA, A. R. S. Produção de pectinases por *Aspergillus* e classificação de suco de camu-camu com poligalacturonases e pectinesterases. Araluce Regina de Souza Lima: UFAM, 85p. il.2006. MANAUS.

LIMA, L. A. et al. Produção de proteases colagenolítica por *Bacillus stearothermophilus* de solo amazônico. **Acta Amazonica**. V. 44, n. 4, p. 403-410, 2014.

LIMA, J. N. Análise da produção de amiloglucosidade e alfa-amilase por *Aspergillus awamori* através de fermentação batelada em frascos agitados. MONTES CLAROS/MG. 2009.

LIU, Z. J. et al. Effect of bisulfite treatment on composition, structure, enzymatic hydrolysis and cellulase adsorption profiles of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 27–33, 2017.

MACIEL, C. D. C. S., DE SOUZA, M. A., DE GUSMÃO, N. B., DE CAMPOS-TAKAKI, G. M. Produção de enzimas do sistema lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactados por petroderivados. **Exacta**, 8(3), 299-305. 2010.

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

MARICONI, F. A. M. **As saúvas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1970.

MARTIN, M. M. The biochemical basis of the fungus-attínea ant symbiosis. **Science**, Washington, v. 169, n. 3940, p. 16-20, 1970.

MARTIN, M. M., BOYD, N. D., GIESELMANN, M. J., SILVER, R. G. Activity of faecal fluid of a leaf-cutting ant toward plant cell wall polysaccharides. **Journal of Insect Physiology**, 21(12), 1887-1892, 1975.

MARTIN, M. M.; WEBER, N. A. The cellulose-utilizing capability of the fungus cultured by the attínea ant *Atta colombica tonsipes*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 62, n. 6, p. 1386-1387, 1969.

MATRANGOLO, C. A. R., CASTRO, R. V. O., DELLA LUCIA, T. M. C., DELLA LUCIA, R. M., MENDES, A. F. N., COSTA, J. M. F. N., LEITE, H. G. Crescimento de eucalipto sob efeito de desfolhamento artificial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 45(9), 952-957, 2010.

MAYHÉ-NUNES, A. J.; JAFFÉ, K. Filogenia dos Attini. **ENCONTRO DE MIRMECOLOGIA, São Leopoldo**, p. 55-59, 1995.

MEHDIABADI, N. J., SCHULTZ, T. R. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Myrmecol. News**, 13, 37-55, 2009.

MENDES, A.A; CASTRO, H.F. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química nova**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.

MESA, L. et al. An approach to cellulase recovery from enzymatic hydrolysis of pretreated sugarcane bagasse with high lignin content. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 2422, n. April, p. 1–11, 2016.

MESSIAS, J. M., DA COSTA, B. Z., DE LIMA, V. M. G., GIESE, E. C., DEKKER, R. F. H., DE MELO BARBOSA, A. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, 32(2), 213-234, 2011.

MONTERO-LOMELÍ, M.; RUMJANEK, F. D. Técnicas em Biociências: protocolos comentados para o laboratório. Rio de Janeiro: **MedBook**, 2013.

MOREIRA, D. D. O., ERTHAL JR. M., SAMUELS, R. I. Alimentação e digestão em formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed). **Formigas-Cortadeiras: da biotecnologia ao manejo**. Viçosa, MG : Ed. UFV, 2011.

MUELLER, U. G. Ant versus Fungus versus Mutualism: Ant - Cultivar Conflict and the Deconstruction of the Attine Ant-Fungus Symbiosis. **The American Naturalist**, v. 160, n. S4, p. S67-S98, 2002.

MUELLER, U. G., SCOTT, J. J., ISHAK, H. D., COOPER, M., & RODRIGUES, A. Monoculture of leafcutter ant gardens. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. e12668, 2010.

MUELLER, U. G.; SCHULTZ, T. R.; CURRIE, C. R.; ADAMS, R. M. M.; MALLOCH, D. The origin of the attine ant-fungus symbiosis. **Quarterly Review Biol.**, 76: 169-197. 2001.

MYERS, A.M., MORELL, M.K., JAMES, M.G., BALL, S.G. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. **Plant Physiology**, 122: 989-997, 2000.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NEVES, K. C. SI.; PORTO, A. L. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 3, p. 299–306, 2006.

NICKELE, M. A. et al. Formigas cultivadoras de fungos: estado da arte e direcionamento para pesquisas futuras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, p. 53–72, 2013.

NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; FLEURI, L. F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. **Food Chemistry**, v. 198, p. 119–124, 2016.

O'SULLIVAN, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**, v. 4, n. 3, p. 173–207, 1997.

OLIVEIRA, M. M. Produção de lipases por. p. 1–6, 2015.

ORLANDELLI, R. C. et al. Enzimas de Interesse Industrial: Produção por Fungos e Aplicações. **SaBios: Rev. Saúde e Biol**, v. 7, n. 3, p. 97–109, 2012.

PAGNOCCA, F. C. et al. Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. p. 517–526, 2008.

PAGNOCCA, F. C., RODRIGUES, A., BACCI JR. Microrganismos associados às formigas cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed). **Formigas-Cortadeiras: da biotecnologia ao manejo**. Viçosa, MG : Ed. UFV, 2011.

PAGNOCCA, F. C.; MASIULIONIS, V. E.; RODRIGUES, A. Specialized Fungal Parasites and Opportunistic Fungi in Gardens of Attine Ants. v. 2012, 2012.

PANDEY, A., C., WEBB, C.R., SOCCOL, C., LARROCHE. **Enzyme Technology**. 1ª ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 760p, 2005.

PELCZAR, MICHAEL. **Microbiologia - Conceitos e Aplicações**. Vol. 2 - 2ª Ed. Editora: Makron Books, 2005.

PEREIRA, V. M. Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização da produção de celulases por *aspergillus sulphureus*(fresen.) Wehmer. p. 1012, 2012.

PEREIRA-DA-SILVA, V. **Dinâmica populacional, biomassa e estrutura dos ninhos iniciais de *Atta capiguara* Gonçalves, 1944 (Hymenoptera: Formicidae) na região de Botucatu**. 1979. 77p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas/Zoologia)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1979.

PETERNELLI, E. F., DELLA LUCIA, T., PETERNELLI, L. A., MARTINS, S. V., BORGES, E. E. D. L. The interaction among workers of the genera *Atta* and *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) and seeds of *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae), a pioneer tree species in Brazil. **Sociobiology**, 42(3), 597-603, 2003.

POTPROMMANEE, L. et al. Characterization of a thermophilic cellulase from *Geobacillus* sp. HTA426, an efficient cellulase-producer on alkali pretreated of lignocellulosic biomass. p. 1–17, 2017.

PRETTO, D. R. **Arquitetura dos túneis de forrageamento e do ninho de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera – Formicidae), dispersão de substrato e dinâmica do inseticida na colônia**. 1996. 110 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1996.

QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). **Ecological Entomology**, v. 4, n. 2, p. 151-160, 1979.

QUIRÓS, P. M.; LANGER, T.; LÓPEZ-OTÍN, C. New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 6, p. 345–359, 2015.

REINEHR, C. O.; TREICHEL, H. Produção de Lipases com Atividade de Hidrólise por *Aspergillus* Utilizando Subprodutos Agroindustriais , Óleo de Soja e Glicerol
Lipases Production with Hydrolytic Activity by *Aspergillus* Using Agroindustrial Byproducts , Soy Oil and Glycerol. v. 18, n. 1, p. 97–115, 2016.

RIBEIRO, M. M. R. et al. Diversity of Fungi Associated with *Atta bisphaerica* (Hymenoptera : Formicidae): The Activity of *Aspergillus ochraceus* and *Beauveria bassiana*. v. 2012, 2012.

RIBEIRO, M.C. & SOARES, M.M.S.R. **Microbiologia prática: roteiro e manual**. Atheneu, São Paulo, 2002.

RIBEIRO, S. B. **Caracterização de espécies bacterianas encontradas em ninhos de *Atta sexdens* L. e isolamento de *Streptomyces* de formigas da tribo Attini**. 2000. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – USP, Rio Claro, SP.

RODRIGUES, A. et al. Ecology of microfungal communities in gardens of fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae): A year-long survey of three species of attine ants in Central Texas. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 78, n. 2, p. 244–255, 2011.

RODRIGUES, A. et al. Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, v. 56, n. 4, p. 604–614, 2008.

RODRIGUES, A. et al. Variability of Non-Mutualistic Filamentous Fungi Associated with *Atta sexdens rubropilosa* Nests. **Folha Microbiologica** v. 50, n. 5, p. 421–425, 2005.

RODRIGUES, A. Ocorrência de Fungos Filamentosos em Ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) Submetidos a Tratamentos com Iscas Tóxicas. **Disertação**, 2004.

RODRIGUES, A., BACCI JR, M., MUELLER, U. G., ORTIZ, A., & PAGNOCCA, F. C. Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial ecology**, 56(4), 604-614, 2008.

RODRIGUES, A., PASSARINI, M. R., FERRO, M., NAGAMOTO, N. S., FORTI, L. C., BACCI, M., PAGNOCCA, F. C. Fungal communities in the garden chamber soils of leaf-cutting ants. **Journal of basic microbiology**, 54(11), 1186-1196, 2014.

RODRIGUES, C. et al. Isolamento e seleção de fungos produtores de lipases com base na atividade lipásica e no potencial hidrolítico sobre óleo comestível de soja e espuma de caixa de gordura. p. 1–12, 2016.

- SAINI, R. et al. Enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum* for bio-ethanol application. **Bioresource Technology**, v. 188, p. 240–246, 2015.
- SANTOS, M. S.; ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; GARCIA, A.; DOS SANTOS, M. C.; DE AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. (2013). Bioprospecção de Fungo Endofítico Isolado de *Passiflora* sp. com Potencial Biotecnológico. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, 2(3esp), 130-133.
- SANTOS, T. A. DE A. et al. Produção da enzima peroxidase por fungos filamentosos isolados de solos de lavouras no estado de Goiás. v. 1, 2016.
- SAXENA, R. K.; DAVIDSON, W. S.; SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, London, v. 39, p. 239-247, 2003.
- SCHULTZ, T. R., MEIER, R. A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. **Systematic Entomology**, 20(4), 337-370. 1995.
- SCHULTZ, T. R., MUELLER, U. G., CURRIE, C. R., REHNER, S. A. Reciprocal Illumination A Comparison of Agriculture in Humans. **Insect–Fungal Associations: Ecology and Evolution**, 149. 2005.
- SCHULTZ, T. R.; BRANDY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, Washington, v. 105, n. 15, p. 5435-5440, 2008.
- SEN, R., ISHAK, H. D., ESTRADA, D., DOWD, S. E., HONG, E., MUELLER, U. G. Generalized antifungal activity and 454-screening of *Pseudonocardia* and *Amycolatopsis* bacteria in nests of fungus-growing ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106(42), 17805-17810, 2009.
- SENA, A. R.; KOBLITZ, M. G. B.; GÓES NETO, A.; UETANABARO, A. P. T. Seleção de fungos do Semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. **Sitientibus**, Feira de Santana, n. 35, p. 91-98, jul./dez. 2006.
- SEWALT, V. et al. The Generally Recognized as Safe (GRAS) Process for Industrial Microbial Enzymes. v. 12, n. 5, p. 295–302, 2016.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, New York, v. 19, p. 627-662, 2001.
- SILVA, A. **Participação do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* na produção de enzimas intestinais da formiga *Atta sexdens***. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 2000.

SILVA, A., BACCI JR, M., DE SIQUEIRA, C. G., BUENO, O. C., PAGNOCCA, F. C., & HEBLING, M. J. A. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, 49(4), 307-313, 2003.

SILVA, A., BACCI JR, M., PAGNOCCA, F. C., BUENO, O. C., & HEBLING, M. J. Production of polysaccharidases in different carbon sources by *Leucoagaricus gongylophorus* Möller (Singer), the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* Linnaeus. **Current microbiology**, 53(1), 68-71, 2006.

SILVA-PINHATI, A. C. O., BACCI JR, M., HINKLE, G., SOGIN, M. L., PAGNOCCA, F. C., MARTINS, V. G., BUENO, O. C., HEBLING, M. J. A. Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 37(10), 1463-1472, 2004.

SILVEIRA, G. A., DE OLIVEIRA LOURENÇO, T. M., LEITE, M. V., & MOREIRA, E. A. (2014). Presença de insetos da família formicidae (insecta hymenoptera) em ambiente hospitalar, no município de Campos Gerais, Minas Gerais. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, 12(2), 3-14.

SOARES, I. et al. Identificação do potencial aminolíticos de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. *Cienc. Tecnol. Aliment.* [online]. 2010, v. 30, n. 3, p. 700-705.

SOLA, M. C. et al. Manutenção de Microrganismos: Conservação e Viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 14, p. 1398–1418, 2012.

SONG, C.; LEE, Y.; LEE, J. Enhanced Production of Cellulase from the Agricultural. v. 11, n. 3, p. 5722–5730, 2016.

SOUTO, L. D. S. **Papel ecológico do fogo e das saúvas (*Atta spp.*) na ciclagem de nutrientes e carbono em cerrado**. (2007). Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

SOUZA, D. J., SANTOS, J. F. L., DELLA LUCIA, T. M. C., Organização social das formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed). **Formigas-Cortadeiras: da biotecnologia ao manejo**. Viçosa, MG : Ed. UFV, 2011.

SOUZA, P. M. et al. Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 17–21, 2015.

STROPARO, E. C. et al. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2267–2278, 2012.

TEIXERA, M. F. S. SILVA, T. A. PALHETA, R. A. CARNEIRO, A. L. B. ATAYDE, H. M. **Fungos da Amazônia: Uma Riqueza Inexplorada (Aplicações Biotecnológicas)**. Universidade Federal do Amazonas, Manaus: Edua, 2011.

TIRADO-GONZÁLEZ, D. N. et al. Production of cellulases and xylanases by white-rot fungi cultured in corn stover media for ruminant feed applications. **Animal Feed Science and Technology**, v. 221, p. 147–156, 2016.

TOLEDO, Ana Paula Miranda Duarte. Fungos negros presentes no integumento de formigas-cortadeiras (Tribo Attini). 2016.

VAN DER MAAREL, M.J.E.C., VAN DER VEEN, B., UITDEHAAG, J.C.M., LEEMHUIS, H., DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, 94: 137-155, 2002.

VENTURA, M. M.; FREITAS, S. M.; FREIRE, A. P. Catálise enzimática – alguns destaques na evolução da enzimologia. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro, RJ : Ed. Interciência, 2008.

WANG, J. et al. Enhanced activity of *Rhizomucor miehei* lipase by directed evolution with simultaneous evolution of the propeptide. p. 443–450, 2012.

WEBER, N. A. Gardening ants the attines. Philadelphia: **American Philosophical Society**, 1972.

WERNECK, G. C. **Produção de proteases por fungos endofíticos isolados de plantas do cerrado**. [s.l: s.n.].

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplificação e sequenciamento de genes de fungos ribossomal RNA para filogenética. In: Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ, editors. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**, 1990.

WILSON, E. O. **The insect societies**. Cambridge, Mass.: Harvard University Press, 1971.

ZEOULA, L. M., MARTINS, A. D. S., PRADO, I. D., ALCALDE, C. R., BRANCO, A. F., & SANTOS, G. D. Solubilidade e degradabilidade ruminal do amido de diferentes alimentos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 28, 898-905, 1999.