

PROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE CELULASES EM MEIO SÓLIDO CONTENDO CARBOXIMETILCELULOSE

Larissa da Conceição Miranda^{1*}, Camilly Vitória Lopes Oliveira¹, Júlia Machado Gonçalves¹, Jennifer Sintique Cruz Rocha¹, Belle-Marie Costa Pavie¹, Mariane Xavier e Cunha¹, Maria Rita Oliveira Santos², Karen Chrislan Faria Ribeiro Jamar², Juliana Rocha de Meira Pires¹, Vivian Machado Benassi²

¹Instituto Federal do Norte de Minas Gerais, Diamantina, Minas Gerais, Brasil

(*lcm14@aluno.ifnmg.edu.br)

²Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Instituto de Ciência e Tecnologia, Diamantina, Minas Gerais, Brasil

Resumo: Celulases são biocatalisadores da hidrólise do homopolímero de celulose, as quais atuam em diversos processos industriais, como indústria de alimentos e biocombustíveis. O presente trabalho avaliou o potencial de produção qualitativa de celulases a partir de fungos filamentosos preservados em sílica-gel. Os isolados foram reativados em meio de cultura sólido contendo farinha de aveia, repicados em meio de cultura sólido contendo carboximetilcelulose incubados à 30 °C, por sete dias. A atividade foi avaliada qualitativamente por revelação com Vermelho Congo. A formação de halos claros indicou degradação da carboximetilcelulose tendo como destaque os fungos F48083 e CF321A. Pode-se verificar que há microrganismos potenciais celulolíticos ainda pouco explorados na natureza, justificando a prospecção de fungos filamentosos e a identificação do potencial de síntese enzimática com aplicação biotecnológica.

Palavras-chave: Bioconversão; Hidrólise enzimática; Microrganismos filamentosos; Resíduos vegetais; Triagem microbiológica

INTRODUÇÃO

Fungos filamentosos são organismos eucarióticos pluricelulares, que apresentam grande relevância biotecnológica devido a capacidade de secretar enzimas (Santos *et al.*, 2026). A investigação do potencial enzimático desses fungos permite identificar microrganismos capazes de produzir hidrolases extracelulares, ampliando as possibilidades de aplicações em diversos processos industriais como indústria têxtil, farmacêutica, alimentos e biocombustíveis (Batista *et al.*, 2024). Muitos desses microrganismos podem ser encontrados associados a substratos naturais e materiais vegetais, incluindo frutos do café, onde atuam sobre a superfície externa dos tecidos e participam de diferentes processos biológicos e fermentativos (Pina *et al.*, 2024).

Os fungos filamentosos são organismos decompositores e cosmopolitas, sendo encontrados em diversos *habitats* como solos, águas e ar. Essa característica está diretamente relacionada com a facilidade de secretarem uma diversidade de enzimas ao substrato onde ocupam, atuando na hidrólise de

moléculas poliméricas formando pequenos oligômeros e monômeros, que são absorvidos pelos microrganismos e metabolizados.

Entre as enzimas de maior interesse produzidas por esses fungos destacam-se as celulases, responsáveis pela degradação da celulose presente em materiais lignocelulósicos liberando açúcares fermentescíveis importantes para diferentes processos biotecnológicos (Varandas, 2020 e SINGH *et al.*, 2023).

A biomassa vegetal possui estrutura complexa, sendo composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, o que dificulta sua degradação e aproveitamento em escala industrial. A lignina atua como uma barreira estrutural da parede celular vegetal, reduzindo a acessibilidade das enzimas à celulose (EZEIA, 2025).

Segundo Seddiqi *et al.* (2021), a celulose é um polissacarídeo linear constituído por unidades de D-glicose unidas por ligações do tipo β -1,4-glicosídicas formando cadeias longas e não ramificadas. Essas cadeias se organizam em estruturas altamente

ordenadas, estabilizadas por extensas ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, o que resulta em regiões cristalinas e amorfas distribuídas ao longo da fibra celulósica. Essa organização estrutural confere à celulose elevada resistência mecânica, baixa solubilidade em água e grande estabilidade química, características que dificultam sua degradação natural (Seddiqi *et al.*, 2021).

A hidrólise completa da celulose é mediada pela ação sinérgica das três classes de enzimas, sendo essas (1) as endoglucanases (EC 3.2.1.4), que atuam de forma aleatória na região interna das cadeias de celulose, promovendo a ruptura das ligações β -1,4-glicosídicas entre os componentes de sua composição, em especial na região amorfa da celulose. Consequentemente, são formados novos pontos de abertura ao longo da cadeia, facilitando o acesso de outras enzimas, além das próprias celulasas, (2) as exoglucanases (EC 3.2.1.91), conhecidas como celobiohidrolases, que agem nos limites redutores e não-redutores das cadeias de celulose, que removem unidades de celobiose de forma sequencial, e (3) as β -glicosidases (EC 3.2.1.21), que são responsáveis pela finalização do processo de hidrólise enzimática, sendo catalisadoras na conversão da celobiose em glicose. Essa etapa é essencial para evitar o acúmulo, que, em excesso, pode atuar como inibidor das outras enzimas presentes no processo, reduzindo a eficiência do processo de hidrólise enzimática pelas celulasas (Ferreira, 2008) (Figura 1).



Figura 1. Imagem representativa da hidrólise da celulose pela ação das celulasas.

Fonte: autoria própria.

Diante disso, torna-se necessária a busca por processos mais eficientes de hidrólise enzimática e por microrganismos com elevada capacidade de produção e secreção de enzimas lignocelulolíticas.

Logo, o presente trabalho teve como objetivo identificar fungos filamentosos com potencial de produção de celulasas por meio da técnica de revelação com vermelho Congo em meio de cultura sólido contendo carboximetilcelulose.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Micologia, Enzimologia e Desenvolvimento de Produtos

(LMEDP), vinculado ao Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT), à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) *campus* JK, Diamantina, Minas Gerais, Brasil. O microrganismo utilizado neste trabalho foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob número A64AD93.

Microrganismos em estudo

Os fungos filamentosos utilizados nesse estudo são provenientes do banco de fungos do LMEDP onde estavam preservados em sílicas-gel. Este método é amplamente empregado para a preservação de microrganismos por longos períodos, por contribuir para a manutenção da viabilidade celular e da estabilidade metabólica das culturas (Lynd *et al.*, 2002). Os isolados fúngicos avaliados foram identificados pelos códigos: CF321A, CF321B, F48083, F48231, F72011 e F96122, conforme a nomenclatura previamente utilizada por Pina *et al.* (2024) e adotada pelo banco de fungos do laboratório.

Os fungos foram isolados de frutos do cultivar *Coffea arabica* Catucaí 144 cultivados na fazenda experimental do Núcleo de Estudos em Cafeicultura (NECAF/UFVJM), a 1.384 m de altitude, sendo mantidos em sílicas-gel. Os microrganismos em estudo foram dois provenientes de frutos não fermentados (CF321A e CF321B), dois referentes à fermentação de 48 horas (F48083 e F48231), um referente à fermentação de 72 horas (F72011) e um referente à fermentação de 96 horas (F96122).

Ativação das sílicas-gel e verificação de pureza das culturas

Para a reativação dos isolados, as sílicas foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultivo sólido composto por 4% (m/v) de farinha de aveia e 2% (m/v) ágar bacteriológico (Emerson, 1941). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica, à 30 °C, durante sete dias, para recuperação e crescimento fúngico.

Repique pontual em meio de cultura sólido contendo carboximetilcelulose

Após a verificação da viabilidade das linhagens e que as mesmas se encontravam isoladas, os fungos filamentosos foram repicados pontualmente, ao centro da placa de Petri, contendo meio de cultura sólido suplementado com carboximetilcelulose (CMC) utilizada como única fonte de carbono.

O meio contendo CMC foi preparado utilizando 1% (m/v) de carboximetilcelulose e 2% (m/v) de ágar

bacteriológico. Após o preparo, o meio foi submetido ao processo de esterilização em autoclave à 121 °C, durante 30 minutos, 1 atm, garantindo a eliminação de possíveis contaminantes.

Após o repique dos fungos nos meios, os mesmos foram mantidos em estufa bacteriológica a 30 °C, por sete dias. Esse período permitiu o crescimento micelial dos fungos e a possível secreção de enzimas capazes de degradar a carboximetilcelulose presente no meio de cultivo.

Análise qualitativa da produção de celulasas

A avaliação da atividade qualitativa das celulasas foi realizada por meio da técnica de revelação utilizando solução de Vermelho Congo a 0,1% (m/v), método amplamente utilizado para detecção da degradação de substratos celulósicos em meios sólidos. Após o período de incubação, aproximadamente 10 mL da solução corante foram adicionados sobre a superfície das placas de Petri contendo os isolados, permanecendo em contato com o meio durante cerca de 15 minutos, possibilitando a interação do corante com a celulose não degradada.

Em seguida, o excesso de Vermelho Congo foi removido e substituído por, aproximadamente, 10 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl) 1 M, permanecendo em contato com as placas por 15 minutos. Essa etapa foi realizada com a finalidade de remover o excesso de corante não aderido ao meio e intensificar o contraste entre as regiões degradadas e não degradadas da carboximetilcelulose.

Posteriormente, as placas foram submetidas à lavagem com solução de ácido acético a 0,5%, procedimento utilizado para aumentar a nitidez dos halos de hidrólise observados ao redor das colônias fúngicas. A presença desses halos claros foi considerada indicativa da degradação da celulose presente no meio e, conseqüentemente, da produção de enzimas celulolíticas pelos fungos avaliados.

As etapas metodológicas realizadas neste estudo, desde a seleção e ativação dos isolados fúngicos até a análise qualitativa da atividade celulolítica, estão representadas de forma esquemática na Figura 2.

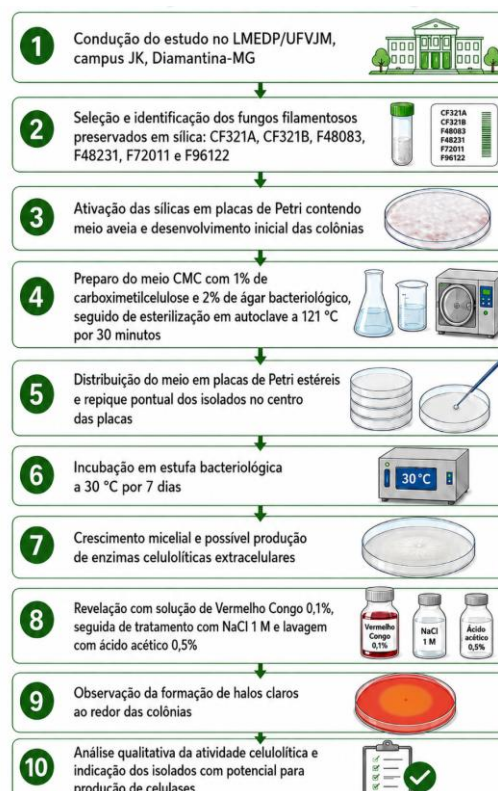


Figura 2. Etapas da metodologia empregada na triagem qualitativa de fungos filamentosos produtores de celulasas.

Reprodutibilidade dos Experimentos

Todas as análises foram realizadas em duplicatas e as medidas foram obtidas pela média final.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A formação de halos de hidrólise em meios contendo substratos celulósicos é muito utilizada em estudos de prospecção de microrganismos produtores de enzimas, por permitir a identificação preliminar de fungos com potencial para a degradação da celulose.

Os resultados obtidos demonstraram diferenças descritivas no potencial celulolítico dos isolados avaliados, evidenciadas pela variação na formação dos halos de hidrólise em meio contendo carboximetilcelulose. Valores maiores de halo indicam maior degradação da carboximetilcelulose e, conseqüentemente, maior potencial de produção de enzimas celulolíticas pelos fungos avaliados.

Pode-se observar que o fungo com código F48083 apresentou o maior halo enzimático observado, com 0,70 cm, indicando maior capacidade aparente de degradação da carboximetilcelulose nas condições

avaliadas. Em seguida, destacou-se o isolado CF321A, com halo de 0,66 cm. Os isolados F96122, CF321B e F72011 apresentaram halos intermediários, variando entre 0,40 cm, 0,30 cm e 0,30 cm respectivamente. Já o isolado F48231 apresentou halo de 0,24 cm, indicando menor atividade celulolítica entre os fungos avaliados (Tabela 1).

Em relação ao crescimento dos fungos filamentosos, pode-se observar que todos tiveram um crescimento superior a 1,0 cm de raio micelial, destacando-se o CF321B com 2,30 cm e CF321A com 1,90 cm (Tabela 1).

Tabela 1. Crescimento micelial e formação de halo enzimático dos isolados fúngicos cultivados em meio suplementado com carboximetilcelulose.

Fungos	Raio micelial (cm)	Halo enzimático (cm)
CF321A	1,90	0,66
CF321B	2,30	0,30
F48083	1,80	0,70
F48231	1,56	0,24
F72011	1,70	0,30
F96122	1,60	0,40

Mendes *et al.* (2024) ao avaliarem fungos filamentosos isolados de silagem de milho utilizaram meio sólido contendo 1% de carboximetilcelulose e com incubação à 30 °C por sete dias, condições semelhantes às empregadas no presente estudo. Nesse tipo de ensaio, a presença de halos claros ao redor das colônias após a revelação com Vermelho Congo foi associada à possível produção de celulasas, constituindo um indicativo inicial da atividade celulolítica desses microrganismos. Dessa forma, a comparação dos halos formados pelos diferentes fungos avaliados possibilita uma análise inicial de sua capacidade enzimática e auxilia na seleção de linhagens promissoras para estudos posteriores de otimização e quantificação da produção enzimática.

A utilização de CMC em meio sólido é empregada em ensaios de triagem de microrganismos celulolíticos, pois permite selecionar isolados capazes de crescerem nesse substrato e, posteriormente, avaliar a possível secreção de enzimas envolvidas na degradação da celulose (Mendes *et al.*, 2024). Por se tratar de um derivado solúvel da celulose, a CMC favorece a observação da atividade de enzimas do tipo carboximetilcelulasas, sendo adequada para triagens preliminares em meio sólido.

Pinheiro Junior e Castro (2024) observaram que algumas linhagens apresentaram crescimento em meio contendo carboximetilcelulose, mas não formaram halos após a revelação com Vermelho Congo, sugerindo ausência ou baixa atividade detectável de carboximetilcelulasas extracelulares. Esses resultados não corroboram com nossos estudos, uma vez que todos os fungos analisados cresceram no meio e tiveram halos enzimáticos.

A formação de halos em meio contendo carboximetilcelulose é amplamente utilizada como método preliminar de triagem de fungos produtores de celulasas, pois permite identificar microrganismos capazes de secretar enzimas extracelulares envolvidas na degradação da celulose. Entretanto, por se tratar de uma análise qualitativa, a presença e o tamanho dos halos devem ser interpretados apenas como indicativos iniciais do potencial enzimático dos isolados, sendo necessários estudos quantitativos posteriores para determinação mais precisa da atividade celulolítica (Singh *et al.*, 2023).

A variação observada entre os isolados avaliados está de acordo com estudos de prospecção de microrganismos celulolíticos, nos quais diferentes linhagens apresentaram respostas distintas quanto ao crescimento em meio contendo CMC e à formação de halos após a revelação. Essa diferença pode estar relacionada à capacidade metabólica de cada microrganismo isolado, à eficiência de secreção das enzimas no meio sólido. Assim, a formação de halos não deve ser interpretada apenas como resultado do crescimento micelial, mas como um indicativo da capacidade do microrganismo em degradar a carboximetilcelulose presente no meio.

Além da origem do substrato, a produção de celulasas pode ser influenciada por diferentes fatores, como a composição do meio de cultura, a fonte de carbono utilizada, o tempo de incubação, a temperatura, o pH e as características fisiológicas próprias de cada fungo. Os fungos filamentosos são amplamente descritos na literatura como importantes produtores dessas enzimas, principalmente devido à capacidade de secretar enzimas extracelulares em quantidades expressivas. Gêneros como *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium* são frequentemente relacionados à produção de celulasas. No entanto, no presente estudo, os isolados foram avaliados apenas por seus códigos de identificação, sem a realização de uma caracterização taxonômica detalhada. Assim, não é possível associar os fungos analisados a gêneros específicos, sendo recomendada, para estudos futuros, a identificação morfológica e/ou molecular dos isolados.

A formação dos halos enzimáticos após a revelação com Vermelho Congo evidenciou diferenças no potencial celulolítico entre os isolados avaliados, com destaque para o isolado F48083, que apresentou maior halo de degradação em meio contendo carboximetilcelulose, conforme observado na Figura 3.

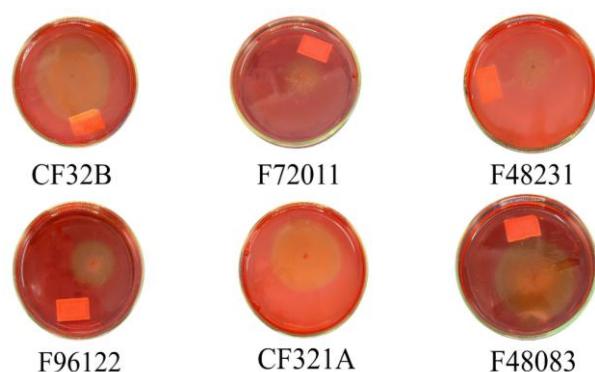


Figura 3. Formação de halos enzimáticos dos isolados fúngicos em meio contendo carboximetilcelulose após revelação com Vermelho Congo.

Nesse contexto, os isolados que apresentaram maiores halos, especialmente F48083 e CF321A, podem ser considerados candidatos promissores para etapas posteriores de avaliação. No entanto, por se tratar de uma análise qualitativa, recomenda-se que estudos futuros incluam ensaios quantitativos de atividade enzimática, além da avaliação de diferentes condições de cultivo, como tempo de incubação, temperatura, pH e concentração da fonte de carbono. Essas etapas são importantes para confirmar o potencial dos isolados e direcionar sua possível aplicação em processos biotecnológicos relacionados à degradação de resíduos lignocelulósicos e à produção de enzimas de interesse industrial (Santos *et al.*, 2026).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitiram observar diferenças no potencial celulolítico dos fungos filamentosos avaliados, evidenciados pela formação de halos de hidrólise em meio contendo carboximetilcelulose. Entre os isolados estudados, destacaram-se aqueles que apresentam maiores halos de degradação, indicando maior potencial para produção de enzimas celulolíticas extracelulares nas condições analisadas.

A variação observada entre os isolados demonstrou a importância da triagem inicial como etapa de seleção de linhagens promissoras, uma vez que nem todos os fungos apresentaram o mesmo comportamento quanto à degradação da CMC. Dessa forma, a análise qualitativa realizada permitiu identificar isolados com possível interesse biotecnológico, especialmente para

aplicações relacionadas à degradação de materiais celulósicos e ao aproveitamento de biomassas lignocelulósicas.

Assim, o estudo contribuiu para a prospecção de fungos filamentosos produtores de celulases e reforça a necessidade de investigações posteriores, incluindo ensaios quantitativos de atividade enzimática e estudos de otimização das condições de cultivo. Essas etapas poderão confirmar o potencial dos isolados selecionados e direcionar sua aplicação em processos industriais, ambientais e biotecnológicos mais sustentáveis.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), ao Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT), ao Instituto Federal do Norte de Minas Gerais (IFNMG) campus Diamantina, ao Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos e ao Laboratório de Micologia, Enzimologia e Desenvolvimento de Produtos (LMEDP) pelo apoio institucional. Agradecem também às alunas Júlia Machado Gonçalves, Camilly Vitória Lopes Oliveira, Belle-Marie Costa Pavie e Mariane Xavier e Cunha pela colaboração e contribuição no desenvolvimento deste trabalho. Estendem os agradecimentos às agências de fomento CNPq, FAPEMIG e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- BATISTA, Ana Clara Miranda; SANTOS, Lucely Nogueira dos; FURTADO, Kalebe Ferreira; CHAGAS JUNIOR, Gilson Celso Albuquerque; FERREIRA, Nelson Rosa. Análise do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados da bacaba (*Oenocarpus bacaba*). Revista Amazônia Science & Health, v. 12, n. 2, p. 294-309, 2024. DOI: 10.18606/2318-1419
- EMERSON, Ralph. An experimental study on the life cycles and taxonomy of *Allomyces*. Lloydia, v. 4, p. 77-144, 1941.
- EZEA, Ifeanyi Boniface. Microbial Cellulase Production-Microorganisms, Technologies and Factors: A Review. International Journal of Biochemistry Research and Review, v. 34, n. 3, p. 172-186, 2025.
- FERREIRA, Susana Margarida Paraíso. Produção de celulases e hidrólise enzimática de materiais lenhocelulósicos para a produção de



biocombustíveis. MS thesis. Universidade da Beira Interior (Portugal), 2008.

LIMA, Darlan Sedinário de. Bioprospecção de enzimas microbianas a partir de bactérias isoladas do alimento larval de abelhas sem ferrão. 2024. Monografia (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2024.

MENDES, Wanderson de Jesus de Moura; SANTOS, João Pedro Soares e; GONÇALVES, Brida Maria Teixeira; NELSON, David Lee; BENASSI, Vivian Machado. Prospection of potential cellulase producing filamentous fungi from corn silage. Revista Observatorio de la Economía Latinoamericana, Curitiba, v. 22, n. 11, p. 01-17, 2024. DOI: 10.55905/oelv22n11-210.

PINA, Luana Teixeira *et al.* Café e fungos: uma jornada pela prospecção e caracterização de organismos exofíticos filamentosos no Norte de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 10., 2024, São Lourenço. Anais [...]. São Lourenço: Sociedade Brasileira de Micologia, 2024.

PINHEIRO JUNIOR, Rone Emerson; CASTRO, Marcos Venicius de. Isolamento de microrganismos degradadores de celulose dos intestinos de cupins. In: CONGRESSO DE INOVAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO IFSP, 15., 2024. Anais [...]. São Paulo: IFSP, 2024.

SANTOS, Maria Rita Oliveira *et al.* Potencial de fungos filamentosos na produção de celulasas para o setor alimentício. In: V SIMPÓSIO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2026. Anais [...]. Cidade: Diamantina, 2026.

SEDDIQI, Hadi *et al.* Cellulose and its derivatives: towards biomedical applications. Cellulose, v. 28, n. 4, p. 1893-1931, 2021.

SINGH, A. *et al.* SIMÕES, Maria Lúcia Garcia. Produção de xilanase por fungos filamentosos isolados de solo de área de caatinga. 2006.

VARANDAS, Vinícius Silva. Purificação de celulase produzida por *Aspergillus niger* utilizando sistema bifásico aquoso PEG/Citrato e aplicação em hidrólise de biomassa lignocelulósica. 2020. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2020.