

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

LUÍS FERNANDO ROCHA OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE HOLOCELULASES E PECTINASES DE
ISOLADO FÚNGICO ANEMOFÍLICO CULTIVADO EM RESÍDUOS AGRÍCOLAS**

**PATOS DE MINAS - MG
JULHO DE 2019**

LUÍS FERNANDO ROCHA OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE HOLOCELULASES E PECTINASES DE
ISOLADO FÚNGICO ANEMOFÍLICO CULTIVADO EM RESÍDUOS AGRÍCOLAS**

“Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito para a obtenção
do título de bacharel em Biotecnologia”

Prof. Dr. Gilvan Caetano Duarte

**PATOS DE MINAS – MG
JULHO DE 2019**

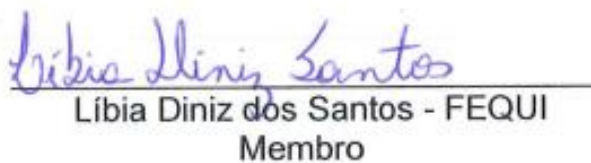
LUÍS FERNANDO ROCHA OLIVEIRA

**Caracterização parcial de holocelulases e pectinases de isolado fúngico
anemofílico cultivado em resíduos agrícolas**

“Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito para a obtenção
do título de bacharel em Biotecnologia”

Banca Examinadora:


Gilvan Caetano Duarte - IBTEC
Presidente


Líbia Diniz dos Santos - FEQUI
Membro


Fabrícia de Matos Oliveira - FAMAT
Membro

Patos de Minas, Minas Gerais – 03 de julho de 2019

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer a vida, por todos os caminhos percorridos e por me permitir estar aqui hoje, escrevendo e apresentando este trabalho. Isso inclui agradecer a Deus.

Em seguida, agradecer aos meus pais. Sem eles eu também não estaria aqui pra começar. Meu pai Roberto Carlos de Oliveira, que muito trabalha para que eu possa estar aqui, que sempre esteve do meu lado do jeito dele. Minha mãe, Rosana de Lourdes da Rocha, que também sempre trabalhou muito e é uma ótima mãe, uma ótima amiga, uma ótima companhia. Sempre esteve do meu lado em vários momentos e me dar suporte em tudo, obrigado por tudo.

Agradecer também a minha irmã, Maria Clara Rocha Oliveira, que é uma das coisas mais importantes da minha vida. É minha maior saudade e mesmo sendo mais nova que eu, uma ótima conselheira. Obrigado pelas companhias, por ser paciente comigo e por ser uma ótima irmã, eu te amo muito.

Dizer obrigado ao meu orientador, Gilvan Caetano Duarte, uma pessoa paciente, extremamente inteligente e didático. Obrigado por tudo que me ensinou e por ter me ajudado a chegar até aqui. Agradecer também aos membros da banca Líbia Diniz dos Santos, Fabrícia de Matos Oliveira e Joyce Ferreira da Costa Guerra, por terem aceitado o convite e também por terem sido ótimas professoras durante a graduação, sendo também grandes exemplos profissionais. Dessa forma, também gostaria de agradecer a todos os outros docentes do campus, que foram incríveis e ajudaram na minha caminhada de alguma forma, além de todos os técnicos e terceirizados que direta ou indiretamente auxiliaram nesse percurso.

Não poderia deixar de citar meus amigos. Conheci várias pessoas durante o curso, algumas que tive pouco contato, outras que me aproximei mais, e a todas essas pessoas gostaria de dizer “muito obrigado”, a todos que me viram rir ou chorar, vocês foram especiais de alguma forma. Alguns gostaria de especificar, começando com Matheus Carvalho e Amanda Pacífico. Matheus, você esteve muito próximo de mim durante mais de 3 anos que estou aqui. Viu altos e baixos, me apoiou em diversos momentos, dividimos orientadores e sempre foi um ótimo amigo. Obrigado por tudo. Amanda, você foi minha primeira amiga de verdade aqui, a pessoa que eu sempre contei tudo da minha vida e mesmo nos momentos em que estávamos afastados, eu sempre soube que eu podia contar com você. Você é uma pessoa incrível. E eu só desejo todo sucesso do mundo pra vocês dois.

Um agradecimento especial também ao pessoal da minha turma, vários deles se aproximaram de mim em diferentes momentos e fizeram parte da minha formação. Outras turmas também tiveram muita influência na minha vida durante minha formação, dentre elas, a turma 11. Citando principalmente, Flavia Castro, Laura Castro, Vinicius Melo, Eric Coimbra, Fernanda Farisco. Vocês todos foram incríveis comigo, obrigado pelas conversas, roles, companhias. Enfim obrigado por tudo. Ainda dentro dessa turma, gostaria de fazer um agradecimento mais especial a Tallita Stéfanne e Pedro Sgobbi, que nos últimos meses, principalmente quando passei por muitas dificuldades, se aproximaram muito de mim e estiveram do meu lado, me

ajudando de diversas formas. Vocês são incríveis e desejo apenas tudo de melhor pra vocês.

Outra turma incrível é a turma 15, principalmente Maria Clara, Penelopy, Antônio Facciolo, Julia Soares, Isabella Lima, Flavio Ribeiro. Vocês todos estiveram em momentos ótimos e difíceis, sempre do meu lado, sempre me apoiando, me fazendo rir e esquecer dos problemas. Fico muito feliz de poder ter sido veterano de vocês e espero ter sido um bom. Obrigado seus lindos. E também colocar aqui o Victor Bertolani, que conheci na mesma época e não é da turma, obrigado por ser um ótimo amigo e também ter estado por perto em diversos momentos.

E por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer aos meus amigos que estiveram me apoiando mesmo de longe, Mateus Sartori, Gabriel Aruajo, Samila Trindade e vários outros, obrigado por sempre estarem do meu lado, eu amo vocês.

Obrigado a todos vocês. Vocês fizeram parte disso.

RESUMO

Resíduos agrícolas são produzidos em grande quantidade todos os anos no nosso país e nem sempre eles têm um fim apropriado. Levando em consideração que fungos possuem naturalmente a capacidade de desenvolver enzimas que conseguem degradar os compostos destes resíduos, pesquisadores tem tentando desenvolver e otimizar técnicas para gerar produtos a partir destes resíduos. Pensando nisto, este trabalho visou buscar no Parque Municipal do Mocambo um fungo anemofílico com capacidade de produzir pectinases, celulasas e holocelulasas para uma possível aplicação. O fungo isolado destacou-se na produção de xilanases, pectinases e CM-celulasas, principalmente quando cultivado em casca de arroz, cujos valores corresponderam a $0,465 \pm 0,039$; $0,143 \pm 0,032$; e $0,161 \pm 0,030$ (U.L.mL⁻¹ $\pm$ erro padrão), respectivamente. Ensaio de caracterização enzimática parciais, avaliando o efeito da temperatura e pH, revelaram os melhores perfis a 60 °C e pH 4,0. A aplicação das enzimas dos extratos brutos da casca de arroz em ensaios de hidrólise de amostras de bagaço de cana de açúcar apresentou melhor resposta em um material pré-tratado com explosão a vapor, apresentando um pico de conversão de 10,54% de material lignocelulósico em açúcar redutor.

Palavras-chave: Resíduos Agrícolas. Fungos. Anemofílicos. Celulase. Xilanase. Pectinase.

ABSTRACT

Agricultural waste are produced in large amount every year in our country, and not always they have an appropriate purpose. Knowing that fungi naturally possess the ability to develop enzymes that can degrade the compounds of these residues, researchers have been trying to develop and optimize techniques to generate products of value from these residues. This project aimed to search in the Municipal "Parque do Mocambo an anemophilic fungus with the capacity to produce pectinases, cellulases and holocellulases for a possible application. The isolated fungus was distinguished in the production of xylanases pectinases and CM-cellulases, mainly when cultivated in rice hull, whose values corresponded to $0,397 \pm 0,016$, 0.230 ± 0.054 ; and 0.197 ± 0.024 (Umt $1 \pm$ standard error), respectively partial enzymatic characterization tests. Evaluating the effect of temperature and pH, revealed the best profiles at 60°C and pH 4.0 The application of enzymes from the crude extracts of rice hulls in hydrolysis tests of sugarcane bagasse samples showed a better response in a pre treated material with a steam explosion with a conversion peak of 10.54% of lignocellulosic material in reducing sugar

Keywords: Agricultural wastes. Fungi. Anemophiliacs. Cellulase. Xylanase. Pectinase.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ART – Açúcar Redutor Total.

BL – Bagaço de Cana-de-açúcar Lavado.

BEV - Bagaço de Cana-de-açúcar Explodido à Vapor.

CM-Celulase (ou CMC) – Carboximetil-Celulase.

CA – Casca de arroz.

DNS - Ácido 3,5-dinitro-salicílico.

EB - Extrato Bruto

MEB – Morfo-espécie Branca.

Meio BDA - meio sólido Batata-Dextrose-Ágar.

RS – Resíduo completo da soja.

RC – Resíduo do beneficiamento do café.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estatística aplicada às médias aritméticas das atividades enzimáticas produzidas por MEB quando cultivado em diferentes resíduos agrícolas	30
Tabela 2 – Composição bioquímica dos compostos mencionada em por diferentes autores. A composição afeta o desenvolvimento do fungo e a produção de enzimas	30
Tabela 3 – Estatística aplicada às médias aritméticas dos valores de ART obtidos com o ensaio em cada resíduo utilizado	32
Tabela 4 – Estatística aplicada às médias aritméticas dos valores de proteína total obtidos com o ensaio em cada resíduo utilizado.....	35
Tabela 5 – Estatística aplicada às médias aritméticas das atividades enzimáticas produzidas por MEB cultivado em resíduo de arroz quando submetido a variações de temperatura	36
Tabela 6 – Estatística aplicada às médias aritméticas das atividades enzimáticas produzidas por MEB cultivado em casca de arroz em diferentes pH	36
Tabela 7 – Representação dos valores de hidrolise do bagaço de cana-de-açúcar “lavado” e “explodido a vapor”, representados pela dosagem de açúcar redutor total, nos tempos de 0, 12, 24, 38 e 48 horas	39
Tabela 8 – Estatística aplicada às médias aritméticas da atividade hidrolítica de MEB em bagaço de cana-de-açúcar “lavado” e “explodido a vapor”, analisados pelo teste de Turkey para verificar o efeito simples do substrato	39
Tabela 9 – Estatística aplicada às médias aritméticas da atividade hidrolítica de MEB do bagaço de cana-de-açúcar representados pela dosagem de açúcar redutor total, nos tempos de 0, 12, 24, 38 e 48 horas, analisados pelo teste de Turkey para verificar o efeito simples do substrato.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama dos principais componentes da parede celular vegetal e seus prováveis arranjos estruturais.....	14
Figura 2 - Estrutura e sítios de ataque enzimático sobre a celulose. Resíduos de D-glicose são representados pelo círculo vazio; extremidade redutora da cadeia são representados pelo círculo com traço.....	18
Figura 3 - Estrutura e sítios de ataque enzimático sobre o polímero de D-Xilose parte da hemicelulose. Carboidratos são representados por círculos: Círculos verdes = D-Xilose; Amarelo= Ácido Dglicurônico; Vermelho = Arabinose. Em branco: Losango = Grupos fenólicos.....	19
Figura 4 - Estrutura simplificada e sítios de ataque enzimático sobre a pectina. Carboidratos são representados por círculos: Cinza = D-galacturônico, ácido; amarelo = D-glicurônico; vermelho = Darabinose, azul = galactose; rosa = resíduos de açúcar indefinidos; cinza riscado = extremidade redutora da cadeia. Quadrado azul = Grupo metil.....	19
Figura 5 - Placa de Petri contendo meio BDA, aberta no interior da mata de galeria do Parque Municipal do Mocambo.....	26
Figura 6 - Verso da placa de Petri contendo meio BDA, onde foram visualizadas diversas morfoespécies (fungos e bactérias), após incubação a temperatura ambiente (~25°C) por 7 dias.....	26
Figura 7 - Anverso de placa de Petri mostrando um repique do isolado MEB, crescido em meio BDA, após 5 dias de incubação à temperatura ambiente (~25°C)	26
Figura 8 - Microscopia óptica de porção da grande colônia de MEB disposta em lâmina microscópica, corado com solução de azul de metileno 0,2% (v/v). Aumento de 100x.....	27
Figura 9 - Resíduos de arroz, soja e café, respectivamente. Na parte de cima, estão os resíduos antes do processamento, em baixo, após.....	28
Figura 10 - MEB após 5 dias de cultivo em resíduo agrícola de soja.....	29
Figura 11 - MEB após 5 dias de cultivo em resíduo agrícola de arroz.....	29
Figura 12 - MEB após 5 dias de cultivo em resíduo agrícola de café.....	29
Figura 13 - Atividades enzimáticas (xilanase, pectinase e CM-celulase) dos extratos brutos obtidos após cultivo do isolado MEB em resíduos agrícolas (casca de arroz, resíduo completo da soja e resíduo do beneficiamento do café), após incubação por 5 dias à temperatura ambiente (~25°C).....	30
Figura 14 - Dosagem de ART dos extratos brutos enzimáticos, produzido pelo isolado MEB durante o cultivo nos resíduos agrícolas (casca de arroz, resíduo completo da soja e resíduo do beneficiamento do café). O teor de ART em mg.mL ⁻¹ foi obtido pelo método do DNS.....	33
Figura 15 - Determinação de proteína total dos extratos brutos enzimáticos, produzido pelo isolado MEB durante o cultivo nos resíduos agrícolas (casca de arroz, resíduo completo da soja e resíduo do beneficiamento do café). A dosagem de proteína total em mg.mL ⁻¹ foi obtido pelo método de Bradford.....	35
Figura 16 - Influência da temperatura na atividade das enzimas presentes no extrato bruto enzimático produzido por MEB após cultivo no resíduo casca de arroz. Os ensaios enzimáticos foram realizados conforme descrito no item 3.5, variando apenas	

a temperatura de incubação de 30°C a 80°C, no período de 30 min. As demais etapas seguiram conforme descrito.....	36
Figura 17 - Influência do pH na atividade das enzimas presentes no EB enzimático produzido por MEB após cultivo no resíduo casca de arroz. Os ensaios enzimáticos foram realizados conforme item 3.5, ajustando dentro do volume final de reação (75 µL), a inclusão do volume de 37,5 µL de cada tampão testado: acetato de sódio (4,5), fosfato de sódio (6,5) e Tri-HCl (8,0), todos a 0,1 mol.L-1. As demais etapas seguiram conforme descrito.....	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Resíduos agrícolas	12
2.2 Fungos	14
2.3 Enzimas	16
3 OBJETIVOS	19
3.1 Objetivos gerais	19
3.2 Objetivos específicos	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Resíduos agrícolas	19
4.2 Pré-tratamento dos resíduos agroindustriais.....	20
4.3 Isolamento, manutenção e identificação dos fungos.....	20
4.4 Cultivo do isolado e produção de enzimas lignocelulolíticas.....	21
4.5 Quantificação das atividades enzimáticas [xilanase, pectinase e endoglucanase (CM-celulase) dos extratos brutos]	21
4.6 Dosagem de açúcares redutores totais.....	23
4.7 Determinação da concentração de proteína total.....	23
4.8 Efeito da temperatura.....	23
4.9 Efeito do pH	23
4.10 Teste de hidrólise enzimática em bagaço de cana-de-açúcar	23
4.11 Análises estatísticas.....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
6 CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

A sociedade e por consequência a indústria tem buscado de maneira crescente por formas mais limpas de produção, evitando danos ambientais, mas sem prejudicar a produtividade. A biotecnologia tem surgido nesse novo cenário como um divisor de águas, buscando em recursos naturais formas limpas e inovadoras para resolver dilemas do mundo contemporâneo.

Uma maneira de produzir de forma mais limpa, que tem ganhado espaço em diversas áreas da indústria, é a utilização de enzimas, substituindo catalisadores e outros produtos químicos, proporcionando resultados eficientes que diminuem o impacto ambiental. As enzimas estão presentes em todos os seres vivos e por isso são facilmente encontradas, porém nem sempre é fácil extrair-las e estudá-las. Neste sentido, fungos capazes de liberar enzimas em um substrato ganharam destaque, facilitando o processo de extração destes catalisadores. Outro motivo pelo qual os fungos têm se destacado, não apenas como fontes de enzimas, mas em geral, é pelo fato de boa parte das espécies do reino *Fungi* ainda não estarem descritas, tornando esse estudo ainda mais interessante.

Sabe-se que fungos são ubíquos, presente em todos os lugares, ou seja, apresentam vantagem para se desenvolverem em diferentes substratos. Para este trabalho, foi isolado do ar atmosférico um fungo, identificado preliminarmente como MEB – Morfoespécie Branca, o qual foi cultivado em resíduos de culturas agrícolas. Os resíduos agrícolas constituem ricas fontes de carbono, presente em complexas estruturas da parede celular vegetal. Estes funcionam como substrato para a produção de enzimas pelo fungo, além de representar um destino útil para estes resíduos que, apesar de serem facilmente degradados, ainda são uma forma de poluição no ambiente.

Assim, buscou-se com este trabalho, isolar fungos do ar atmosférico do interior do Parque Municipal do Mocambo, uma área de preservação permanente local, com capacidade de produzir enzimas de interesse industrial através do cultivo em resíduos agrícolas e então fazer a caracterização destas enzimas visando uma futura aplicabilidade nas diferentes biorrefinarias.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Resíduos agrícolas

Resíduos agrícolas são materiais fibrosos, constituídos basicamente por polímeros de glicose e lignina que provém de biomassa vegetal e são formados, direta ou indiretamente a partir da fotossíntese. A biomassa vegetal constitui o recurso biológico e renovável mais abundante no nosso planeta (KIRAN, et al., 2014; PEREIRA JÚNIOR et al., 2008; ZHANG e LYND, 2004).

A produção destes resíduos tem crescido a cada ano, sendo necessário encontrar formas de aproveitamento dessa biomassa lignocelulósica, evitando a acumulação desse material na natureza. (BOMTEMPO et al., 2017a). Os resíduos lignocelulósicos da madeira, capim, resíduos agrícolas, florestais e resíduos sólidos urbanos têm potencial para bioconversão e a acumulação desses materiais resulta na deterioração do ambiente. Somado a isso, existe uma perda de material com grande potencial que pode ser usado na fabricação do papel, na produção de biomassa, na compostagem, na alimentação humana e animal entre outras (SÁNCHEZ, 2009).

Resíduos como o bagaço de cana de açúcar são produzidos em grande quantidade no país. Na safra de 2015/16, por exemplo, os 665,6 milhões de toneladas de cana colhidas geraram 166,4 milhões de toneladas (mi t) de bagaço (IEA, 2017). A casca de arroz também é outro resíduo gerado. Dados da safra de 2010/11 mostram que foram produzidos 13,3 mi t de arroz, sendo o Rio Grande do Sul foi responsável pela produção de 9 mi t, das quais 1,9 mi t foram representados por resíduos (LUZZIETI et al., 2013; LIPPEL, 2018). No mesmo estado, em 2010, haviam cerca de 600.000 t de casca de arroz “sem utilidade definida” e expandindo pelo País, o número aumenta para um milhão de toneladas (BRASIL, 2013).

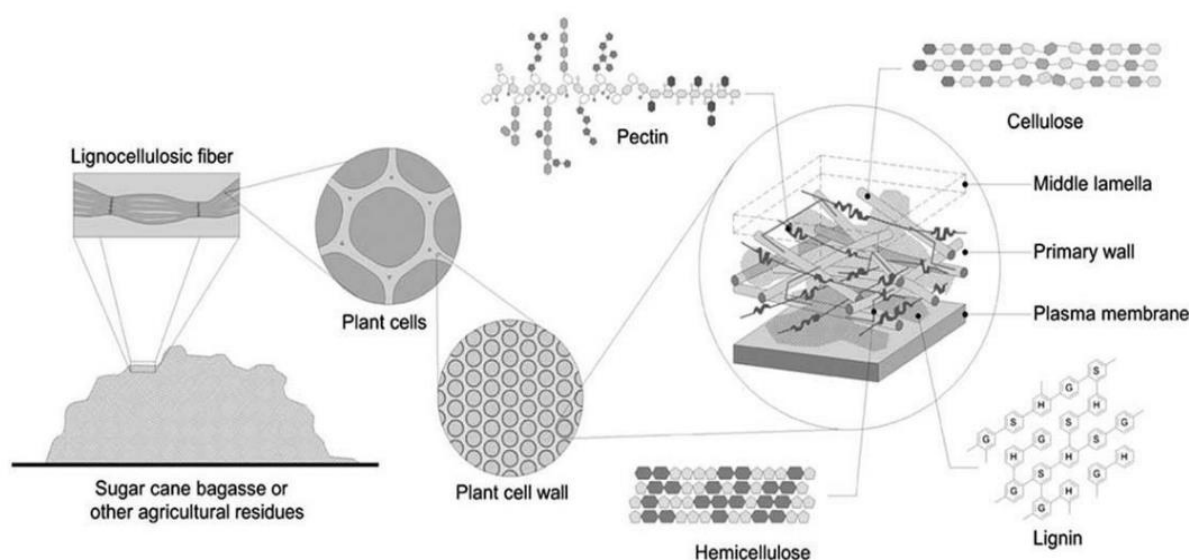
Uma grande quantidade de fungos e bactérias conseguem degradar esses compostos usando enzimas hidrolíticas e oxidativas. Os resíduos agrícolas se tornam então uma boa fonte de nutrientes para microrganismos, já que requerem a produção de várias enzimas para degradar as macromoléculas ali presentes, como celulasas, hemicelulasas e pectinases. (SÁNCHEZ, 2009). Dentre a microbiota, os fungos são os mais explorados comercialmente. Isto porque secretam altos níveis de proteína,

chegando a mais de 100 g.L⁻¹ e além de suas enzimas atuarem naturalmente sobre os resíduos lignocelulósicos (CHUNDAWAT et al., 2011).

De acordo com Siqueira et al. (2010), procedimentos que visam otimizar a produção de holocelulases e pectinases fúngicas requerem uma fonte de carbono de baixo custo, e por isso utilizaram em seu trabalho resíduos das culturas do algodão e da banana para este fim.

Um dos resíduos que mais chama a atenção no sentido de potencialidade para reaproveitamento é a palha de cana de açúcar. Isso por que ela apresenta potencial tanto para produção de calor, eletricidade e para gera o etanol celulósico (SANTOS et. al., 2012). Entretanto, mesmo com essas capacidades, tem-se dificuldade de se degradar estes polímeros, pois eles possuem uma forte interação intermolecular e total ausência de água em sua estrutura (**Figura 1**). Somado a isso, a macromolécula lignina recobre a celulose e a hemicelulose, tornando a estrutura muito recalcitrante, ou seja, questões morfológicas e químicas das paredes celulares dificultam sua reatividade (FENGEL, 1985).

Figura 1 - Diagrama dos principais componentes da parede celular vegetal e seus prováveis arranjos estruturais.



Fonte: Siqueira e Filho (2010).

Detalhando um pouco mais essa estrutura, “as hemiceluloses são heteropolissacarídeos complexos, compostos por D-glucose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metil-glucurônico. São mais semelhantes à celulose do que a lignina e sua estrutura apresentam ramificações que

interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado” (SANTOS et al., 2012).

Enquanto a celulose é o polímero natural em maior quantidade na Terra e apresenta uma estrutura extremamente complexa, a lignina, a segunda macromolécula mais encontrada no planeta, é um heteropolímero amorfo, sendo a principal barreira para a atividade enzimática acontecer na celulose e na hemicelulose (DING e HIMMEL, 2006; LU et al., 2002).

2.2 Fungos

Fungos são organismos eucarióticos ubíquos e podem ser saprófitos ou parasitas, sendo que os primeiros obtêm nutrientes da matéria orgânica em decomposição e os últimos sequestram nutrientes de um hospedeiro vivo (POWERS-FLETCHER et al., 2016). Além disso, podem ser unicelulares ou multicelulares, se apresentando como leveduras ou fungos filamentosos (OXFORD DICTIONARIES, 2017). Esses filamentos são formados por hifas que podem crescer com ou sem separação de compartimentos celulares, que é conhecido como septação (POWERS-FLETCHER et al., 2016). Alguns pesquisadores acreditam que existem cerca de 15 milhões de espécies fúngicas, enquanto outros teorizam a existência de aproximadamente 8,25 milhões de espécies, porém só foram descritas de fato aproximadamente 100 mil (ABREU, 2014).

Como seres heterótrofos, os fungos conseguem absorver seus nutrientes graças a presença de diversas enzimas que vão degradar os diferentes produtos que servirão de alimento para aquele organismo, como por exemplo, celulose. Graças a suas características semelhantes a animais e plantas, como o fato de serem eucariotos, fungos têm sido empregados em estudos sobre genética e, a partir disto, como fonte de diversos produtos para indústria farmacêutica, de alimentos, têxtil, agrícola, ambiental, tratamento de efluentes, entre outros (AZEVEDO, 2017; ABREU et al., 2014). Outro motivo de serem amplamente utilizados, é devido à sua facilidade de cultivo, além de secretarem suas enzimas diretamente no meio sem precisar de ruptura celular para sua liberação. Em acréscimo, uma grande quantidade de enzimas produzidas por fungos apresenta valor industrial (STROPARO et al., 2012).

Como seres ubíquos, o ar atmosférico torna-se um bem-sucedido meio de dispersão para estes organismos. Estes se propagam tanto por esporos quanto fragmentos de micélio, fazendo com que seja possível coletar espécies fúngicas até mesmo no ar, espécies essas chamadas de anemofílicas (LOBATO et al., 2009). Neste caso, eles estão presentes nos chamados bioaerosóis, partículas dispersas no ar que variam o tamanho entre 0,3 a 100 μm e podem conter pólen, bactérias, subprodutos celulares ou elementos fúngicos (CABRAL, 2010). Os conídios fúngicos constituem boa parte desse material e as suas concentrações sofrem influências, tanto ambientais, quanto físicas, além de outros fatores que podem aumentar a quantidade desses fungos no ar (BOFF e PASQUALOTTO, 2011).

De acordo com Martins-Diniz et al. (2005), “fungos apresentam variações muito amplas em sua incidência, de acordo com a estação do ano, temperatura, umidade relativa do ar, hora do dia, velocidade e direção dos ventos, presença de atividade humana e tipo de climatização dos ambientes”.

Em outros trabalhos realizados no país, em diferentes regiões e locais, foram feitas coletas de fungos anemofílicos, ocorrendo a presença principalmente dos gêneros *Alternaria* spp, *Aspergillus* spp, *Cladosporium* spp, *Curvularia* spp, *Fusarium* spp e *Penicillium* spp. Também foi comum o aparecimento dos gêneros *Rhizopus* spp, *Acremonium* spp, *Scopulariopsis* spp e de fungos estéreis ou não esporulados (MEZZARI et al., 2003; MARTINS-DINIZ et al., 2005; LOBATO et al., 2009; BOFF e PASQUALOTTO, 2011; MARTINS, 2014; SILVA et al., 2017). Dentre esses, alguns gêneros têm importantes aplicações biotecnológicas, como o *Aspergillus* spp, que tem sido utilizado para a expressão de proteínas recombinantes como glicoamilase, quimosina bovina, lactoferrina humana (LOBATO et al., 2009). Espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Cladosporium* são produtores também da enzima Lacase, que vem sendo utilizada para aplicações na indústria de papel, têxtil e alimentícia, além de outras possíveis funções também investigadas (COUTO e HERRERA, 2006).

2.3 Enzimas

As enzimas têm recebido grande enfoque quanto a processos industriais e por isso têm assumido expressivo valor biotecnológico. Isso porque enzimas são catalisadores naturais encontrados em todos os seres vivos (AHUJA, 2004). A tecnologia enzimática pode ainda mostrar novas possibilidades para métodos limpos,

onde outros métodos falham devido à toxicidade ou natureza recalcitrante do poluente (TROMBLY, 1995).

Um exemplo são as celulasas, enzimas amplamente utilizadas na indústria têxtil, como para modificação de fibras e tecidos celulósicos, produzindo propriedades como lavagem de pedra, pele de pêssego e efeitos de bioacabamento. O fungo *Trichoderma reesei* possui enzimas de degradação da celulose muito conhecidas e estudadas, além de serem aplicadas em processos definidos. O sistema celulolítico desse fungo é composto por duas celobiohidrolases (CBHI e CBHII), pelo menos seis endoglucanases e duas β -glucosidases (HEIKINHEIMO, 2002).

Entretanto, essas enzimas geralmente são aplicadas em conjunto com outras várias enzimas, ou seja, mistura enzimática de atuação sinérgica. Segundo Castro e Pereira-Jr (2010), atuação sinérgica de enzimas é quando estas, em conjunto, têm um melhor rendimento do que a soma de suas atividades separadas.

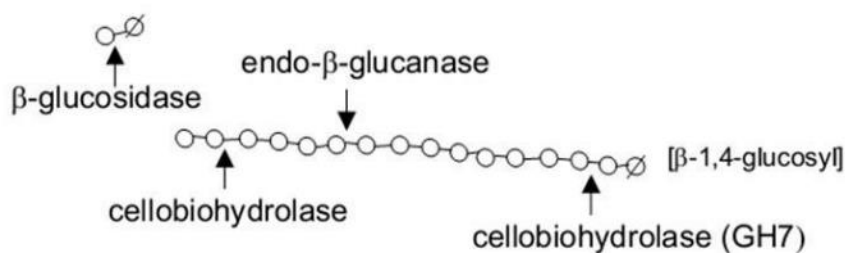
As celulasas, por exemplo, também têm sido muito utilizadas em estudos para a hidrólise enzimática da celulose presente em materiais como a cana de açúcar, para que sejam gerados açúcares redutores passíveis de serem convertidos em etanol (BOMTEMPO et al., 2017). Trabalhos utilizando um conjunto de enzimas nestes estudos tem demonstrado um aumento na rentabilidade dos processos produtivos, como por exemplo o uso de celulasas e hemicelulasas, o que é justificado pelo fato de as hemicelulasas serem capazes de retirar a hemicelulose, que recobre a celulose facilitando sua degradação (BERLIN et al., 2005). Hernández-Salas et al. (2009) verificaram em seu estudo com bagaço de cana e agave que a utilização sinérgica de enzimas teve um rendimento maior do que a utilização de enzimas isoladas para a degradação da biomassa celulósica. As xilanases e pectinases são exemplos de enzimas acessórias à celulase que podem aumentar o rendimento de produção de açúcares redutores (DODD e CANN, 2009; ZHANG et al., 2009).

A xilanase sozinha tem sido utilizada em processos de otimização de *Biopulping*, além de realizar o bio-branqueamento, sendo neste caso de extrema importância que a mesma atue sozinha, uma vez que atividade celulolítica pode causar dano à polpa (WHALIA et al., 2017). Outros estudos têm demonstrado que realizar o pré-branqueamento de papel utilizando xilanase é uma forma ecológica e economicamente viável de diminuir a quantidade de compostos como o dióxido de cloro no processo e atingir uma grande eficácia no resultado final (KHONZUE et al., 2011; WHALIA et al., 2017).

As pectinases também podem trabalhar na fabricação de papel, despolimerizando substâncias pécicas e diminuindo a demanda de cátions das soluções pécicas e do filtrado resultante do branqueamento com peróxido (UENOJO e PASTORE, 2007). Mas essa enzima vê sua principal utilização na indústria de alimentos, aumentando o rendimento da extração e clarificação de sucos durante as etapas de prensagem, decantação e remoção de partículas em suspensão (FILHO et al., 2004).

Tanto as celulasas, quanto as xilanases e pectinases são divididas em diferentes enzimas específicas dependendo do local de ação da mesma. Para a celulose, composta por unidades de β -D-glicopirranose, ligadas por ligações β - (1 $\rightarrow$ 4) -glicosídicas, essa divisão é feita em 3 grupos: endoglucanases; celobiohidrolases e exoglucanases; e β -glucosidases (ZHANG et al., 2006) (**Figura 2**). As primeiras catalisam a clivagem aleatória de ligações internas na cadeia de celulose, já as celobiohidrolases atacam as extremidades, liberando celobiose e por fim as β -glucosidases atuam apenas em cello-oligossacarídeos e celobiose, liberando glicose (Turner et al., 2007; Wood et al., 1990).

Figura 2 - Estrutura e sítios de ataque enzimático sobre a celulose. Resíduos de D-glicose são representados pelo círculo vazio; extremidade redutora da cadeia são representados pelo círculo com traço.

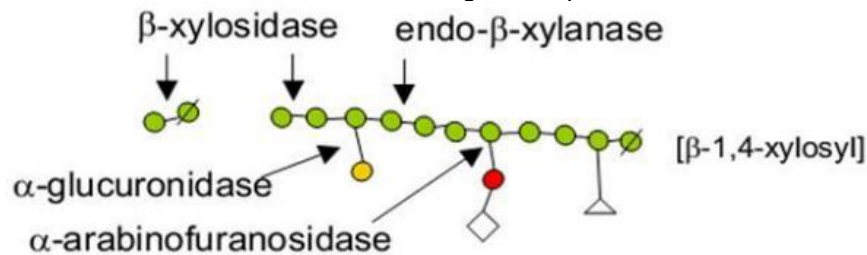


Fonte: Adaptado de Turner et al. (2007).

A hemicelulose é um heteropolímero composto por vários açúcares, inclusive por D-Xilose. Para a degradação deste açúcar estão presentes as endo-1,4- β -xilanase, β -xilosidase, α -glucuronidase, α -L arabinofuranosidase (e acetilsilanil esterase (TURNER et al., 2007) (**Figura 3**). A composição da pectina é complexa, contendo regiões de ácido homo-galacturônico e regiões de L-ramnose e ácido galacturônico, com cadeias laterais neutras de açúcar compostas por L-ramnose,

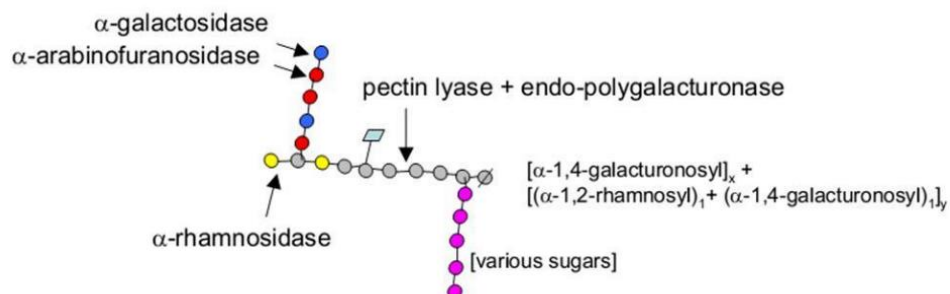
arabinose, galactose e xilose, e por isso, diversas enzimas são responsáveis por clivar esta estrutura, sendo a comumente chamada de pectinase a endo-poligalacturonase (KASHYAP et al., 2001, TURNER et al., 2007) (**Figura 4**).

Figura 3 - Estrutura e sítios de ataque enzimático sobre o polímero de D-Xilose parte da hemicelulose. Carboidratos são representados por círculos: Círculos verdes = D-Xilose; Amarelo= Ácido D-glicurônico; Vermelho = Arabinose. Em branco: Losango = Grupos fenólicos.



Fonte: Adaptado de Turner et al. (2007).

Figura 4 - Estrutura simplificada e sítios de ataque enzimático sobre a pectina. Carboidratos são representados por círculos: Cinza = D-galacturônico, ácido; amarelo = D-glicurônico; vermelho = D-arabinose, azul = galactose; rosa = resíduos de açúcar indefinidos; cinza riscado = extremidade redutora da cadeia. Quadrado azul = Grupo metil.



Fonte: Adaptado de Turner et al. (2007).

Dessa forma então, pode-se perceber que enzimas são pertinentes de serem pesquisadas e utilizadas, visto que são facilmente encontradas e pouco prejudiciais ao ambiente, além de já serem comprovadamente úteis para processos industriais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Este trabalho objetivou isolar um fungo filamentoso do ar atmosférico e verificar suas potencialidades na produção de enzimas importantes na degradação da biomassa vegetal lignocelulósica, quando cultivados em resíduos de safras agrícolas.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar fungos filamentosos do ar atmosférico;
- Estabelecer o potencial de produção de enzimas lignocelulolíticas;
- Determinar os resíduos mais promissores na indução da atividade enzimática e caracterizar parcialmente as atividades dessas enzimas;
- Caracterizar parcialmente as enzimas produzidas, quanto aos efeitos da temperatura e pH;
- Aplicar as enzimas produzidas em atividades de hidrólise da biomassa vegetal lignocelulósica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado nos Laboratórios de Microscopia e de Bioquímica e Biologia Molecular do Campus Patos de Minas da Universidade Federal Uberlândia, Patos de Minas/MG.

4.1 Resíduos agrícolas

As fontes residuais de biomassa lignocelulósica foram adquiridas juntamente a produtores rurais ou gentilmente fornecidas por empresas locais de beneficiamento de grãos. Os resíduos agrícolas estudados foram casca de arroz, resíduos da cultura

da soja (contendo partes aéreas da planta, caules, folhas, legumes e alguns grãos) e resíduos do beneficiamento do café (pericarpo e endocarpo).

4.2 Pré-tratamento dos resíduos agroindustriais

Os resíduos foram, separadamente, triturados em liquidificador doméstico ou processador de alimentos para homogeneizar o tamanho médio das partículas de cada resíduo em torno de 2,0 mm.

4.3 Isolamento, manutenção e identificação dos fungos

Amostras de fungos foram obtidas no interior do Parque Municipal do Mocambo (18°36'05"S e 46°31'13"W). Localizado no perímetro urbano da cidade de Patos de Minas/MG, o Parque possui área de 17 hectares, sendo 1,76 hectares representados por um remanescente de Mata de Galeria (LONDE et al., 2012).

Os fungos foram isolados do habitat "ar atmosférico" do interior da Mata de Galeria do Parque Municipal do Mocambo, por meio da abertura de 1 placa de petri (15 cm de Ø) contendo meio sólido Batata-Dextrose-Ágar (BDA) (m/v) [caldo de batata 2,0%, dextrose 1,0% e ágar 2,0%] devidamente preparada em momento anterior. A placa aberta foi colocada na superfície do solo, do interior da Mata, por um período de 30 minutos. Após o período, a placa foi devidamente lacrada com filme plástico.

A placa de Petri foi conduzida ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Campus Patos de Minas-UFU, e incubada por 7 dias a temperatura ambiente (~25°C), fazendo-se o acompanhamento do crescimento dos indivíduos fúngicos a cada 24 h. Por fim, a placa foi fotografada e mantida à 4°C para conservação.

A manutenção dos isolados foi realizada em meio BDA, por meio de repiques sucessivos a cada 21 dias.

A etapa de identificação taxonômica e filogenética do isolado será realizada posteriormente, por meio da atividade de colaboração de grupos parceiros, os quais procederão com metodologias específicas para este propósito.

Análises microscópicas foram realizadas por meio da retirada de pequena porção da colônia do fungo isolado, com o auxílio de palitos de madeira autoclavados ou alça flambada, a qual foi colocada na superfície de uma lâmina microscópica devidamente preparada. Como tentativa de visualização de estruturas fúngicas, fez

uma coloração por meio da adição de 0,05 mL de solução corante Azul de Metileno 0,2 % (m/v) em água destilada. A amostra foi coberta com lamínula limpa, visualizada em microscópio óptico (Marca Leica; Modelo ICC50 HD), utilizando aumento de 1000x; as imagens microscópicas foram obtidas por meio do *software* Leica Application Suite (LAS) EZ Version 3.3.

4.4 Cultivo do isolado e produção de enzimas lignocelulolíticas

O isolado fúngico foi submetido a cultivo em estado sólido, realizado em frasco tipo *Erlenmeyer* de 125 mL, contendo 2,5 g de resíduos pré-tratados de acordo com o item 4.2. Após pesados, os resíduos foram umedecidos com 5 mL de meio líquido suplementado (m/v) [KH_2PO_4 0,7%, K_2HPO_4 0,2%, MgSO_4 e $7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1%, extrato de levedura 0,06%; pH 7,0 ajustado com solução de KOH $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$], utilizado em cultivos submersos. O teor de umidade alcançado ficou próximo a 65% conforme estabelecido por Kerem et al. (1992). Os frascos foram fechados com rolhas de algodão, cobertos com papel tipo *kraft* e autoclavados a 121°C por 25 min.

O inóculo utilizado nos cultivos correspondeu a 5 discos (5 mm de Ø) retirados de repiques do isolado em placas de petri contendo meio BDA, os quais foram assepticamente transferidos para os *Erlenmeyers*, conforme proposto por Alexandrino et al. (2007). O cultivo foi realizado em temperatura ambiente por 5 dias sem agitação. Após o período de cultivo, foi realizada a extração das enzimas produzidas pelo isolado, por meio da adição de 25 mL de meio líquido suplementado, em cada frasco de cultivo, sendo misturados com agitação manual e auxílio de um bastão de vidro. Os extratos foram filtrados a vácuo em funil de *Büchner* com papel de filtro comum. Aos filtrados, denominados Extratos Brutos, foi adicionada azida sódica 0,02% (m/v), antes de serem armazenados a 4°C e, posteriormente, utilizados como fonte de enzimas em ensaios subsequentes.

4.5 Quantificação das atividades enzimáticas: xilanase, pectinase e endoglucanase (CM-celulase)] dos extratos brutos

Os ensaios enzimáticos para xilanase, pectinase e CM-celulase foram realizados pela reação de 1 volume de solução de enzimas (25 μL) dos extratos brutos

com 2 volumes das respectivas soluções de substratos (50 μL) a 1,0% (m/v) [xilana de aveia, pectina e carboximetil-celulose], incubados a 50°C por 30 min., conforme estabelecido por Filho et al. (1993). Após cada período de incubação, as reações foram interrompidas pela adição de 150 μL de solução de ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) (m/v) [ácido 3,5-dinitro-salicílico 1,0%, NaOH 16% e tartarato de sódio e potássio (4H₂O) 30%; diluídos em água destilada], e novamente incubadas em água fervente por 10 min. Em seguida, fez-se a adição de 750 μL de água destilada, seguido de breve agitação manual. A quantidade de açúcar redutor liberado (miligramas) em cada ensaio foi dosada pela leitura da absorbância a 540 nm (MILLER, 1959), em espectrofotômetro (Gehaka UV-349G). Curvas de calibração para D-xilose, ácido D-galacturônico e D-glicose foram preparadas, anteriormente, para concentrações finais de 0,2 a 1,2 mg.mL⁻¹. Uma unidade de atividade enzimática (UI.mL⁻¹) foi definida como a quantidade de açúcar redutor liberado na unidade de tempo por mililitro (μmol de açúcar redutor.min⁻¹.mL⁻¹).

4.6 Dosagem de açúcares redutores totais

A dosagem de açúcares redutores totais presentes nos extratos brutos enzimáticos foi realizada utilizando a solução de DNS do item anterior. Neste ensaio, foi pipetado nos tubos 75 μL dos extratos brutos, adicionados de 150 μL da solução de DNS. A mistura foi incubada por 10 minutos em água fervente. Em seguida, adicionou-se 750 μL de água destilada e procedeu-se com a leitura da absorbância em espectrofotômetro à 540 nm. Com os valores de absorbância e a calibração de DNS para D-glicose, foi possível obter a concentração de açúcar redutor total, expressa em mg.mL⁻¹.

4.7 Determinação da concentração de proteína total

A concentração de proteína total dos extratos brutos enzimáticos foi determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976). Foi efetuada a dosagem pela adição de 100 μL de cada extrato bruto e 1,0 mL do reagente de Bradford [100 mg Coomassie Blue G-250, 50 mL de etanol 95% (v/v) e 100 mL de ácido fosfórico 85% (v/v)]. A mistura foi posteriormente incubada à temperatura

ambiente por 10 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 595nm. Os valores das absorbâncias foram inseridos em gráfico contra a curva de calibração, variando de 0 a 100 µg/100µL, a partir de uma solução de albumina sérica bovina (albumina bovina fração V, grau padrão, INLAB Brasil) 10 mg.mL⁻¹ diluída em NaCl 0,15 mol.L⁻¹, utilizada como proteína de referência.

4.8 Efeito da temperatura

O ensaio enzimático foi realizado conforme descrito no item 4.5, alterando apenas a temperatura de incubação no intervalo de 30 min de cada ensaio enzimático, nas temperaturas de 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C.

4.9 Efeito do pH

O efeito do pH foi determinado por meio da dosagem das atividades enzimáticas propostas em diferentes pHs, à 50°C, utilizando os tampões acetato de sódio (4,5), fosfato de sódio (6,5) e Tri-HCl (8,0), todos a 0,1 mol.L⁻¹. O ensaio enzimático foi realizado conforme já descrito no item 4.5, alterando apenas o pH com o meio tamponante assim como o volume de enzima e substrato a serem utilizados no teste. Para manter o mesmo volume final e a mesma proporção de enzima e substrato (1:2), foi utilizado no ensaio 0,5 volume de enzima (12,5 µL) e 1 volume de substrato (25 µL), assim como 37,5 µL de cada tampão, mantendo o volume final de 75 µL.

4.10 Teste de hidrólise enzimática em bagaço de cana-de-açúcar

A hidrólise produzida pelo extrato bruto do resíduo do beneficiamento do arroz, o extrato que apresentou melhor produção enzimática, foi testada em dois diferentes bagaços de cana-de-açúcar, sendo um bagaço de cana –de-açúcar lavado e outro, submetido a uma etapa de pré-tratamento de explosão a vapor. Foram separados 21 tubos falcon de 50 mL, sendo que destes, 5 para bagaço lavado (BL), 5 foram usados para teste com bagaço explodido a vapor (BEV), 5 para o branco da enzima, 3 para branco substrato BL, 3 para o branco substrato BEV.

A preparação dos tubos contou com a adição de 40 mg dos bagaços, 2 mL de extrato bruto enzimático, 3 mL de tampão acetato de sódio, pH 4,5 e 1 mL de água. Para os brancos da enzima, os 40 mg de bagaço foram substituídos por 40 µL de água destilada, enquanto nos brancos substratos, os 2 mL de extrato bruto foram substituídos por 2 mL de água destilada.

Os tubos foram incubados em um shaker por 2 dias, a uma velocidade de 120 rpm e temperatura de 50°C. A partir do tempo 0, a cada 12 horas foram retiradas alíquotas de 300µL até que se completasse 48 para que fossem realizados testes de açúcar redutor total (tópico 4.6.).

Todos os ensaios descritos acima foram realizados em triplicata com controles apropriados incluídos para cada um dos experimentos.

4.11 Análises estatísticas

Foi realizada análise de variância com um fator a vários níveis (*One-way ANOVA*), com um nível de significância igual a 5% ($\alpha=0,05$) para verificar se houve diferença entre tratamento e entre fatores. Quando as interações entre os fatores foram significativas, procedeu-se com o desdobramento para estudar o efeito de um fator na presença de outro, caso contrário, foram estudados os fatores de forma independente. Havendo diferenças entre os tratamentos, foi feito o teste de Scott-Knott e Turkey para verificar a maior média, tudo a nível de significância de 5%. Toda a análise estatística foi executada utilizando o programa R version 3.4.4 (2018-03-15) - "Someone to Lean On" - Copyright (C) 2018 The R Foundation for Statistical Computing.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foi descrito o isolamento de um indivíduo fúngico, a partir de uma placa de Petri, contendo meio BDA, exposta ao ar atmosférico do interior do remanescente de Mata de Galeria do Parque Municipal do Mocambo. Após a exposição da placa ao ar atmosférico (**Figura 5**) e o período de incubação, foram observados diversos indivíduos fúngicos e algumas colônias de bactérias

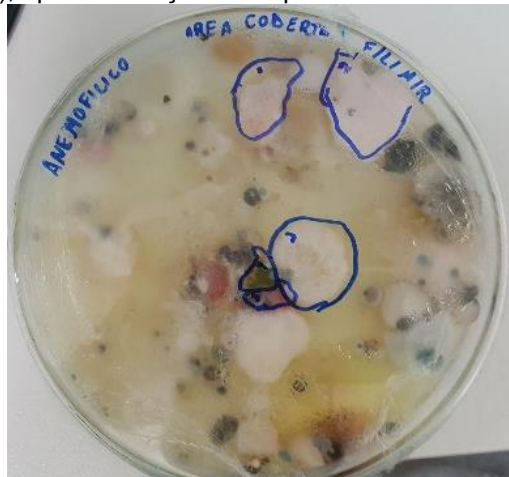
(identificação ainda não realizada) (**Figura 6**). O fungo escolhido, designado inicialmente por Morfoespécie Branca (MEB), foi um dos que ocupou maior espaço na placa, coloração branca e textura algodonosa (**Figura 7**), tendo um relevo constante e crescimento regular e representa a morfoespécie número dois mostrada na **Figura 6**.

Figura 5 - Placa de Petri contendo meio BDA, aberta no interior da mata de galeria do Parque Municipal do Mocambo.



Fonte: Autor (2018).

Figura 6 - Verso da placa de Petri contendo meio BDA, onde foram visualizadas diversas morfoespécies (fungos e bactérias), após incubação a temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) por 7 dias.



Fonte: Autor (2018).

Figura 7 - Anverso de placa de Petri mostrando um repique do isolado MEB, crescido em meio BDA, após 5 dias de incubação à temperatura ambiente (~25°C).



Fonte: Autor (2018).

Após a caracterização macroscópica da grande colônia em placa de Petri, foram feitas tentativas de visualização de caracteres microscópicos presentes na grande colônia, visando uma possível identificação do gênero a que o fungo pertencia, ou até mesmo a espécie. Nesse ensaio, foi identificado a presença de hifas septadas, ramificadas e hialinas pela coloração de porção micelial do fungo, com solução azul de metileno 0,2% (v/v), diluída em água destilada (**Figura 8**). Entretanto, até o presente momento, não foi verificado a presença de estruturas reprodutivas, como esporos ou hifas diferenciadas, dificultando a identificação da morfoespécie. Devido a isso, não foi possível realizar uma identificação mais precisa da MEB, uma vez que a estrutura reprodutiva é extremamente importante nessa etapa.

Figura 8 - Microscopia óptica de porção da grande colônia de MEB disposta em lâmina microscópica, corado com solução de azul de metileno 0,2% (v/v). Aumento de 100x.



Fonte: Autor (2018).

Com base em caracteres preliminares apresentados pela MEB, buscou-se na literatura, informações de outros autores que também trabalharam com indivíduos fúngicos anemofílicos isolados de maneira semelhante à utilizada nesse estudo. Segundo Sidrim et al. apud Boff e Pasqualotto (2011), o gênero *Fusarium* possui algumas características semelhantes ao isolado MEB, como por exemplo o crescimento rápido, colônias algodonosas e com diferentes colorações, podendo ser também da cor branca. O gênero *Rhizopus* também apresenta crescimento rápido, textura algodonosa e coloração branca. Entretanto, no isolado MEB, não foi perceptível alteração de cor para amarelo ou cinza com o passar do tempo, conforme acontece com os fungos desse gênero. Por fim, outro gênero que foi encontrado como anemofílico, com características semelhantes, é o *Mucor*, também branco e textura algodonosa, que adquire uma coloração acinzentada conforme o aparecimento dos esporângios (UNIVERSITY OF ADELAIDE, 2016).

Na literatura, encontram-se relatos de fungo anemofílicos não-esporulados. Lobato et al. (2009) realizaram um trabalho em um hospital do município do Rio Grande do Sul, onde das 104 amostras realizadas, foram encontrados fungos não-esporulados em 75 % destas. No trabalho de Boff et al. (2011) no município de Porto Alegre, também foram encontrados fungos não-esporulados no ambiente hospitalar estudado.

Posteriormente ao isolamento e a realização de novos repiques, o isolado foi submetido a cultivos em estado sólido, utilizando os resíduos agrícolas descritos no

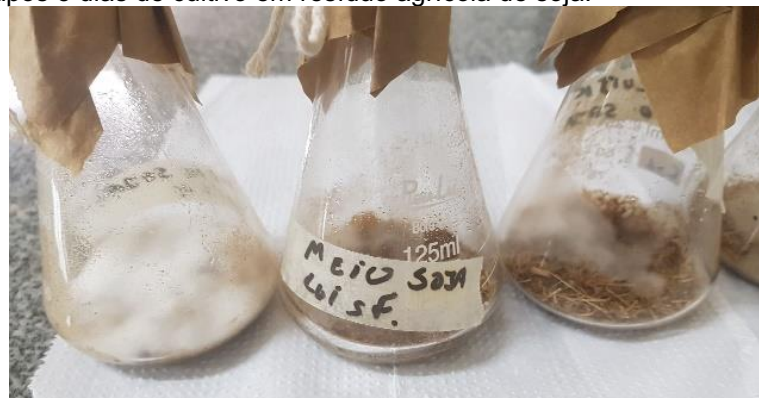
item 4.1, como fonte de biomassa lignocelulósica (**Figura 9**). Logo após o período do cultivo (**Figuras 10, 11 e 12**), por meio de filtração a vácuo, foram obtidos os extratos brutos, os quais foram submetidos a ensaios enzimáticos para a detecção e quantificação de atividades enzimáticas para xilanase, pectinase e CM-celulase, conforme apresentado na **Figura 13**.

Figura 9 - Resíduos de arroz, soja e café, respectivamente. Na parte de cima, estão os resíduos antes do processamento, em baixo, após.



Fonte: Autor (2018).

Figura 10 - MEB após 5 dias de cultivo em resíduo agrícola de soja.



Fonte: Autor (2018).

Figura 11 - MEB após 5 dias de cultivo em resíduo agrícola de arroz.



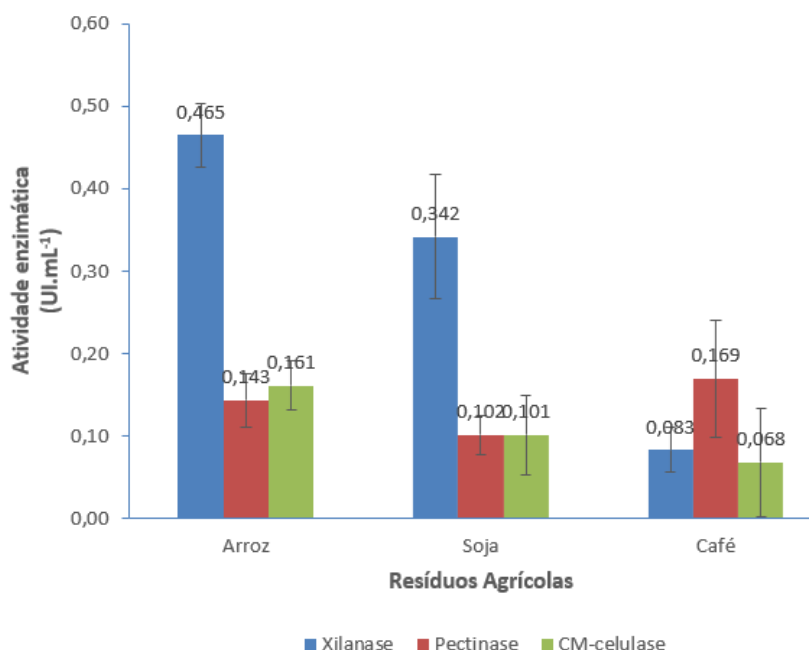
Fonte: Autor (2018).

Figura 12 - MEB após 5 dias de cultivo em resíduo agrícola de café.



Fonte: Autor (2018).

Figura 13 - Atividades enzimáticas (xilanase, pectinase e CM-celulase) dos extratos brutos obtidos após cultivo do isolado MEB em resíduos agrícolas (casca de arroz, resíduo completo da soja e resíduo do beneficiamento do café), após incubação por 5 dias à temperatura ambiente (~25°C).



Fonte: Autor (2018).

Quanto às enzimas produzidas por MEB cultivado em cada substrato, pode-se destacar o resíduo casca de arroz, na indução dos maiores valores de U.I.mL⁻¹ para as 3 classes avaliadas, com ênfase para xilanase: $0,4646 \pm 0,039$ e CM-celulase: $0,1614 \pm 0,030$ (**Figura 13**). Dentre as atividades avaliadas, o isolado mostrou-se viável para o cultivo nos 3 resíduos, conforme observado na **Figura 13**. A viabilidade do cultivo foi demonstrada pelas 3 atividades enzimáticas detectadas, indicando que o fungo foi capaz de utilizar diferentes componentes das biomassas residuais para sua perpetuação em cada cultivo. A análise de variância dos dados obtidos, revelou ocorrer interação significativa entre as atividades enzimáticas e os respectivos resíduos ($P < 0,05$). O teste de Turkey a 5% utilizado para avaliação das atividades individuais frente aos diferentes resíduos, mostrou que no resíduo da casca de arroz, MEB produziu maior atividade xilanase (**Tabela 1**). Ao mesmo tempo, as atividades pectinase e CM-celulase dos produzidas por MEB não apresentaram diferenças significativas para os diferentes resíduos.

De acordo com o perfil enzimático produzido pelo isolado, trata-se de um fungo com amplas aplicações em diferentes áreas de atuação, a exemplo das já citadas indústrias de papel, sucos, mas, principalmente em biorrefinarias para a produção de etanol de segunda geração, já que foram produzidas enzimas de degradação de

celulose e hemicelulose. A xilana representa o polissacarídeo hemicelulósico mais abundante e por isso sua desconstrução é de grande importância para a utilização da biomassa para geração de etanol (DODD e CANN, 2009).

Tabela 1 - Estatística aplicada às médias aritméticas das atividades enzimáticas produzidas por MEB quando cultivado em diferentes resíduos agrícolas.

Resíduos Agrícolas	Médias das atividades enzimáticas (UI.mL ⁻¹)		
	Xilanase	Pectinase	CM-celulase
CA	0,4646 a	0,1434	0,1614
RS	0,0834 b	0,1020	0,1014
RC	0,342 a	0,1696	0,0686

CA – Casca de arroz; RS – Resíduo completo da soja; RC – Resíduo do beneficiamento do café. Médias seguidas de mesma letra são estatisticamente iguais, pelo teste de Tukey a 5%.

Fonte: Autor (2019).

De acordo com Borin et al. (2018), os tipos e quantidade de enzimas produzidas por um fungo podem variar em resposta a diferentes biomassas, de diferentes plantas.

Tabela 2 - Composição bioquímica dos substratos, com dados encontrados na literatura. A composição afeta o desenvolvimento do fungo e a produção de enzimas.

Substratos	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Outros (%)
Arroz (Ferreira, 2005)	22	43,3	17,2	17,3
Soja (BERGAMASCHINE et al., 1999)	13,10	8,66	6,00	72,24*
Café (SOUZA et al., 2001)	22,72	14,69	12,38	50,21

* Aproximadamente 25,05% são de Proteínas.

Fonte: Autor (2019).

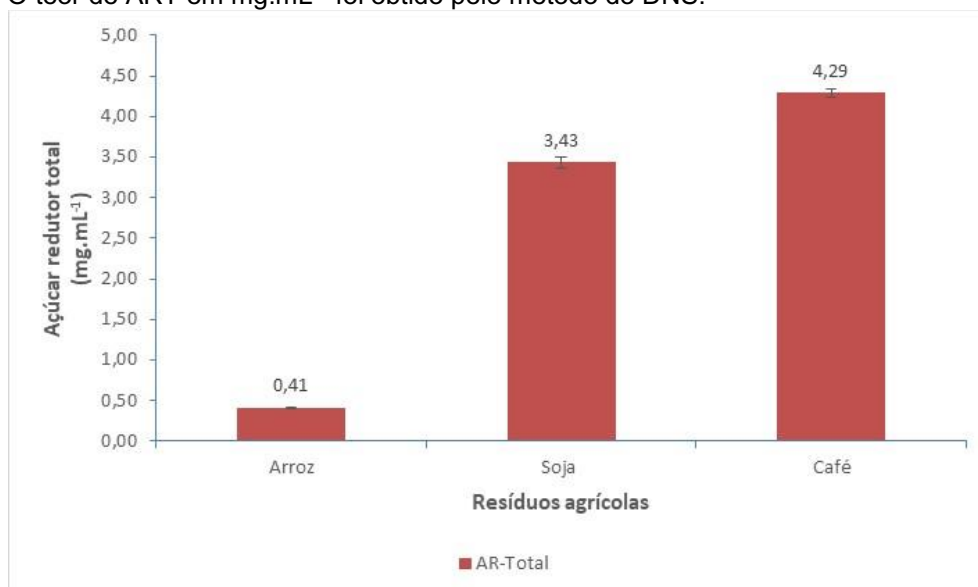
De acordo com Freer e Detroy (1982), elevados teores de lignina no substrato aparentemente dificultam o desenvolvimento do fungo já que essa estrutura exige

mais gasto metabólico do microrganismo, pois dificulta o acesso à celulose e hemicelulose. Isso pode explicar o motivo pelo qual o fungo teve menor desenvolvimento micelial conforme é possível observar nas figuras acima (**Figuras 10, 11 e 12**).

Entretanto, o resíduo casca de arroz apresentou maior atividade enzimática. Há grande possibilidade que isso tenha ocorrido pelo alto teor de nitrogênio encontrado no arroz, composto necessário para síntese de ácidos nucleicos, aminoácidos e proteínas. Porém, em quantidades excessivas, o nitrogênio pode inibir síntese de enzimas, o que pode justificar a baixa atividade no resíduo de soja, que possui grandes quantidades de proteínas em sua (FIGUEIRÓ e GRACIOLLI, 2011).

O teor de ART foi quantificado e apresentado na **Figura 14**. Nesse ensaio foi percebido que a quantidade de açúcar redutor presente nos extratos foi estaticamente menor no EB-casca de arroz pelo teste de Scott-Knott a 5% ($0,41 \pm 0,009 \text{ mg.mL}^{-1}$) do que nos demais extratos (**Tabela 3**). Paralelamente, EB-casca de arroz apresentou maior atividade enzimática. Essa aparente dissonância nos resultados, pode ter relação com a presença de compostos capazes de interferir com as leituras obtidas pelo método de DNS. Conforme observado por Xu et al. (2011), a presença de extrativos vegetais, como fenóis e polifenóis, podem influenciar nos resultados quando se utiliza o método de DNS. Naturalmente, durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, a lignina pode gerar compostos fenólicos (QIN et al., 2016). De acordo com Xu et al. (2011), os polifenóis são capazes de reduzir compostos quimicamente e por isso acabam interferindo em testes como o de DNS, que utilizam de reações redox para quantificar a presença de açúcares redutores, sendo capazes eles mesmos de gerarem respostas dose-linear ao regirem com o DNS. Ainda Xu et al. (2011) apontam que mesmo quando retirada a diferença do efeito destes polifenóis, eles ainda podem causar variações na precisão do método principalmente em baixas quantidades de açúcar, o que pode justificar a presença de elevados desvios padrão em algumas análises.

Figura 14 - Dosagem de ART dos extratos brutos enzimáticos, produzido pelo isolado MEB durante o cultivo nos resíduos agrícolas (casca de arroz, resíduo completo da soja e resíduo do beneficiamento do café). O teor de ART em mg.mL^{-1} foi obtido pelo método do DNS.



Fonte: Autor (2019).

Tabela 3 - Estatística aplicada às médias aritméticas dos valores de ART obtidos com o ensaio em cada resíduo utilizado.

Resíduos Agrícolas	Médias de ART (mg.mL^{-1})
CA	0.4070 c
RS	3.4310 b
RC	4.2876 a

CA – Casca de arroz; RS – Resíduo completo da soja; RC – Resíduo do beneficiamento do café. Médias seguidas de mesma letra são estatisticamente iguais, pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Fonte: Autor (2019).

Esses compostos também podem ser capazes de inibirem a atividade enzimática. Em um ensaio, Qin et al. (2016) demonstrou que à medida que a concentração de vanilina, um composto fenólico, aumentava de 0 para 10 mg.mL^{-1} , a conversão de celulose após a hidrólise enzimática de 72 horas diminuiu de 53% para 26%. O trabalho de Ximenes et al. (2010) demonstrou que compostos fenólicos vanilina, siringaldeído, ácido trans-cinâmico e ácido hidroxibenzóico podem inibir a hidrólise da celulose por endo e exo-celulases, e a hidrólise da celobiose pela β -glicosidase. Outras enzimas como a α -amilase e a α -glucosidase (KWON et al., 2008)

também são afetadas pela presença destes compostos, mostrando que várias enzimas podem ter comprometidas suas atividades enzimáticas.

Em acréscimo, estudos demonstram que resíduos do café podem conter compostos fenólicos, principalmente na casca. Isso é demonstrado por García e Bianchi (2015), que através de pesquisas com resíduos do beneficiamento de café demonstraram a presença destes compostos fenólicos, sendo que na casca houve detecção principalmente de ácido clorogênico. Os mesmos pesquisadores em outro trabalho verificaram que a fermentação fúngica realizada por *Penicillium purpurogenum* em casca de café aumentou a quantidade de fenólicos totais de 159,5 até 243,2 mg AG·g⁻¹ (ácido gálico.g⁻¹) substrato por efeito da fermentação em estado sólido.

A soja também é muito conhecida por ser um alimento rico em isoflavonas, um grupo de fenóis cíclicos com várias atividades biológicas (QUEIRÓZ, 2014). Em pesquisa publicada por Silva et al. (2012) com resíduos de soja, foi possível encontrar nos grãos do vegetal 267,16 mg.100 g⁻¹ de isoflavonas, o que contribui para a hipótese de que a presença de compostos antioxidantes tenha influenciado na leitura de açúcar redutor total, bem como nos testes de atividade enzimática.

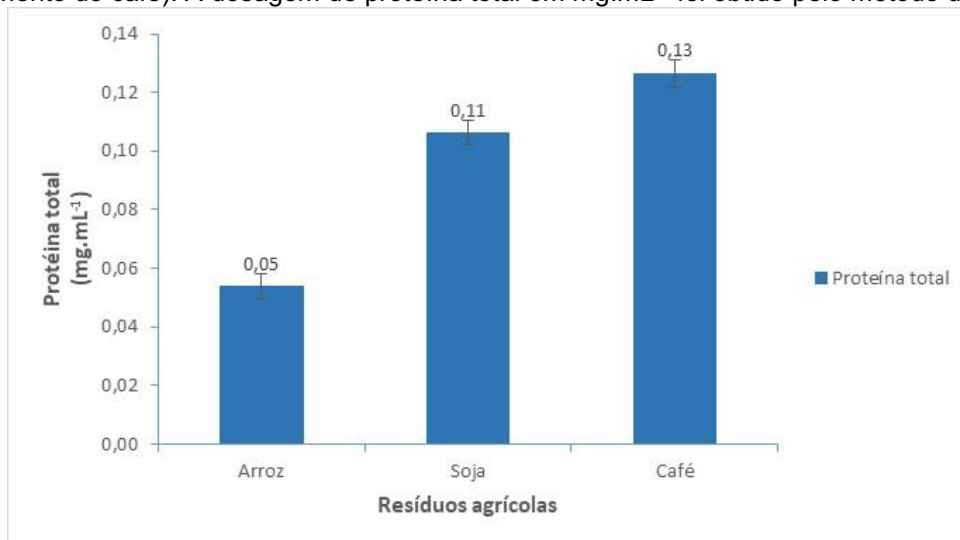
O EB-casca de arroz que apresentou uma menor leitura, sem aparentar interferência, também contém compostos fenólicos, sendo que esta é parte da planta, responsável pela defesa antioxidante da semente (REGO, 2014). Entretanto, os valores encontrados por Rego (2014) em seu trabalho são inferiores em relação aos valores encontrados em outros resíduos vegetais, obtendo valores entre 1,96 e 2,40 mg AG/g de casca de arroz em testes realizados com cascas de diferentes tipos de arroz.

Dessa forma, pode-se reforçar a hipótese de que os fenóis foram os principais interferentes nas leituras realizadas, entretanto ainda podem haver outros extrativos presentes com potencial para influenciar na leitura que podem ser estudados em trabalhos posteriores.

Na **Figura 15** foi expresso os valores da quantificação das proteínas totais obtidas pelo método de Bradford. Apesar da eficácia, este método apresenta alguns interferentes que podem ser encontrados nas amostras, como os próprios compostos fenólicos conforme mencionado por Bradford (1976). Dessa forma, estes compostos podem superestimar os teores de proteínas totais dos extratos brutos, de maneira a explicar o efeito promovido por compostos fenólicos possivelmente na indução

enzimática pelos fungos ou também pela própria influência de compostos fenólicos em ensaios que requeiram detecção espectrofotométrica.

Figura 15 - Determinação de proteína total dos extratos brutos enzimáticos, produzido pelo isolado MEB durante o cultivo nos resíduos agrícolas (casca de arroz, resíduo completo da soja e resíduo do beneficiamento do café). A dosagem de proteína total em mg.mL^{-1} foi obtido pelo método de Bradford.



Fonte: Autor (2019).

De acordo com os resultados de quantificação de ART e proteína total, é possível inferir que MEB apresentou melhor perfil de indução de enzimas quando crescida em resíduos de biomassa lignocelulósica contendo menor quantidade de compostos interferentes, como os fenólicos. No caso dos EB-resíduo completo soja e, principalmente, EB-resíduo do beneficiamento do café, por apresentarem maior presença de compostos interferentes, possivelmente seja o motivo pelo qual foram detectadas as menores atividades de degradação dos lignocelulósicos contidos nos resíduos. Houve diferença entre o teor de proteína total ao final do cultivo de MEB, para os três resíduos testados ($P < 0,05$) (**Tabela 4**).

Com o intuito de buscar potenciais aplicações da mistura enzimática produzida pelo isolado durante o cultivo, tomando como referência do EB-arroz que apresentou as maiores atividades de degradação da biomassa lignocelulósica. Para isso, foi avaliado o efeito da temperatura e do pH no estabelecimento das condições ótimas para cada “pool” enzimático contido no EB-casca de arroz (**Figuras 16 e 17**), de maneira a otimizar as melhores condições de utilização das enzimas.

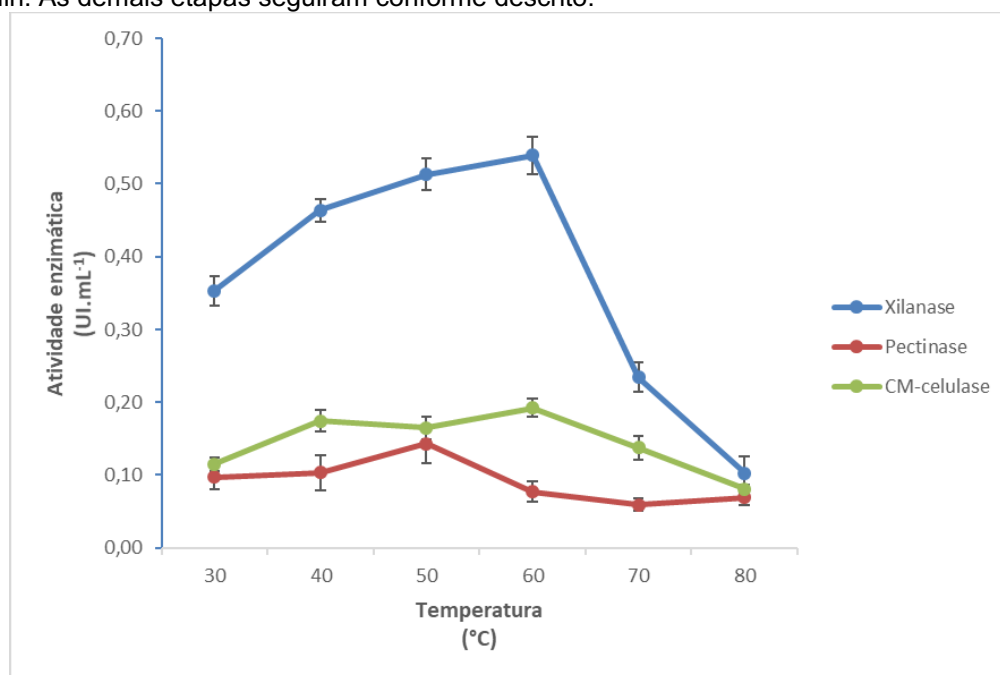
Tabela 4 - Estatística aplicada às médias aritméticas dos valores de proteína total obtidos com o ensaio em cada resíduo utilizado.

Resíduos	Médias de Proteína Total (mg.mL ⁻¹)
Agrícolas	
CA	0.0538 b
RS	0.1062 a
RC	0.1266 a

CA – Casca de arroz; RS – Resíduo completo da soja; RC – Resíduo do beneficiamento do café. Médias seguidas de mesma letra são estatisticamente iguais, pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Fonte: Autor (2019).

Figura 16 - Influência da temperatura na atividade das enzimas presentes no extrato bruto enzimático produzido por MEB após cultivo no resíduo casca de arroz. Os ensaios enzimáticos foram realizados conforme descrito no item 3.5, variando apenas a temperatura de incubação de 30°C a 80°C, no período de 30 min. As demais etapas seguiram conforme descrito.



Fonte: Autor (2019).

A **Figura 16** mostra a influência da temperatura nas atividades xilanase, pectinase e CM-celulase, respectivamente. É possível verificar que em quaisquer temperaturas a maior atividade se encontra na enzima xilanase, demonstrando forte produção dessa enzima pela MEB. As enzimas CM-celulase e xilanase demonstraram maior eficiência na temperatura de 60 °C, apesar desta atividade não ser muito distante da atividade percebida a 50 °C. Já a pectinase, apresentou uma atividade maior a 50 °C, demonstrando que estas holocelulases tem preferência por

temperaturas moderadamente elevada. Esses dados também são comprovados na **Tabela 5**, onde são demonstrados os valores tratados através do teste de Scott-Knott a 5%, realizado após a análise de variância comprovar interação significativa entre a temperatura e a atividade enzimática.

Tabela 5 - Estatística aplicada às médias aritméticas das atividades enzimáticas produzidas por MEB cultivado em resíduo de arroz quando submetido a variações de temperatura.

Substratos	Temperatura (°C)					
	30	40	50	60	70	80
Pectinase	0,07 b	0,0766 c	0,1614 b	0,0484 c	0,0266 c	0,0412 b
Xilanase	0,4468 a	0,5848 a	0,5864 a	0,725 a	0,2984 a	0,1342 a
Cm-Celulase	0,1154 b	0,1744 b	0,1166 b	0,1922b	0,1276 b	0,0768 ab

Médias seguidas de mesma letra são estatisticamente iguais, pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Fonte: Autor (2019).

Também foi testada a influência do pH nas atividades enzimáticas conforme mostra a **Figura 17**. Na **Tabela 6** estão expressos os valores resultantes dessas atividades, bem como os resultados comparativos do teste de Scott-Knott. O teste, assim como nos outros casos, foi realizado após análise de variância com significância de 5%, que comprovou a diferença nos resultados de tratamento entre os níveis de pH bem como demonstrou haver interação significativa entre a atividade enzimática das diferentes enzimas em cada pH.

Tabela 6 - Estatística aplicada às médias aritméticas das atividades enzimáticas produzidas por MEB cultivado em casca de arroz em diferentes pH.

Resíduos	pH		
	4,0	6,5	8,0
CM-Celulase	0,2678 b	0,1294 c	0,2060 a
Pectinase	0,1096 c	0,2028 b	0,1748 a
Xilanase	0,5166 a	0,4434 a	0,0698 b

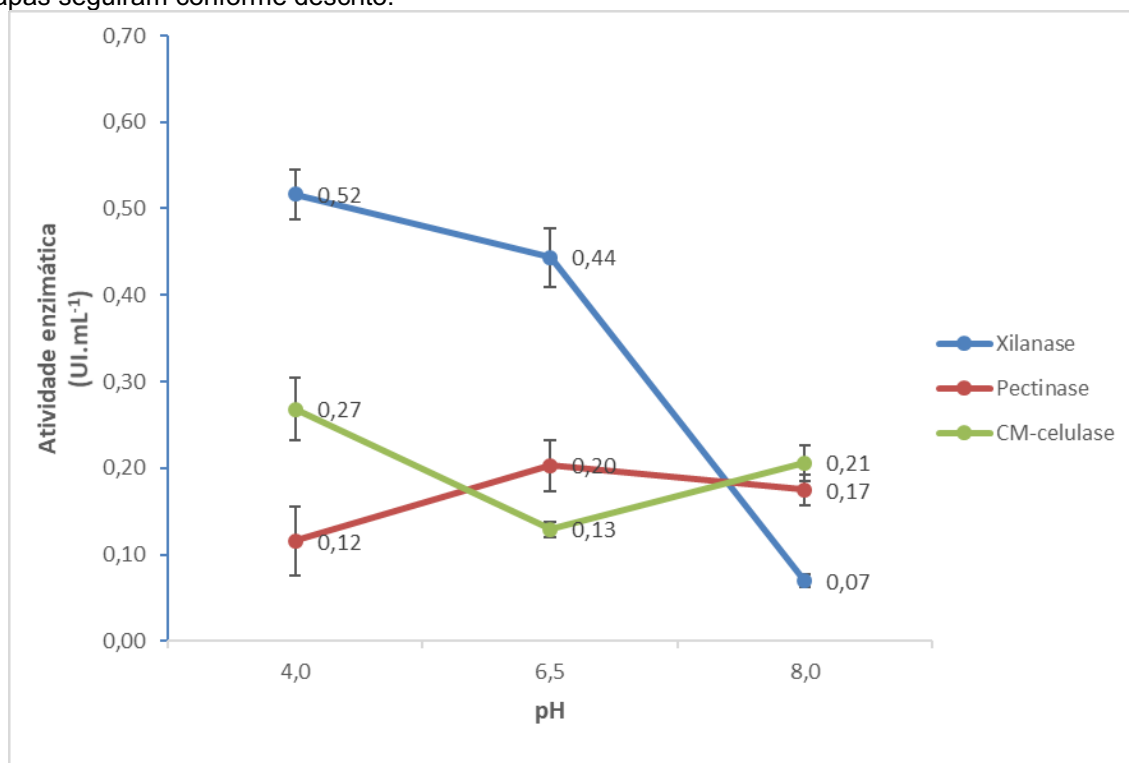
Médias seguidas de mesma letra são estatisticamente iguais, pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Fonte: Autor (2019).

Neste ensaio, a enzima xilanase demonstra ter as maiores atividades em pH 4 e 6,5. Entretanto em pH 8, a atividade foi bruscamente reduzida para $0,069 \pm 0,008$ UI.mL⁻¹, inferior as demais enzimas estudadas (**Figura 17**). pH 4 foi considerado o

ideal para atividades de xilanase e CM-celulase, enquanto para pectinase, o pH 6,5 foi o mais relevante.

Figura 17 - Influência do pH na atividade das enzimas presentes no EB enzimático produzido por MEB após cultivo no resíduo casca de arroz. Os ensaios enzimáticos foram realizados conforme item 3.5, ajustando dentro do volume final de reação (75 μL), a inclusão do volume de 37,5 μL de cada tampão testado: acetato de sódio (4,5), fosfato de sódio (6,5) e Tri-HCl (8,0), todos a 0,1 mol.L⁻¹. As demais etapas seguiram conforme descrito.



Fonte: Autor (2019).

De acordo com Castro e Pereira-Jr (2010), celulasas produzidas por fungos filamentosos, de forma geral, costumam apresentar uma atividade ótima em pH ácido enquanto a temperatura geralmente é acima de 40 graus. Os valores encontrados para a CM-celulase neste trabalho vão de encontro com esta afirmação. O trabalho de Heirdone et al. (2005) com o fungo filamentoso *Ceriporiopsis subvermispora* demonstrou certa proximidade com os resultados aqui obtidos, encontrando uma atividade ótima para xilanase a 60 °C e pH 5,0 e para endoglucanase, pH 3,5 e temperatura 60 °C.

Gaspar-Jr (2014) encontrou através de experimentos de otimização que, a atividade de xilanase extraída de fungos do gênero *Penicillium* foi maior em pH 4,0 e temperatura de 50°C.

Para pectinase, no entanto, os resultados encontrados por Sandri (2010) para o melhor pH de atividade para pectinase foram diferentes utilizando duas cepas

diferentes do gênero *Aspergillus*, encontrando um pH ótimo por volta de 4,0 para suas endo-poligalctorunase. Já o resultado de melhor temperatura encontrada pela mesma pesquisadora se assemelhou com este trabalho, encontrando temperaturas ótimas de 40 °C e 50 °C.

Em acréscimo, de acordo com Jayani et al. (2005), a maior parte das endo-poligalctorunase possuem um pH ótimo entre 3,5 e 5,5 e uma temperatura ótima entre 30 e 50 °C, enquanto as pectina liases possuem um pH ótimo mais alcalino, entre 7,5 e 10 e temperatura ótima entre 40 e 50 °C. Sendo assim, os resultados encontrados para pH de melhor atividade pectinase neste trabalho não parecem ir de encontro com os dados obtidos na literatura.

A partir dos resultados de caracterização parcial das atividades enzimáticas do extrato bruto obtido pós-cultivo do isolado em resíduo de casca do arroz, foi realizado um teste de hidrólise enzimática, utilizando dois diferentes substratos nas mesmas condições. Os substratos em questão, BL e BEV passaram por diferentes tratamentos prévios. Enquanto o primeiro passou apenas por um processo de lavagem para retirada de impurezas, o segundo contou com o pré-tratamento de explosão a vapor.

As condições propostas para a hidrólise enzimática foram pH 4 e temperatura a 50 °C. Essas condições foram escolhidas pois as enzimas xilanase e CM-celulase apresentaram boa atividade em cada uma dessas condições nos ensaios preliminares deste trabalho. Uma vez que ainda não foram realizados testes de termoestabilidade, a temperatura de 60 °C não foi escolhida pois a enzima pode não apresentar estabilidade por longos períodos de tempo a temperaturas mais elevadas.

Busto et al. (1996) testaram a atividade de CM-celulases em diferentes temperaturas e encontraram uma atividade mais elevada a 60 °C, assim como no presente trabalho, entretanto, em testes de termoestabilidade, verificaram que o tempo de meia vida das enzimas caía de acordo com a temperatura, sendo que a 55 °C este tempo foi de 9,4 horas enquanto que a 60 °C, o tempo de meia vida foi de apenas 4,2 horas. O teste de termoestabilidade realizado por Farinas e colaboradores demonstrou que a atividade da enzima xilanase também é reduzida quando exposta a temperaturas mais elevadas por longos períodos de tempo, uma vez que a 37 °C, a enzima apresentou uma meia vida de 243,2 horas enquanto que a 50 °C este tempo foi reduzido para 90,1 horas.

Os resultados obtidos pós-hidrólise foram expressos pela dosagem de açúcar redutor total (mg.mL⁻¹ e porcentagem de hidrólise), os quais estão apresentados na

Tabela 7. Os dados foram avaliados pela análise de variância, entretanto, no experimento conduzido, não foi encontrada uma interação significativa entre o tempo e os tipos de tratamento, ou seja, não é correto afirmar que essas variáveis em conjunto tiveram influência relevante no resultado final. Dessa forma, foi conduzido o teste de Turkey nas variáveis separadamente para avaliar a influência do tipo de substrato e do tempo conforme as **Tabelas 8 e 9** respectivamente.

Tabela 7 - Representação dos valores de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar “lavado” e “explodido a vapor”, representados pela dosagem de açúcar redutor total, nos tempos de 0, 12, 24, 36 e 48 horas.

Tempo de Hidrólise (horas)	Açúcar Redutor total* (mg.mL ⁻¹) e hidrólise (%)			
	Lavado		Explodido a vapor	
0	0,099 ± 0,007	1,48	0,238 ± 0,034	3,57
12	0,259 ± 0,025	3,88	0,494 ± 0,041	7,41
24	0,321 ± 0,014	4,81	0,518 ± 0,035	7,77
36	0,371 ± 0,012	5,56	0,703 ± 0,053	10,54
48	0,300 ± 0,012	4,49	0,609 ± 0,041	9,13

*As quantidades de açúcar redutor total liberado foram estimados pelo método de DNS conforme descrito no Item 4.6.

**A porcentagem de hidrólise foi obtida tomando como referência de 100% a quantidade de biomassa utilizada no início do ensaio, relacionada à cada quantificação em mg.mL⁻¹ obtida ao final de tempo de incubação.

Fonte: Autor (2019).

Tabela 8 - Estatística aplicada às médias aritméticas da atividade hidrolítica de MEB em sobre bagaço de cana-de-açúcar “lavado” ou “explodido a vapor”, analisados pelo teste de Turkey para verificar o efeito simples do substrato.

Substratos	Médias das atividades (UI.mL ⁻¹)
BEV	0,5126 a
BL	0,2699 b

BEV – Bagaço de Cana-de-açúcar explodido a vapor; BL – Bagaço de Cana-de-açúcar lavado. Médias seguidas de mesma letra são estatisticamente iguais, pelo teste de Tukey a 5%.

Fonte: Autor (2019).

Conforme foi observado, ambas atividades atingiram maior eficiência de hidrólise após 36 horas, tendo uma redução da mesma a 48 horas. Em termos percentuais, na hidrólise de BL e BEV pelo EB-casca de arroz foram liberados o total de açúcares redutores correspondendo a 20,22 % e 38,42%, respectivamente.

Oliveira (2012), utilizou bagaço de cana explodido a vapor, polpa da cana-de-açúcar nas mesmas condições e cana-de-açúcar *in natura* como controle e foi observado um resultado semelhante, obtendo uma conversão de celulose muito maior nos substratos que foram submetidos ao pré-tratamento (52% de conversão para o bagaço explodido e 76% para a polpa explodida) em comparação com o controle (15% de conversão).

Tabela 9 - Estatística aplicada às médias aritméticas da atividade hidrolítica de MEB do bagaço de cana-de-açúcar representados pela dosagem de açúcar redutor total, nos tempos de 0, 12, 24, 38 e 48 horas, analisados pelo teste de Turkey para verificar o efeito simples do substrato.

Substratos	Médias das atividades
	(UI.mL ⁻¹)
48	0,4544 ab
36	0,5371 a
24	0,4193 ab
12	0,3767 b
0	0,1687 c

Médias seguidas de mesma letra são estatisticamente iguais, pelo teste de Tukey a 5%.

Fonte: Autor (2019).

O substrato que recebeu um pré-tratamento (BEV) apresentou maiores valores de açúcar redutor total liberado. Este resultado foi possível, devido ao aumento da área superficial e diminuição do grau de polimerização e cristalinidade da celulose, já que afeta suas camadas protetoras (lignina e hemicelulose), aumentando a digestibilidade deste polímero pelas enzimas (ZHANG e LYND, 2004).

A explosão a vapor é considerada uma das técnicas de pré-tratamento mais promissoras para a obtenção de etanol através da utilização da biomassa lignocelulósica (SANTOS et al., 2012).

Nesta técnica, a lignocelulose é rapidamente aquecida por um vapor de alta pressão, e após algum tempo na presença do vapor que é o responsável pela hidrólise da hemicelulose, uma descompressão explosiva finaliza este pré-tratamento. Apesar de não haver nenhum aditivo químico, durante o tratamento ocorre a formação de ácido acético devido a reações com grupos acetila, o que aumenta a capacidade hidrolítica da técnica. A remoção da hemicelulose causada pela explosão a vapor aumenta a acessibilidade das enzimas sobre as fibras de celulose, sendo esta a

principal alteração responsável por aumentar a digestibilidade da biomassa quando se utiliza esta técnica (MOSIER et al., 2004).

Estes percentuais de hidrólise alcançados neste trabalho, mostraram-se importantes, mesmo para o substrato BL, representando excelentes possibilidades de utilização das enzimas do EB-casca de arroz em etapas de hidrólises de substratos contendo material lignocelulósico.

6 CONCLUSÃO

O trabalho apresentou diversos resultados satisfatórios. O isolado MEB foi capaz de desenvolver bem em diversos resíduos agrícolas e no presente trabalho, apresentou maior atividade enzimática no resíduo de casca de arroz, com ênfase para duas enzimas estudadas, xilanase e CM-celulase. Ensaio de caracterização enzimática revelaram que as enzimas produzidas por MEB apresentaram atividades ótimas em temperaturas levemente elevadas (50 °C – 60°C) e em pH ácido (4,0), condições que podem ser reproduzidas em laboratório e até mesmo em escala industrial.

Como próximo passo dessas investigações, pode-se acrescentar testes de termoestabilidade, além de testes em pHs diferentes para otimizar ainda mais as atividades enzimáticas. Outra possibilidade é a caracterização bioquímica dos substratos utilizados, que dariam uma visão mais ampla sobre a composição estrutural, que podem melhorar ou reduzir a atividade enzimática.

Apesar dos resultados expressivos obtidos neste trabalho, algumas barreiras se sobrepõem ao futuro do mesmo, como a dificuldade de se identificar a espécie fúngica, uma vez que a mesma até o presente momento não revelou estruturas que indicam reprodução sexuada. Então visa-se também em futuro próximo novos repiques que possam incentivar a manifestação destas estruturas facilitando o processo de identificação morfológica ou até mesmo uma identificação molecular a partir de novos grupos de pesquisa parceiros.

Quanto a hidrólise enzimática, o trabalho mostrou que as enzimas produzidas por MEB podem ser realmente utilizadas com esse objetivo, entretanto, é necessária uma adaptação do método para que haja uma melhoria na eficiência. A utilização de

outros substratos além do bagaço de cana é uma possibilidade, uma vez que diferentes resíduos podem gerar etanol celulósico.

REFERÊNCIAS

ABREU, J. A. S., et al. **FUNGOS DE INTERESSE: APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**. Revista UNINGÁ Review, Vol.21, n.1, pg .55-59, 2015.

ALEXANDRINO, A. M., et al. **Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr)**, Ciência e Tecnologia de Alimentos 27: 364-368, 2007.

AHUJA, S. K.; FERREIRA G. M.; MOREIRA A. R. **Utilization of Enzymes for Environmental Applications**. v. 24, n. 2-3, p.125-154, 2004.

AZEVEDO, J. L. **Fungos. Genética e Melhoramento de Fungos na Biotecnologia**. Pesquisa, 2017.

BERGAMASCHINE, A. F., et al.; **Degradabilidade "in situ" e digestibilidade "in vivo" do resíduo do pré-processamento da soja (*Glycine max* (L.) merrill)**. Ciênc. agrotec., Lavras, v.23, n.3, p.724-732, jul./set., 1999.

BERLIN, A.; GILKES, N., et al. **Evaluation of novel fungal cellulose preparations for ability to hydrolyze softwood substrates - evidence for the role of accessory enzymes**. Enzyme Microb Technol, v. 37 p. 175-184, 2005.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**, Analytical Biochemistry 72: 248-254, 1976.

BOFF, C.; PASQUALOTTO A.C. **Monitoramento de fungos no ar de unidade de terapia intensiva**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

BOFF, C. et al. **The environment as a potential determinant of the frequency of invasive aspergilloses in the intensive care**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2011.

BOMTEMPO, F. V. S.. et al. **Produção de extratos enzimáticos por fungos filamentosos utilizando resíduos agrícolas.** Bioenergia em revista: diálogos, ano 7, n. 1, p. 26-44, 2017.

BORIN, G. P., et al. **Comparative transcriptome analysis reveals different strategies for degradation of steam-exploded sugarcane bagasse by *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*.** BMC Genomics.18: 501, 2017.

BUSTO, M. D.; ORTEGA, N.; PEREZ-MATEOS, M. **Location, Kinetics And Stability Of Cellulases Induced In *Trichoderma Reesei* Cultures,** Department of Biotechnology and Food Science, Faculty of Food Science and Technology, Burgos, 1996.

CABRAL, J.P. **Can we use indoor fungi as bioindicators of indoor air quality? Historical perspectives and open questions.** Sci total Environ, 2010.

CASTRO, A. M; PEREIRA-JR, N. **Produção, Propriedades E Aplicação De Celulases Na Hidrólise De Resíduos Agroindustriais.** Quim. Nova, Vol. 33, No. 1, 181-188, 2010.

CHUNDAWAT, S. P. S., et al. **Multi-scale visualization and characterization of lignocellulosic plant cell wall deconstruction during thermochemical pretreatment.** Energy Environ. Sci., v. 4, p. 973–984, 2011.

COUTO, S. R.; HERRERA, J. L. T.. **Industrial and biotechnological applications of laccases: A review.** Biotechnology Advances, [s.l.], v. 24, n. 5, p.500-513, 2006.

DING, S. Y.; HIMMEL, M. E. **The Maize Primary Cell Wall Microfibril: A New Model Derived from Direct Visualization.** Journal Of Agricultural And Food Chemistry, [s.l.], v. 54, n. 3, p.597-606, 2006

DODD, D.; CANN, I. **Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production.** Glob. Change Biol. Bioenergy, 1, 2–17. 2009.

FARINAS, C. S.; et al. **Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature.** New Biotechnology, [s.l.], v. 27, n. 6, p.810-815, dez. 2010.

FREER, S; DETROY, R. **Biological delignification of ^{14}C labeled lignocelluloses by basidiomycetes: degradation and solubilization of lignin and cellulose components.** Mycology, New York, v.74, p.943-951, 1982.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood—chemistry, ultrastructure, reactions.** Journal Of Polymer Science: Polymer Letters Edition, [s.l.], v. 23, n. 11, p.601-602, nov. 1985.

FERREIRA, C.S. **Desenvolvimento do processo de obtenção de filme polimérico a partir de cinza de casca de arroz.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), UFSC, 2005.

FIGUEIRÓ, G. G., GRACIOLLI, L. A. **Influência da composição química do substrato no cultivo de *Pleurotus florida*.** Ciênc. agrotec., Lavras, v. 35, n. 5, p. 924-930, 2011.

FILHO, E. X. F., PULS, J., AND COUGHLAN, M. P. **Biochemical characteristics of two endo- β -1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*,** Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 11: 171-180, 1993.

FILHO, E. X. F.; SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Pectinases: Enzimas como agentes biotecnológicos,** 1ª ed. ed.;Eds. Legis Summa: Ribeirão Preto, 2004.

GARCÍA, L. R. P.; BIANCHI, V. L. **Capacidade antioxidante em resíduos da indústria cafeeira.** Brazilian Journal Of Food Technology, [s.l.], v. 18, n. 4, p.307-313, 2015a.

GARCÍA, L. R. P.; BIANCHI, V. L. **Efeito da fermentação fúngica no teor de compostos fenólicos em casca de café robusta.** Semina: Ciências Agrárias, [s.l.], v. 36, n. 2, p.777-785, 2015b.

GASPAR-JR, P. J. **Caracterização de holocelulases fúngicas na otimização da biomassa lignocelulósica.** UNICAMP, 2014.

GHOSE, T. K. **Measurement of cellulase activities,** Pure and Applied Chemistry 59: 257-268, 1987.

GOVERNO DO BRASIL. **Embrapa apresenta tecnologia para a produção de lenha ecológica.** 2013. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/ciencia-e>

tecnologia/2013/11/embrapa-apresenta-tecnologia-para-a-producao-de-lenha-ecologica>. Acesso em: 29/11/2018.

HEIKINHEIMO, L. **Trichoderma reesei Cellulases in Processing of Cotton**. VTT Publications 483. 77 p. + app. 37 p, 2002.

HEIDORNE, F. O. et al. **Characterization of hemicellulases and cellulases produced by Ceriporiopsis subvermisporea grown on wood under biopulping conditions**. Enzyme And Microbial Technology, [s.l.], v. 38, n. 3-4, p.436-442, 2006.

HERNANDEZ-SALAS, J. M., et al. **Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse**. Bioresource Technology, v. 100, p. 1238-1245, 2009.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRICOLA. **Geração de Bioenergia de Biomassa da Cana-de-açúcar nas Usinas Signatárias ao Protocolo Agroambiental Paulista, Safra 2015/2016**. São Paulo: IEA, 2017. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/ftp/iea/AIA/AIA-19-2017.pdf>>. Acesso em: 27/11/2018.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. **Microbial pectinolytic enzymes: A review**. Process Biochemistry, 40:2931-2944, 2005.

KASHYAP, D. R., VOHRA P. K., CHOPRA S., TEWARI R., **Applications of pectinases in the commercial sector: a review**. Bioresource Technology, 77:215-227, 2001.

KHONZUE, P., et al. **Optimization of xylanase production from Aspergillus niger for biobleaching of eucalyptus pulp**. Biosci Biotechnol Biochem 75(6):1129–1134, 2011.

KIRAN, E. U.; TRZCINSKI, A. P.; NG, J. W.; LIU, Y. U. **Bioconversion of food waste to energy: a review**. Fuel, v. 134, p. 389–399, 2014

KEREM, Z., FRIESEM, D., HADAR, Y. **Lignocellulose Degradation during SolidState Fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium***, Applied and Environmental Microbiology 58: 1121-1127, 1992.

KWON, Y.; APOSTOLIDIS, E.; SHETTY, K.. **Inhibitory Potential Of Wine And Tea Against A-Amylase And A-Glucosidase For Management Of Hyperglycemia**

Linked To Type 2 Diabetes. Journal Of Food Biochemistry, [s.l.], v. 32, n. 1, p.15-31, 2008.

LIPPEL. **Produção de Bioenergia com Casca de Arroz.** Disponível em: < <http://www.lippel.com.br/br/noticias/producao-de-bioenergia-com-casca-de-arroz-71.html>>. Acesso em: 29/11/2018.

LOBATO, R. C.; VARGAS, V. S.; SILVEIRA, E. S., **Sazonalidade E Prevalência De Fungos Anemófilos Em Ambiente Hospitalar No Sul Do Rio Grande Do Sul, Brasil.** Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba, v. 11, n. 2, p. 21 - 28, 2009.

LONDE, P.R; AMARAL, A.F; VALE, V.S. **Estrutura de uma comunidade arbórea de um fragmento de mata de galeria do Parque Municipal do Mocambo, Patos de Minas (MG).** Caminhos de Geografia, v. 13, n. 43, out, 2012.

LU Y; YANG B; GREGG D; SADDLER J. N.; MANSFIELD S. D. **Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues.** Appl Biochem Biotechnol, 2002

LUZZIETTI, M. et. al. **Estudo da utilização da casca de arroz na produção de bioenergia no município de turvo/sc.** UNESC, Santa Catarina, 2013.

MARTINS, T. S. **Isolamento E Identificação De Fungos Anemófilos Presentes Na Biblioteca Pública Do Município De Ariquemes, Rondônia, Brasil.** Faculdade De Educação E Meio Ambiente, Ariquemes, 2014.

MARTINS-DINIZ, J. N. et. al. **Estudo de fungos anemófilos e de leveduras em unidade hospitalar.** Revista Saúde Publica, 39 (3), p. 398-405, 2005.

MEZZARI, A. et. al. **Os Fungos Anemófilos E Sensibilização Em Indivíduos Atópicos Em Porto Alegre, RS.** Rev. Assoc. Med. Bras., 49(3): 270-3, 2003;

MOSIER, N. et al. **Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass.** Bioresource Technology, [s.l.], v. 96, n. 6, p.673-686, abr. 2005.

MILLER, G. L. **Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar,** Analytical Chemistry 31: 426-428, 1959.

OLIVEIRA, L. A.; PORTO, A. L. F.; TAMBOURGI, E. B. **Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes**. Bioresource Technology, [s.l.], v. 97, n. 6, p.862-867, abr. 2006.

OLIVEIRA, L. R. M. **Estudo de alternativas de pré-tratamento e hidrólise do bagaço e palha de cana de açúcar para obtenção de etanol a partir de cellulose**. Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, SP, 2012.

OXFORD LIVING DICTIONARIES. **definition of fungus**. Disponível em: <<https://en.oxforddictionaries.com/definition/fungus>>. Acesso em: 17 de abril de 2017.

PEREIRA-JR, N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA-ANNA, L. M. M. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery**. Series on Biotechnology, Rio de Janeiro, RJ: Ed. Amiga Digital UFRJ, v. 2, 2008, p. 2- 45.

POWERS-FLETCHER, M.V.; KENDALL B.A.; GRIFFIN A.T.; HANSON K.E. **Filamentous fungi**. Microbiol Spectrum, 2016.

QIN, L. et al. **Inhibition of lignin-derived phenolic compounds to cellulase**. Biotechnology For Biofuels, [s.l.], v. 9, n. 1,. 2016.

QUEIRÓZ, L. D. **Biotransformação De Compostos Fenólicos Do Extrato De Soja Para Obtenção De Produto Rico Em Compostos Bioativos**. Unicamp, Campinas, 2014.

R Core Team (2018). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

REGO, A. M. F. **Estudo da extração e caracterização de compostos bioativos a partir de casca, farelo e arroz de variedades portuguesas**. Universidade de Nova Lisboa, 2014.

SÁNCHEZ, C. **Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi**. Biotechnology Advances, [s.l.], v. 27, n. 2, p.185-194, Elsevier BV, 2009.

SANDRI, I. G. **Enzimas Pectinolíticas: Seleção de Linhagens Fúngicas Produtoras, Caracterização e Aplicação em Processos da Indústria de Alimentos.** Universidade de Caxias do Sul, 2010.

SANTOS, A. F. et al. **Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol.** Quim. Nova, Vol. 35, No. 5, 1004-1010. Viçosa, 2012.

SILVA, C. E. et al. **Teores de isoflavonas em grãos inteiros e nos componentes dos grãos de diferentes cultivares de soja (Glycine max (L.) Merrill).** Brazilian Journal Of Food Technology, [s.l.], v. 15, n. 2, p.150-156, 2012.

SILVA, F. A. et al. **Fungos Anemófilos Isolamento E Identificados De Hospital Da Rede Pública Da Cidade De São Luís, Ma.** 60ª Reunião Anual da SBPC, 2017.

SIQUEIRA, F.G.; FILHO, E. X. F. **Plant Cell Wall as a Substrate for the Production of Enzymes with Industrial Applications.** Enzymology Laboratory, Cellular Biology Department, University of Brasília, Brasília, DF, 2010.

SOUZA, A. L. et al. **Composição Químico-Bromatológica da Casca de Café Tratada com Amônia Anidra e Sulfeto de Sódio.** Rev. bras. zootec., 30(3):983-991, 2001.

STROPARO, E. C.; BEITEL S. M. ; RESENDE J. T. V. ; KNOB A. **Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico.** Ciências Agrárias, Londrina, v. 33, n. 6, p. 2267-2278, 2012.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. **Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Application.** Critical Reviews In Biotechnology, [s.l.], v. 22, n. 1, p.33-64, 2002.

TROMBLY, J. **Engineering enzymes for better bioremediation,** Environ. Sci. Technol. 29: 560A–564^a, 1995.

TURNER, P.; MAMO, G.; KARLSSON, E., **Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining.** Microb. Cell. Fact., 6, 1–23, 2007.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M., **Pectinases: aplicações industriais e perspectivas.** Química Nova, 30, 388-394, 2007.

THE UNIVERSITY OF ADELAIDE. **Mycology Online: Mucor**. Australia, 2016.
Disponível em:
<<https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/zygomycetes/mucor/>>. Acesso em:
01/11/2018.

WALIA, A. et al. **Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review**. 3 Biotech, [s.l.], v. 7, n. 1, 8 abr. 2017.

WOOD T. M., GARCIA-CAMPAYO V., **Enzymology of cellulose degradation**. Biodegradation, 1:147-161, 1990.

XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISCH, M. **Enzyme and Microbial Technology Inhibition of cellulases by phenols.**, v. 46, p. 170–176, 2010.

XU, H. et al. **Glucose Measurement in the Presence of Tea Polyphenols**. Food Analytical Methods, [s.l.], v. 5, n. 5, p.1027-1032, 2011.

ZHANG, Y-H. P.; LYND, L. R.. **Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems**. Biotechnology And Bioengineering, [s.l.], v. 88, n. 7, p.797-824, 2004.

ZHANG, Y-H.P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. **Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies**. Biotechnol. adv. v.24, p.452-481, 2006.

ZHANG, S.; et al. **Process modeling and integration of fuel ethanol production from lignocellulosic biomass based on double acid hydrolysis**. Energy & Fuels, v. 23, p. 1759-1765, 2009.