



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Dissertação de Mestrado

**“AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASE PELA DEGRADAÇÃO
DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS REGIONAIS POR FUNGOS DA AMAZÔNIA”**

ADRIANA DA SILVA E SILVA

Manaus - AM

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA ORGÂNICA

ADRIANA DA SILVA E SILVA

**“AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASE PELA DEGRADAÇÃO
DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS REGIONAIS POR FUNGOS DA AMAZÔNIA”**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza

Co-Orientadora: Prof. Dr^a. Antonia Queiroz Lima de Souza

Manaus - AM

2014

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Silva, Adriana da Silva e.

S586a

Avaliação da produção de celulasas e xilanase pela
degradação de resíduos agrícolas regionais por fungos da
Amazônia / Adriana da Silva e Silva. - 2013.

105 f. : il. color. ; 31 cm.

Dissertação (mestrado em Química) — Universidade Federal
do Amazonas.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza.

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Antonia Queiroz Lima de Souza.

1. Enzimas de fungos 2. Cinética química 3. Cinética
enzimática 4. Fungos - Amazônia I. Souza, Afonso Duarte Leão de,
orientador II. Souza, Antonia Queiroz Lima de, orientador III.
Universidade Federal do Amazonas IV. Título

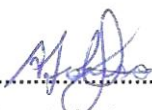
CDU (2007): 577.151.4(811)(043.3)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA ORGÂNICA

Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química, outorgado pela Universidade Federal do Amazonas, e em cuja Biblioteca Central encontra-se disponível.

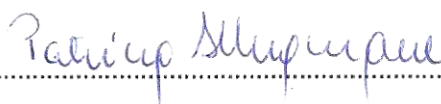
ADRIANA DA SILVA E SILVA

Banca Examinadora:



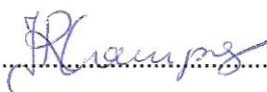
.....
Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza – Presidente (UFAM)

Universidade Federal do Amazonas – UFAM



.....
Prof^a. Dr^a. Patrícia Melchionna Albuquerque – Membro (UEA)

Universidade do Estado do Amazonas – UEA



.....
Prof^a. Dr^a. Francinete Ramos Campos – Membro (UFPR)

Universidade Federal do Paraná – UFPR

Ao meu companheiro Zildo de Souza, fonte de minhas forças e vitórias, à minha mãe e amiga Francisca da Silva que me concedeu apoio e incentivo aos estudos, ao meu grande pai Raimundo Nonato com quem gostaria de compartilhar mais essa conquista, e ao meu irmão Nonato da Silva, exemplo que sempre procurei seguir. Dedico-lhes este trabalho.

“De tudo ficaram três coisas: A certeza de que estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar, e a certeza de que seria interrompido antes de terminar!”

Fernando Sabino

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus nosso pai que me concedeu forças e coragem para enfrentar todos os desafios dessa incessante jornada.

À minha mãe por nunca ter deixado de acreditar nos meus objetivos e de me apoiar nas minhas fraquezas.

Ao meu pai que, enquanto vivo, deu-me amor, carinho e toda sua dedicação para com meus estudos.

Ao meu grande querido e companheiro Zildo de Souza, pela paciência, apoio, compreensão e principalmente pela vontade de estar sempre ao meu lado.

À coordenação de pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas.

Aos Professores orientadores Afonso Duarte Leão de Souza e Antonia Queiroz Lima de Souza, pelo incentivo e motivação à pesquisa, pela orientação acadêmica e técnica, pelas sugestões e apoio proporcionado ao longo do presente trabalho e por toda amizade conquistada.

Ao Prof. Dr. Igor Polikarpov, por ter me recebido de braços abertos no Laboratório de Bioquímica da Universidade de São Paulo, no Instituto de física de São Carlos (IFSMC) e ter me disponibilizado equipamentos para realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Jose Martinez da Universidade de Granada (Espanha), pelo incentivo, compreensão e preciosa orientação, mesmo que na distância, na elaboração deste trabalho.

À Profa. Dra. Leonor Alves Oliveira da Silva da Universidade Federal do Amazonas pela atenção dispensada em seu laboratório e apoio aos ensaios enzimáticos.

Aos grandes amigos conquistados durante toda trajetória percorrida desde a graduação até o mestrado: Andréa Medeiros, Aimê Oliveira, Bruna Caroline Maciel, Fabiana Greyce, Felipe Thiago Lima, Orlando Amazonas, Mayane Pereira, Mauro Galúcio, Paulo Renan, Priscila Aquino e Rita Cynnara.

Aos colegas de trabalho e em especial aos integrantes do laboratório de micro-organismos da Universidade Federal do Amazonas, pelo convívio harmonioso e produtivo e pelas lições aprendidas: Maria da Conceição, Maria de Fátima, Thais Nobre, Carol, Elissandro, Cássia Cunha, Mara e Laryssa Melo.

Aos colegas de laboratório de espectrometria de massas da Universidade Federal do Amazonas, pelo auxílio imprescindível e disposição constante para a realização dos procedimentos e das atividades de trabalho: Felipe Moura, Richardson, Elzalina, Renyer, Edson e Bruna Ribeiro.

À colega de Laboratório Adriana Dantas, que dispensou toda atenção, a qualquer momento, compartilhando seu conhecimento e auxiliando diretamente na elaboração deste trabalho.

À colega de laboratório Flávia Paiva, que prestou um auxílio indispensável para a realização dos procedimentos de ensaios enzimáticos, sempre disposta e dedicada.

Ao colega de laboratório Paulo Alexandre, que colaborou desde os primeiros meses na realização dos experimentos, ajudando-me, acompanhando e participando, mesmo quando precisava priorizar seus estudos na graduação.

À colega Mariana Tonelotto do laboratório de Bioquímica no Instituto de física da Usp de São Carlos, que auxiliou muito na condução dos experimentos, compartilhando sua experiência e trabalhando junto na bancada.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade na correção e avaliação deste trabalho.

A CAPES, pela bolsa concedida.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM por ter disponibilizado os recursos para o projeto.

Enfim, os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas e instituições que tornaram de alguma forma possível a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE ABREVIACÕES	15
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	21
3.3.1 <i>Celulose</i>	22
3.3.2 <i>Hemicelulose</i>	23
3.3.3 <i>Lignina</i>	25
3.2 ENZIMAS	25
3.3 DEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS A PARTIR DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	28
3.4 MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE CELULASES RESPONSÁVEIS PELA DEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS	29
3.5 UTILIZAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS.....	33
4. PARTE EXPERIMENTAL	36
4.1 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	36
4.2 ESTERILIZAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO E ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS E BASIDIOMICETOS.....	36
4.3 PURIFICAÇÃO, CONSERVAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO	37
4.4 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES) DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS REGIONAIS	39
4.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO DOS MICRO-ORGANISMO SEM FES	41
4.5.1 <i>Avaliação do resgate das enzimas</i>	42
4.6 DETECÇÃO DE CELULASES PELA TÉCNICA DE DIFUSÃO EM ÁGAR	42
4.7 ANÁLISES QUANTITATIVAS DE CELULASES E XILANASE	43
4.7.1 <i>Análises quantitativas de CMCase</i>	44
4.7.2 <i>Análises quantitativas de β-glicosidase</i>	44
4.7.3 <i>Análises quantitativas de FPase</i>	45

4.7.4	<i>Análises quantitativas de Xilanase</i>	45
4.8	FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FS) UTILIZANDO PALHA DE TRIGO COMO INDUTOR.....	46
4.9	CURVA DE PRODUÇÃO DAS ENZIMAS CELULOLÍTICAS E XILANOLÍTICA	48
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS LINHAGENS FÚNGICAS NOS DIFERENTES SUBSTRATOS CULTIVADOS EM FES	49
5.2	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE CELULASES ATRAVÉS DAS ANÁLISES POR DIFUSÃO EM ÁGAR.....	51
5.3	AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE CELULASE	52
5.4	ANÁLISES QUANTITATIVAS DE CELULASES (CMCase, B-GLICOSIDASE E FPase) E XILANASE EM DIFERENTES RESÍDUOS AGRÍCOLAS	54
5.4.1	<i>Casca e semente de cupuaçu</i>	54
5.4.2	<i>Casca e semente de maracujá</i>	57
5.4.3	<i>Casca de macaxeira</i>	60
5.4.4	<i>Casca de guaraná</i>	62
5.4.5	<i>Casca de urucum</i>	64
5.4.6	<i>Bagaço de cana de açúcar</i>	65
5.4.7	<i>Resíduo de pau rosa</i>	66
5.4.8	<i>Casca de coco</i>	68
5.5	COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASE PELAS LINHAGENS AVALIADAS NOS DIFERENTES SUBSTRATOS	69
5.5.1	<i>Atividade celulolítica CMCase</i>	69
5.5.2	<i>Atividade celulolítica β-glicosidase</i>	73
5.5.3	<i>Atividade celulolítica FPase</i>	78
5.5.4	<i>Atividade Xilanolítica</i>	84
5.6	CURVA DE PRODUÇÃO DE CMCase PELO PEN. 5 UTILIZANDO C. MAJ. E C. MAX COMO SUBSTRATO	91
5.7	CURVA DE PRODUÇÃO DE B-GLICOSIDASE PELO PEN. 5 UTILIZANDO C. MAJ. E C. MAX COMO INDUTOR	93
5.8	CURVA DE PRODUÇÃO DE XILANASE PELO PEN. 5 UTILIZANDO C. MAJ. E C. MAX COMO INDUTOR	95
6.	CONCLUSÃO	97
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Micro-organismos envolvidos em processos biotecnológicos.	34
Tabela 2: Identificação das linhagens fúngicas isoladas da floresta Amazônica.	40
Tabela 3: Avaliação da taxa de crescimento observado para as cinco espécies de <i>Penicillium</i> sp. em diferentes substratos.....	49
Tabela 4: Avaliação da taxa de crescimento para os 5 basidiomicetos nos diferentes substratos.	50
Tabela 5: Produção de celulase pelas linhagens de <i>Penicillium</i> spp. e Basidiomicetos cultivados em dez diferentes substratos.....	53
Tabela 6: Resultados das atividades enzimáticas de CMCase em UI/mL dos dez fungos fermentados em estado sólido em diferentes substratos.....	71
Tabela 7: Resultados das atividades enzimáticas de CMCase em UI/mL dos dezesseis fungos em fermentação submersa utilizando palha de trigo.....	72
Tabela 8: Resultados das atividades enzimáticas de β -glicosidase em UI/mL dos dez fungos fermentados em estado sólido em diferentes substratos.....	75
Tabela 9: Resultados das atividades enzimáticas de β -glicosidase em UI/mL dos dezesseis fungos em fermentação submersa utilizando palha de trigo.....	76
Tabela 10: Resultados das atividades enzimáticas de FPase em UI/mL dos dez fungos fermentados em estado sólido em diferentes substratos.....	81
Tabela 11: Resultados das atividades enzimáticas de FPase em UI/mL dos dezesseis fungos em fermentação submersa utilizando palha de trigo.	82
Tabela 12: Resultados das atividades enzimáticas de xilanase em UI/mL dos dez fungos por fermentação em estado sólido em diferentes substratos.....	88
Tabela 13: Resultados das atividades enzimáticas de xilanase em UI/mL dos dezesseis fungos em fermentação submersa utilizando palha de trigo.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da parede celular vegetal com os principais constituintes.....	22
Figura 2: Estrutura da cadeia linear unidas por ligações glicosídicas formando a celulose.	23
Figura 3: Açúcares que compõem a camada de hemicelulose.	24
Figura 4: Representação estrutural da Lignina.	26
Figura 5: Representação esquemática da estrutura química onde atuam as enzimas celulases.....	29
Figura 6: Fotos de fungos produtores de celulases: (A) foto macroscópica do gênero <i>Trichoderma</i> e (B) foto microscópica de <i>Streptomyces</i> :	30
Figura 7: Fotos da espécie de <i>Aspergillus niger</i> : (A) foto microscópica e (B) foto macroscópica.	31
Figura 8: Fotos de gêneros de <i>Penicillium</i> : (A) foto macroscópica e (B) foto microscópica de uma espécie de <i>Penicillium</i> sp.	32
Figura 9: Representação esquemática de diluição seriada a partir da solução de Tween. ..	38
Figura 10: Representação esquemática da purificação por sucessivos repiques.	39
Figura 11: Fermentação em estado sólido em diferentes substratos.	41
Figura 12: Sistema de filtração a vácuo com filtros de millipore de 0,22 µm.	42
Figura 13: Esquema dos ensaio qualitativo de celulase realizado pela técnica de difusão em ágar.	43
Figura 14: Cultivo das dezesseis linhagens fúngicas Amazônicas por fermentação submersa utilizando palha de trigo como indutor.....	47
Figura 15: Ensaio comparativos dos extratos enzimáticos obtidos pela FES utilizando Sem. Maj. como substrato. Placa 1: Ensaio qualitativo da primeira extração (1a1 = Pen. 1; 2a1 = Pen. 2; 3a1 = Pen. 3; 4a1 = Pen. 4; 5a1 = Pen. 5 e C = controle); Placa 2: Ensaio qualitativo da segunda extração extração (1a2 = Pen. 1; 2a2 = Pen. 2; 3a2 = Pen. 3; 4a2 = Pen. 4; 5a2 = Pen. 5); Placa 3: Ensaio qualitativo da terceira extração (extração (1a3 = Pen. 1; 2a3 = Pen. 2; 3a3 = Pen. 3; 4a3 = Pen. 4 e 5a3 = Pen. 5).....	51
Figura 16: Ensaio comparativos dos extratos enzimáticos obtidos pela FES utilizando C. Uru. como substrato. Placa 1: Ensaio qualitativo da primeira extração (1a1 = Pen. 1; 2a1 = Pen. 2; 3a1 = Pen. 3; 4a1 = Pen. 4; 5a1 = Pen. 5 e C = controle); Placa 2: Ensaio qualitativo da segunda extração extração (1a2 = Pen. 1; 2a2 = Pen. 2; 3a2 = Pen. 3; 4a2 = Pen. 4; 5a2	

= Pen. 5); Placa 3: Ensaio qualitativo da terceira extração (extração (1a3 = Pen. 1; 2a3 = Pen. 2; 3a3 = Pen. 3; 4a3 = Pen. 4 e 5a3 = Pen. 5).....	52
Figura 17: Placa com meio CMC revelada com vermelho congo 0,1%. O halo translúcido (Øh) indica a ação enzimática celulase.....	54
Figura 18: Atividades de CMCCase e xilanase das linhagens fúngicas avaliadas em casca de cupuaçu.....	55
Figura 19: Atividades de CMCCase e xilanase das linhagens fúngicas avaliadas em semente de cupuaçu.....	55
Figura 20: Atividades de β -glicosidase e FPase das linhagens fúngicas avaliadas em casca de cupuaçu.....	57
Figura 21: Atividades de β -glicosidase e FPase das linhagens fúngicas avaliadas em semente de cupuaçu.....	57
Figura 22: Atividades de CMCCase e xilanase das linhagens fúngicas avaliadas em casca de maracujá.....	59
Figura 23: Atividades de CMCCase e xilanase das linhagens fúngicas avaliadas em semente de maracujá.....	59
Figura 24: Atividades de β -glicosidase e FPase das linhagens fúngicas avaliadas em casca de maracujá.....	60
Figura 25: Atividades de β -glicosidase e FPase das linhagens fúngicas avaliadas em semente de maracujá.....	60
Figura 26: Atividades de CMCCase e xilanase das linhagens fúngicas avaliadas em casca de macaxeira.....	61
Figura 27: Atividades de β -glicosidase e FPase das linhagens fúngicas avaliadas em casca de macaxeira.....	62
Figura 28: Atividades de CMCCase e xilanase das linhagens fúngicas avaliadas em casca de guaraná.....	63
Figura 29: Atividades de β -glicosidase e FPase das linhagens fúngicas avaliadas em casca de guaraná.....	63
Figura 30: Atividades de CMCCase e xilanase das linhagens fúngicas avaliadas em casca de urucum.....	64
Figura 31: Atividades de β -glicosidase e FPase das linhagens fúngicas avaliadas em casca de urucum.....	65

Figura 32: Atividades de CMCCase e xilanase das linhagens fúngicas avaliadas em bagaço de cana de açúcar.	66
Figura 33: Atividades de β -glicosidase e FPase das linhagens fúngicas avaliadas em bagaço de cana de açúcar.	67
Figura 34: Atividades de CMCCase e xilanase das linhagens fúngicas avaliadas em resíduo de pau rosa.	68
Figura 35: Produção de CMCCase por dez fungos testados em FES utilizando diferentes substratos.	73
Figura 36: Produção de CMCCase por dezesseis fungos testados em FS utilizando palha de trigo.	73
Figura 37: Produção de β -glicosidase por dez fungos testados em FES utilizando diferentes substratos.	77
Figura 38: Produção de β -glicosidase por dezesseis fungos testados em FS utilizando palha de trigo.	77
Figura 39: Produção de FPase por dez fungos testados em FES utilizando diferentes substratos.	83
Figura 40: Produção de FPase por dezesseis fungos testados em FS utilizando palha de trigo.	83
Figura 41: Produção de xilanase por dez fungos testados em FES utilizando diferentes substratos.	90
Figura 42: Produção de xilanase por dezesseis fungos testados em FS utilizando palha de trigo.	90
Figura 43: Curva de produção enzimática de CMCCase (UI/mL) por Pen. 5 utilizando dois indutores (C. Maj. e C. Max).	91
Figura 44: Curva de produção enzimática de β -Glicosidase (UI/mL) por Pen. 2 utilizando dois indutores (C. Maj. e C. Max.).	93
Figura 45: Tiras reagentes utilizadas como teste qualitativo para indicar a presença de glicose.	94
Figura 46: Curva de produção enzimática de xilanase (UI/mL) por Pen 02 utilizando dois indutores (C. Maj. e C, Max).	96

LISTA DE ABREVIÇÕES

BDA – batata + dextrose + ágar
FES – Fermentação no estado sólido
C. Cup – Casca de cupuaçu
Sem. Cup – Semente de cupuaçu
C. Maj. – Casca de maracujá
S. Maj. – Semente de maracujá
C. Max. – Casca de macaxeira
C. Uru. – Casca de urucum
C. Coc. – Casca de coco
C. Guar. – Casca de guaraná
R.Pau Rosa – R. de Pau Rosa
B. Cana – Bagaço de cana de açúcar
Bas. 1 – Basidiomiceto Bas 3 M 1.1.1
Bas. 2 – Basidiomiceto B05 1.1
Bas. 3 – B01 controle
Bas. 4 – B05 3.1
Bas. 5 – B05 1.3
Pen. 1 – (Stsp C1-2/1-1a)
Pen. 2 – (Stsp C2-3/1-2C)
Pen. 3 – (PBR R2 2.2)
Pen. 4 – (Stsp R2 1.1)
Pen. 5 – (Ansp cg3 1.2c)
Colle – *Colletotrichum* sp. (Mg F40 1.1a)
CMC – Carboximetilcelulose
CMCase – Carboximetilcelulase
FPase – *Filter Paper Hydrolases*
DNS – Ácido 3,5- dinitrosalicílico
PCR – *polymerase chain reaction*
FS – Fermentação submersa
PT – Palha de trigo
IFSC – Instituto de física de São Carlos
KH₂ PO₄ – Fosfato de potássio monobásico
(NH₄)₂SO₄ – Sulfato de amônio
MgSO₄.7H₂O – Sulfato de magnésio heptahidratado
Na₂HPO₄.2H₂O – Fosfato de sódio dibásico dihidratado

RESUMO

“AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASE PELA DEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS REGIONAIS POR FUNGOS DA AMAZÔNIA”

A degradação da biomassa, rica em materiais lignocelulósicos, é um dos processos mais investigados atualmente, visto o seu potencial para a produção de biocombustíveis de segunda geração com impacto positivo na redução da deposição desses resíduos no meio ambiente. Considerando que a degradação de materiais lignocelulósicos é um processo muito complexo, uma das alternativas mais promissoras reside no uso de enzimas de micro-organismos que tenham a capacidade de realizá-lo de forma sustentável. Sendo assim, este trabalho objetivou selecionar fungos provenientes de diferentes ambientes da região Amazônica com potencial para a produção de celulases e xilanase. Cinco fungos endofíticos do gênero *Penicillium* e cinco basidiomicetos foram cultivadas a 28 °C e 26 °C, respectivamente, por 192 h em fermentação em estado sólido utilizando 5 g de diferentes substratos: casca e semente de cupuaçu, casca e semente de maracujá, casca de macaxeira, casca de urucum, casca de coco, casca de guaraná, bagaço de cana de açúcar e torta de pau rosa. Após 192 h, ensaios qualitativos mostraram bons resultados para a maioria dos *Penicillium* spp. e alguns basidiomicetos. Nos ensaios quantitativos, os melhores resultados foram para *Penicillium* sp. 02 em casca de maracujá com as atividades de 13,44 UI/mL para CMCase, 0,02 UI/mL para β -glicosidase e 0,02 UI/mL para FPase. Os melhores resultados para xilanase foram observados em casca de urucum pelos *Penicillium* sp. 04 com 5,12 UI/mL e *Penicillium* sp. 05 com 4,35 UI/mL. Em fermentação submersa, 16 linhagens foram cultivadas por cinco dias usando farelo de trigo como indutor. A cada 24 h alíquotas foram avaliadas. As linhagens de *Aspergillus niger* apresentaram as máximas produções de celulases (CMCase, β -glicosidase e FPase) enquanto que *Penicillium* spp. foram melhores para produção de xilanase. As atividades de ambos os tipos de enzimas foram baixas para os basidiomicetos. Os bons resultados alcançados nesta pesquisa confirmam o potencial celulolítico e xilanolítico dos fungos endofíticos e basidiomicetos amazônicos, credenciando-os para a produção de produtos biotecnológicos, como o bioetanol de segunda geração e a compostagem, um valor a agregar na produção agrícola do estado do Amazonas.

Palavras-chave: Celulases, xilanase, resíduos agrícolas e fungos da Amazônia.

ABSTRACT

“EVALUATION OF THE PRODUCTION OF CELLULASES AND XYLANASE BY THE DEGRADATION OF REGIONAL AGRICULTURAL RESIDUES BY AMAZONIAN FUNGI”

Degradation of biomass, plentiful of lignocellulosic materials, is among the more investigated processes, seen its potential for the production of second generation biofuels, with positive impact in reducing the disposal of such waste in the environment. As degrading lignocellulosic materials is a very complex process, an of the most promising alternative is using enzymes from microorganisms able to make it on a sustainable way. The present work aimed to select fungi from different Amazon environments having potential for production of cellulases and xylanase. Five of *Penicillium* endophytic fungi and five of basidiomycetes were grown at 28 °C and 26 °C, respectively, by 192 h in solid state fermentation (SSF) in 5 g of different substartes: bark and seed of cupuaçu, bark and seeds of the passion fruit, peel cassava, annatto shell, coconut shell, husk guarana, sugar cane bagasse and waste rosewood. Five *Penicillium* spp. had good growth in bark and seeds of the passion fruit and peel cassava and reasonable growth in husk guarana. Four basidiomycetes grew well to in peel cassava also. After 192 h, qualitative tests showed good results to most *Penicillium* spp. and some basidiomycetes. On quantitative assays, the best results were for *Penicillium* sp. 02 of the bark passion fruit with the activities of 13.44 IU / mL for CMCase, 0.02 IU / mL for β - glucosidase and 0.02 IU / mL for FPase. The best results were observed for xylanase in annatto shell by *Penicillium* sp. 04 with 5.12 IU / mL and *Penicillium* sp. 05 with 4.35 IU / mL. In submerged fermentation, 16 strains were cultured for five days using wheat bran as an inducer. Every 24 h aliquots were evaluated. The strains of *Aspergillus niger* showed maximum production of cellulase (CMCase, β - glucosidase and FPase) whereas *Penicillium* spp. were better for xylanase production. The activities of both types of enzymes were low for the basidiomycetes. The good results achieved in this research confirm the cellulolytic and xylanolytic potential of endophytic fungi and basidiomycetes Amazon, qualifying them for the production of biotechnological products such as second generation bioethanol and composting, add a value to the agricultural production of the state of Amazonas.

Key words: cellulases, xylanase, agricultural waste and Amazon fungi.

1. INTRODUÇÃO

Ainda hoje, os combustíveis de origem fóssil como o gás natural, o petróleo e seus derivados são os principais responsáveis pela produção mundial de energia, porém além de suas reservas serem finitas, esses combustíveis também são os principais responsáveis pela emissão de gases poluentes, com forte impacto negativo nas mudanças climáticas.

A procura incessante por fontes renováveis na produção de combustíveis e preservação do meio ambiente levam à utilização de matéria orgânica renovável mais conhecida como biomassa. Assim, a conversão da biomassa é uma alternativa bastante eficaz para a produção de energia alternativa, mas também para a obtenção de produtos de alto valor agregado como enzimas, etanol, proteínas, etc., com a vantagem de que o seu uso pode diminuir o impacto da poluição do meio ambiente. Há uma tendência mundial de crescimento do uso de diferentes biomassas principalmente as de origem vegetal, como os resíduos agrícolas que são as de maior abundância. O Brasil deve desenvolver suas próprias tecnologias para o seu melhor aproveitamento desses resíduos, considerando que há obstáculos a transpor, principalmente quanto à complexidade das substâncias que os compõem.

Quanto às enzimas, sabe-se que seu uso prático vem sendo explorado a milhares de anos, ou pela forma direta no emprego de preparações enzimáticas brutas, ou indireta pelo aproveitamento da produção enzimática decorrente do crescimento microbiano. Este último, apesar de ser relativamente recente é o que constitui o grande setor industrial biotecnológico (NEIDLEMAN, 1991).

BORGES (2011) e HASAN et al. (2006) relatam que pelo menos 500 tipos de enzimas chegam a garantir 50 aplicabilidades biotecnológicas em diversos segmentos econômicos, como papel e celulose, indústria de alimentos e têxtil, entre outros, porém poucas ainda são as enzimas utilizadas na transformação de resíduos agrícolas.

Há um grande desafio para produzir enzimas de baixo custo e bom rendimento com capacidade eficaz de degradar resíduos lignocelulósicos e transformá-los em carboidratos menores como dissacarídeos (celobiose) ou monossacarídeos (glicose, frutose, xilose) para fins econômicos como a produção do etanol celulósico, e um dos entraves ainda é o desenvolvimento de processos eficientes e otimizados. Os micro-organismos são peças-chaves para tal desenvolvimento, pois produzem uma diversidade de enzimas específicas aptas em modificar moléculas e capazes de decompor uma variedade de materiais lignocelulósicos (BHAT, 2000; SÁNCHEZ, 2009). Atualmente o *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) é o mais importante produtor industrial de enzimas celulases e hemicelulases (SCHUSTER, et al., 2011), porém é incessante a procura por novas linhagens de micro-organismos que secretem enzimas responsáveis pela degradação da biomassa lignocelulósica do meio ambiente (RAVINDRAN et al., 2012).

Sabe-se que o Brasil destaca-se em biodiversidade, principalmente na floresta Amazônica em que se encontra uma vasta diversidade microbiana, porém são poucos os estudos voltados ao seu potencial tecnológico. Diante deste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de fungos da região Amazônica quanto à produção de enzimas celulolíticas e xilanolítica a partir da degradação de resíduos agrícolas regionais por fermentação em estado sólido, para que no futuro sejam aplicados em bioprocessos para produção de bioetanol de segunda geração.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de fungos amazônicos quanto à produção de enzimas celulasas e xilanase pela degradação de resíduos agrícolas regionais.

2.2 Objetivos específicos

1. Submeter dez substratos, oriundos de resíduos agrícolas regionais, à fermentação em estado sólido por dez fungos Amazônicos sendo cinco do gênero *Penicillium* e cinco basidiomicetos.
2. Avaliar qualitativamente, com substratos cromogênicos, as enzimas celulasas produzidas na fermentação em estado sólido (FES) pelos fungos amazônicos.
3. Avaliar quantitativamente por espectrofotometria de UV, as enzimas celulasas e xilanases produzidas na FES e na fermentação submersa (FS) por fungos amazônicos.
4. Obter as curvas de produção de celulasas e xilanase em FS usando palha de trigo como indutor pelas dez linhagens utilizadas na FES e mais seis diferentes linhagens.
5. Obter as curvas de produção de celulasas e xilanase em FS utilizando pelo menos dois substratos com os melhores resultados pela linhagem com melhor desempenho na fermentação submersa.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

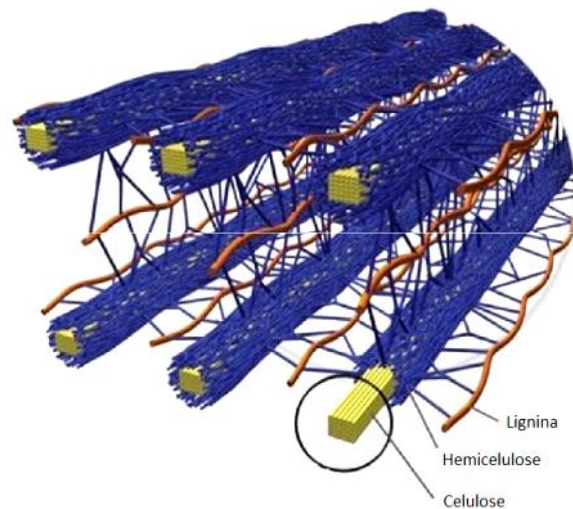
3.1 Biomassa Lignocelulósica

A biomassa é todo recurso renovável oriundo da matéria orgânica tanto vegetal como animal que pode ser utilizada na produção de energia, produtos químicos, dentre outros (MARCONATO, 2008). É a fonte renovável mais abundante na natureza e engloba majoritariamente os resíduos agroindustriais, resíduos urbanos e madeiras de angiospermas e gimnospermas (SZENGYELL et al., 2000)

Os resíduos agrícolas são biomassas lignocelulósicas provenientes de atividades agrícolas e são consideradas como as maiores fontes de carboidratos sendo abundantes no Brasil. São constituídos principalmente de três frações poliméricas: celulose, hemicelulose e lignina (BADHAN et al., 2007) as quais se encontram unidas entre si por ligações covalentes, formando uma rede resistente a ataques microbianos (SÁNCHEZ, 2009) (Figura 1). A dificuldade de converter a biomassa lignocelulósica em insumos químicos é atribuída às suas características químicas e morfológicas.

Internamente, as fibrilas de celulose são constituídas de microfibrilas. Cada microfibrila é formada por um pequeno número de feixes de moléculas de celulose (fibrilas elementares) e cada molécula de celulose é formada por mais de mil resíduos de glicose, os quais se interligam por ligações de hidrogênio (ROLAND et al., 1992). Essas fibrilas encontram-se envolvidas pela lignina cuja função é aumentar a resistência da estrutura a ataques químicos e enzimáticos. A hemicelulose é a principal fração, pois ela atua como um elo químico entre a celulose e a lignina. A união das três frações resulta na flexibilidade dos materiais, porém altamente resistentes (SÁNCHEZ, 2009).

Figura 1: Estrutura da parede celular vegetal com os principais constituintes.



Fonte: Kondo (1997) (modificada).

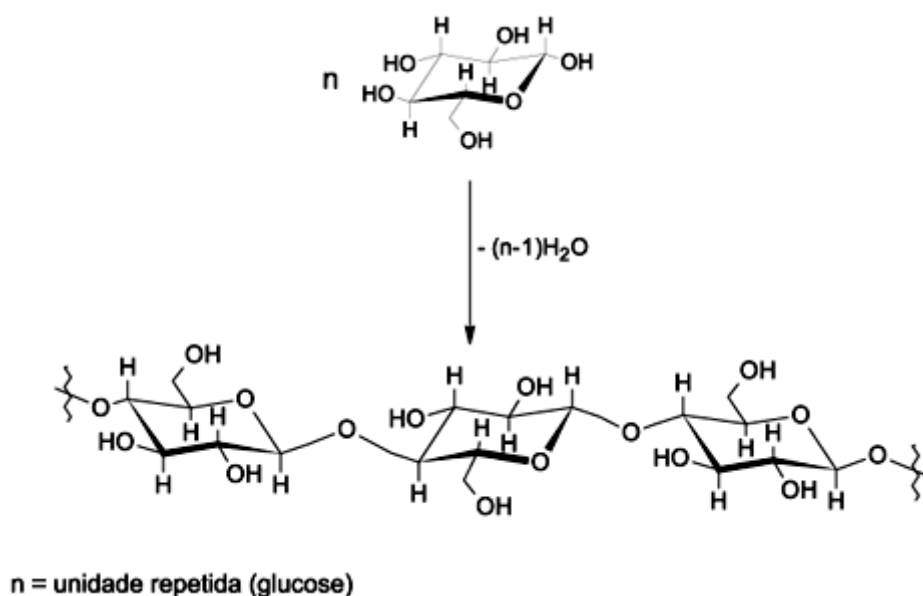
3.3.1 Celulose

A celulose é um polissacarídeo que possui um alto valor agregado, é encontrado nos materiais lignocelulósicos e o polímero mais abundante na natureza. É um polissacarídeo não ramificado formado por dissacarídeos celobiose, as quais estão dispostas em cadeias lineares de resíduos de D-glicose unidos por ligações glicosídicas β 1-4 (Figura 2). A conformação mais estável dos anéis de glicose é a forma de cadeira com os grupos hidroxila na posição equatorial (ZHANG, LYND, 2004).

Para que ocorra a formação de celulose, as cadeias lineares de polímeros adjacentes interagem entre si por ligações de hidrogênio, fazendo com que as estruturas se organizem e tenham formatos de microtubos compridos denominados de microfibrilas. Essas microfibrilas, por sua vez, agrupam-se formando as fibras de celulose que também se agrupam em regiões cristalinas mais organizadas, onde fibrilas de celulose se encontram unidas por ligações de hidrogênio entre cadeias inter e intra moleculares e por forças de Van der Waals, resultando assim em uma fibra com alto grau de compactação (LYND et al., 2002).

Por serem estruturas compactas, as regiões cristalinas da celulose lhe conferem uma estrutura coesa e ordenada, sendo impermeáveis à água e resistentes à degradação química e biológica. A celulose pode ser encontrada de duas formas, na forma pura como no algodão ou diretamente associada à hemicelulose e lignina como são encontradas na parede celular de diferentes vegetais (SANDGREN et al., 2005).

Figura 2: Estrutura da cadeia linear unidas por ligações glicosídicas formando a celulose.



Fonte: Sjöström (1993).

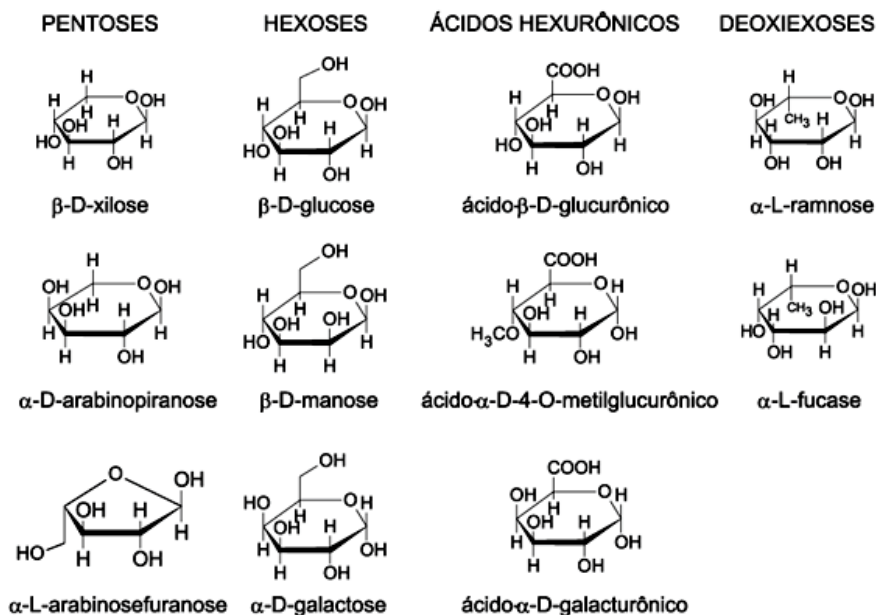
3.3.2 Hemicelulose

As hemiceluloses também conhecidas como polioses estão quase paralelas às fibrilas de celulose, mas se diferenciam substancialmente por serem amorfas. Possuem estruturas ramificadas compostas pela combinação de vários açúcares (D-xilose, D-manose, D-arabinose, D-galactose, D-glicose, etc.) (Figura 3), podendo ainda apresentar compostos como os ácidos urônicos e desoxi-hexoses. Com isso elas são classificadas de acordo com os açúcares presentes na cadeia principal do polímero, logo xilanas, glicanas,

arabinanas, mananas e galactanas dentre outras são hemiceluloses (FENGEL, WEGENER, 1989). As polioses podem ser homopolímeros (por exemplo, xilana) ou heteropolímeros (por exemplo, glicomanana) (FERRAZ, 2004).

As xilanas são os polissacarídeos mais abundantes entre as hemiceluloses e estão presentes em todas as camadas da parede celular vegetal, mas em concentrações maiores nas camadas primárias e secundárias (WONG et al., 1988). Elas são cadeias lineares de monossacarídeos com unidades de xilose e são de grande importância para a parede celular, por apresentarem interações covalentes e não-covalentes com outros constituintes dando-lhes o poder de coesão e adesão das fibras, além da manutenção da integridade da parede celular vegetal e proteção da celulose contra o ataque de enzimas celulósicas (BEG et al., 2001).

Figura 3: Açúcares que compõem a camada de hemicelulose.



Fonte: Fengel e Wegener (1989).

3.3.3 Lignina

A biomassa lignocelulósica produzida no planeta é composta por aproximadamente 25% de lignina atingindo até 45% do peso seco de resíduos vegetais. As ligninas são macromoléculas amorfas aromáticas, compostas basicamente por unidades de fenilpropano, contendo subestruturas fenólicas (10-20%) e não fenólicas (80-90%) e têm como função principal nos tecidos vegetais, proporcionar rigidez, resistência à hidrólise e defesa contra enfermidades (FENGEL, WEGENER, 1989).

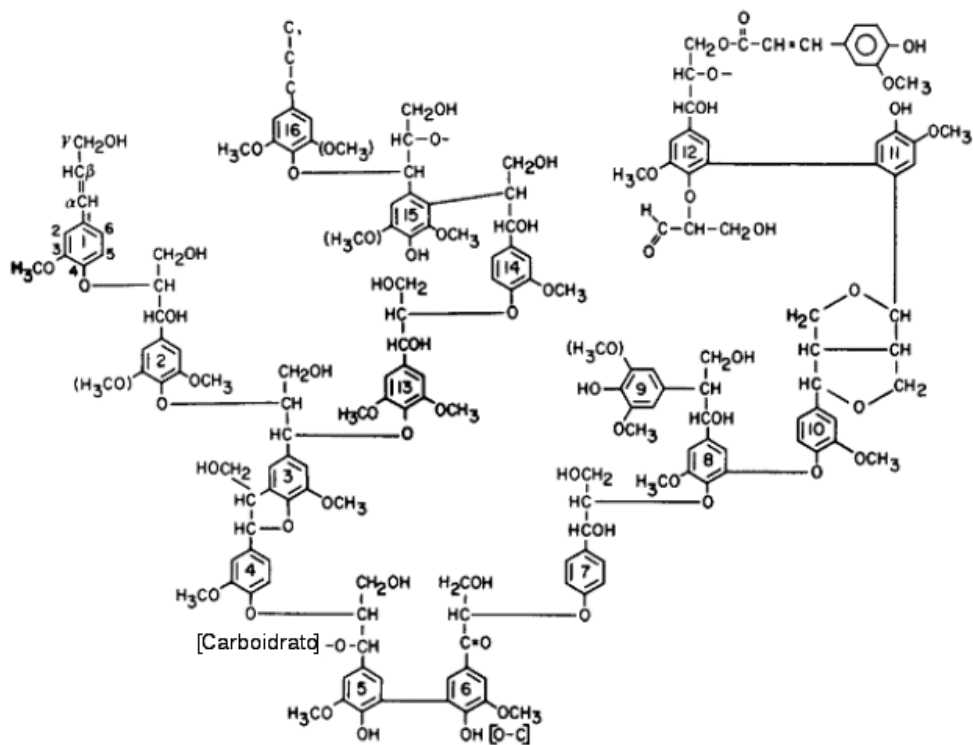
A lignina se encontra em associação com a celulose e a hemicelulose na composição de materiais lignocelulósicos (SILVA et al., 2009). O conteúdo de lignina se encontra distribuído nas diferentes regiões da célula e nas plantas esse conteúdo aumenta com a maturidade fisiológica (FENGEL, WEGENER, 1989). Com relação a sua estrutura química, as unidades de fenilpropano estão acopladas de forma irregular, o que é atribuído ao mecanismo de biossíntese da lignina que se processa por via radicalar a partir da reação de três diferentes precursores de álcoois cinamílicos. Os diferentes tipos de acoplamento entre os precursores dão origem a diferentes tipos de ligações entre as unidades de fenilpropano (Figura 4) como β -O-4 e α -O-4 (50-65%), β -1 (9-15%), β -5 (6-15%), 5-5 (2-9%) e β - β (2-5%) (FERRAZ, 2004).

3.2 Enzimas

Enzimas são substâncias orgânicas, geralmente proteínas, que catalisam reações biológicas pouco espontâneas e muito lentas. São capazes de diminuir a energia de ativação requerida e formar um complexo de transição ativado a fim de originar um produto (REX, 1969). A sua biossíntese pode estar associada ao crescimento da biomassa, com taxa de formação do produto proporcional ao aumento da biomassa, ou não associada

ao crescimento celular com a taxa de produto ficando independente dela (SCHIMIDELL et al., 2011).

Figura 4: Representação estrutural da Lignina.



Fonte: Kirk e Farrell (1987).

Em condições brandas de reação, as enzimas são bastante ativas e versáteis podendo executar uma variedade de transformações de modo seletivo e rápido. Além disso, há uma facilidade relativa de regulação da atividade enzimática, bastando modificar a natureza do meio de reação, como, por exemplo, pela alteração do pH. Devido sua especificidade, ela catalisa as transformações moleculares sem que haja ocorrência de reações paralelas indesejáveis que são comuns em sínteses químicas (PIZARRO, PARK, 2003).

As enzimas possuem basicamente dois grupos que são responsáveis pela degradação de materiais lignocelulósicos que são: enzimas hidrolases e as oxidativas,

sendo as hidrolases celulases e hemicelulases as principais responsáveis pela quebra da celulose.

As hidrolases são um tipo específico de enzimas que atuam como catalisadores no desdobramento de compostos por reação com moléculas de água. Elas correspondem às enzimas do complexo celulolítico que clivam ligações glicosídicas e são classificadas de acordo com a Enzyme Commission (EC) a qual integrou uma codificação 3.2.1.x, onde a variação do tipo de enzima celulásica utilizada é designada pelo valor de “x” (LYND et al., 2002).

No que diz respeito às celulases, há um modelo básico de ação dessas enzimas no sistema dos fungos. Esse sistema possui três principais enzimas que atuam em locais distintos do substrato celulósico e são elas: endoglucanases, exoglucanases, e β -glicosidases (LYND et al., 2002). Quando atuam em conjunto, elas apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais, ou seja, quando há atuação isolada umas das outras em um efeito conhecido como sinergia.

A estrutura das celulases é constituída por um sequência de aminoácidos de estrutura complexa e específica, a qual se divide em três regiões: domínio catalítico (DC), caracterizado como parte da molécula em que ocorre a catálise e que abrange cerca de 90% do número total de dez aminoácidos da sequência peptídica; a região de ligação (RL) onde contém uma pequena parte de aminoácidos altamente glicosilados, cuja função é ligar o domínio catalítico a uma terceira região constituída pelo módulo de ligação a carboidratos (MLC) e os MLCs que são pequenos polipetídeos estáveis que podem conter de 40 a 120 aminoácidos e são localizados, na cadeia de aminoácidos da enzima (CASTRO, PEREIRA, 2010). As celulases constituem-se como um complexo enzimático capaz de atuarem sobre materiais celulósicos promovendo a hidrólise (LYND et al., 2002).

3.3 Degradação de resíduos lignocelulósicos a partir de hidrólise enzimática

Os resíduos lignocelulósicos são de grande importância por apresentarem um alto valor agregado além de grande potencial econômico. Eles apresentam em sua composição de 20 a 60% de celulose, 20 a 30% de hemicelulose e 15 a 30% de lignina (COWLING, KIRK, 1976).

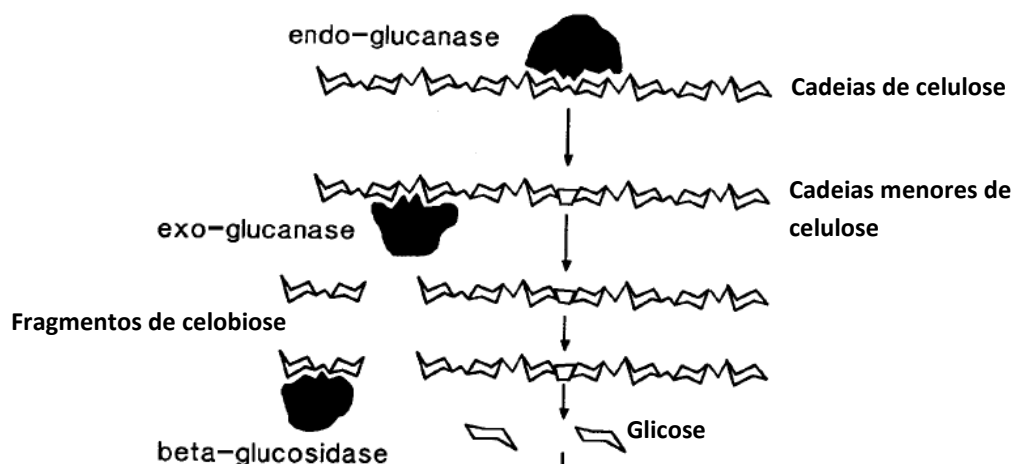
Atualmente a bioconversão é um dos processos mais estudados para o aproveitamento desses resíduos, porém algumas das características desse material inibem a sua degradação e até mesmo processos de bioconversão. A acessibilidade, o grau de cristalinidade, o grau de polimerização e a distribuição da lignina são uma das características que mais contribuem para essa inibição (PALOMEN et al, 2004). Uma das alternativas viável para a digestibilidade de resíduos lignocelulósicos é a hidrólise enzimática, pois o uso de enzimas leva a alteração da estrutura da biomassa celulósica convertendo a celulose em monômeros de açúcares fermentáveis.

Basicamente a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos acontece por meio das enzimas celulolíticas que são altamente específicas (ZHANG, LYND, 2004). O processo de hidrólise se inicia com a quebra aleatória das cadeias de celulose pelas endoglucanases (endo-1,4- β -D-glucanases, CMCase, E.C 3.2.1.4) formando cadeias com extremidades livres, em seguida as exoglucanases (exo-1,4- β -D-glucanases, FPase, E.C 3.2. 1. 91) atuam nas extremidades redutoras e não redutoras das cadeias cristalinas de celulose produzindo majoritariamente celobiose, além de glicose e celotriose e por fim as β -glucosidases ou celobiasas hidrolisam a celobiose formando duas moléculas de glicose (LYND et al., 2002) (Figura 5).

Segundo Martin et al. (2006), a hidrólise é necessária para a conversão de polissacarídeos da lignocelulose a açúcares fermentescíveis. Porém há limitações quanto à

atividades enzimáticas das celulases e essas limitações estão associadas à insolubilidade do substrato o que leva à baixa produção de açúcar (PÉREZ, SAMAIN, 2011).

Figura 5: Representação esquemática da estrutura química onde atuam as enzimas celulases.



Fonte: Wright, et al (1988).

3.4 Micro-organismos produtores de celulases responsáveis pela degradação de resíduos lignocelulósicos

Durante a Segunda Guerra Mundial, os soldados das forças armadas perceberam que muitas roupas encontravam-se deterioradas, não somente pelo desgaste contínuo, como também pela ação de diferentes organismos. Devido a essa problemática que afetava todo o acampamento, surgiram algumas organizações com intuito de fazer uma detetização dos organismos agentes das deteriorações, além de descobrir seus mecanismos de ação e métodos de controle. As forças armadas montaram laboratórios em busca de explicações e soluções imediatas para esse problema. Dentre as milhares de amostras coletadas, uma foi identificada como *Trichoderma viride* (atualmente denominado *T. reesei*, em homenagem ao seu descobridor, Elwyn Reese) capaz de converter celulose em seus monômeros (CASTRO, 2006).

Graças ao isolamento deste fungo surgiram diversos grupos de pesquisas que atualmente investigam o potencial de uma diversidade de micro-organismos os quais incluem bactérias e fungos em sintetizar enzimas celulolíticas. Dentre os fungos filamentosos, os dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium* são os mais utilizados na indústria para a produção de celulases (GODFREY, WEST, 1996).

Existe uma grande diversidade de micro-organismos na natureza que produzem celulase, no entanto, apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, ou seja, capazes de degradar a celulose natural (SÁNCHEZ, 2009), que inclui entre outros os *Streptomyces*, fungos filamentosos (*Trichoderma*, *Bulgaria*, *Helotium*, *Poria*, *Aspergillus*, etc) (Figura 6), animais (moluscos e insetos), entre outros (LYND et al., 2002). Dentre todos os organismos considerados celulolíticos, alguns dos mais utilizados industrialmente na produção de celulases são os fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium* (ZHANG, HIMMEL, MIELENZ, 2006; SINGHANIA et al., 2010).

Figura 6: Fotos de fungos produtores de celulases: (A) foto macroscópica do gênero *Trichoderma* e (B) foto microscópica de *Streptomyces*:



(A)

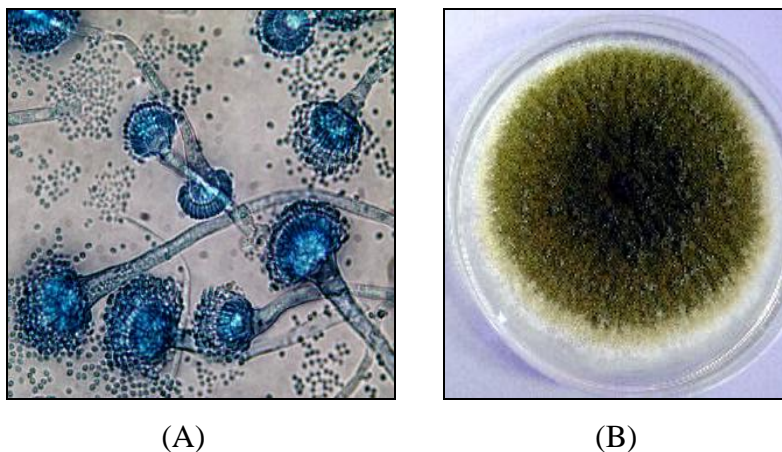
(B)

Fonte: www.scharfphoto.com

Fungos do gênero *Aspergillus* são pertencentes ao filo Ascomycota, à ordem Eurotiales e à família Trichocomaceae. São fungos filamentosos, cosmopolitas que habitam os solos e resíduos vegetais (Figura 7). Quanto a sua morfologia, são produtores de mícelios septados e ramificados, cujas porções vegetativas encontram-se submersas ao nutriente (SILVEIRA, 1997). Através do sequenciamento genético de *Aspergillus niger*, pesquisadores descobriram uma grande variedade de celulases e hemicelulases em relação ao fungo *Trichoderma reesei* (MARTINEZ et al., 2008), fungo considerado grande produtor de celulases (MATHEW et al., 2008).

Por possuir características distintas, esse fungo *A. niger* é muito apreciado pelas indústrias, pois apresenta grande capacidade de fermentação e elevados níveis de secreções de proteínas, além de grande variedade de enzimas produzidas para diversas aplicações (LIU et al., 2008). Outro gênero muito abordado no ramo da produção de celulase é o *Penicillium*, e sendo semelhante ao gênero *Aspergillus*, constitui-se de fungos saprófitos, mesofílicos, pertencentes à divisão Ascomycota, à ordem Eurotiales e à família Trichocomaceae.

Figura 7: Fotos da espécie de *Aspergillus niger*: (A) foto microscópica e (B) foto macroscópica.



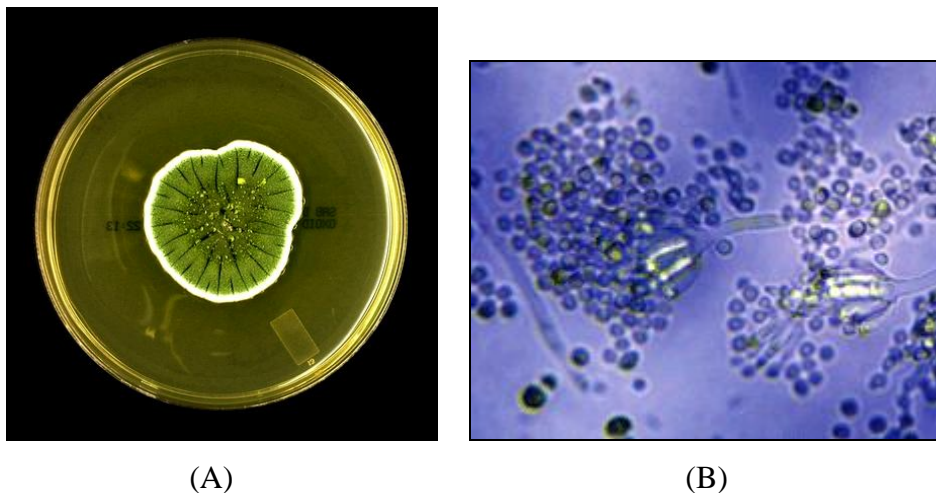
Fonte: <http://www.eapcri.eu/>

Os membros do gênero *Penicillium* são filamentosos com exceção do *Penicillium marneffei*; sua reprodução é do tipo sexuada pela formação de ascósporos (esporos sexuais internos). Tem como característica a produção de micélios vegetativos septados que penetram no substrato (em caso de cultivo estático), produzindo hifas aéreas, nas quais se desenvolvem conidióforos onde se formam os conídios (esporos assexuais) (PELCZAR, CHAN, KRIEG, 1996) (Figura 8).

São considerados comumente como contaminantes podendo causar infecções, particularmente em imunodeprimidos, além de produzirem micotoxinas (compostos químicos venenosos produzidos por certos fungos) (PELCZAR, CHAN, KRIEG, 1996) e algumas espécies como *P. echinulatum* podem produzir enzimas celulolíticas para aplicação tecnológica (CAMASSOLA, DILLON, 2007).

Algumas leveduras do gênero *Trichosporium* também são produtoras de xilanases e celulases, assim como diversas espécies de *Aspergillus* sp. produzem altos níveis de glicosidase (STEVENS, PAYNE, 1997).

Figura 8: Fotos de gêneros de *Penicillium*: (A) foto macroscópica e (B) foto microscópica de uma espécie de *Penicillium* sp.



Fonte: <http://www.itqb.unl.pt/news/taking-ionic-liquids-to-the-next-level-at-itqb>

3.5 Utilização de micro-organismos em processos biotecnológicos

Os micro-organismos são essenciais para o meio ambiente, pois desempenham funções únicas que são cruciais na manutenção de ecossistemas como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos (PELCZAR, CHAN, KRIEG, 1996). E apesar de serem de grande importância na manutenção da biosfera, poucos ainda são os que foram caracterizados e descritos na literatura sendo menos de 10 % de toda microbiota do planeta (BURKE et al., 2011).

O conhecimento da biodiversidade e bioprospecção de novos microrganismos acabam sendo um dos principais focos da era biotecnológica, além de seu isolamento e seleção que os conferem o desenvolvimento de novos produtos (OLIVEIRA, SETTE, FANTINATTI-GARBOGGINI, 2006). O crescimento de forma acelerada da utilização destes organismos na busca de soluções nas áreas de alimento, saúde, meio ambiente e indústria é um contraste no cenário mundial, visto que a extraordinária atividade dos microrganismos se baseia em sua notável diversidade metabólica e adaptabilidade genética (BURKE et al., 2011), tornando-os uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento sustentável.

Nas diversas atividades de importância sócio-econômica se vêem vários exemplos que atestam a utilização de recursos microbianos pelo homem como na área industrial onde os micro-organismos são empregados na produção de compostos comerciais ou na transformação de substratos de alto valor agregado; na agropecuária onde são utilizados como fixadores de nitrogênio e os empregados no controle biológico de pragas e vetores.

Na indústria de alimentos os micro-organismos são empregados para produção de bebidas, fabricação de pães, queijos, ácidos orgânicos, enzimas, dentre outros; enquanto que na área ambiental as perspectivas de recuperação do meio ambiente através da biorremediação são bastante promissoras (SCHAECHTER, INGRAHAM, NEIDHARDT,

2010). Nesta grande esfera, os micro-organismos apresentam considerável interesse biológico, visto que suas biomoléculas constituem modelos interessantes para aplicação em bioprocessos tanto quanto para ser otimizadas na tentativa de obter melhores resultados (BENNETT, 1998). Exemplos da aplicação de diferentes micro-organismos na área biotecnológica podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1: Micro-organismos envolvidos em processos biotecnológicos.

Micro-organismos	Processos biotecnológicos	Referências bibliográficas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Lactobacillus fermentum</i>	Fermentação alcoólica na fabricação de álcool	Ostrowski et al. (2006); Bringhenti et al. (2007); Ribeiro Filho et al. (2008) Souza; Mutton 2004
<i>Acetobacter aceti orleanensis</i> ; <i>A. aceti xilinum</i> ; <i>A. aceti liquefaciens</i> ; <i>A. xyloinoide</i> ; <i>A. orleanense</i> ; <i>A. acetigenum</i> ; <i>A. schuetzenbachii</i> ; <i>A. curvum</i> ; <i>A. rances</i> ; <i>A. pasteurianus levanensis</i> ;	Fermentação alcoólica na fabricação de vinho e vinagre	Sachs (2001)
<i>S. cerevisiae</i> ; <i>S. uvarum</i>	Produção de glicerol	Gutierrez (1991)
<i>Lactobacillus casei</i> ; <i>L. acidophilus</i> ; <i>L. plantarum</i> ; <i>L. fermentum</i> ; <i>L. reuteri</i>	Produção de iogurtes	Ouwehand et al. (2002)
<i>Streptococcus</i> β-hemolítico do grupo C <i>A. niger</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>S. fragilis</i>	Estreptoquinase, utilizado na lise de coágulos sanguíneos Pectinases, em suco de frutas Celulose Invertase Lactase	Tortora et al. (2010)
<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> ,	Degradação de moléculas químicas contidas em	Behki & Khan (1986); Behki et al. (1993);

<i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Nocardia sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>	defensivos agrícolas	Levanon (1993)
---	----------------------	----------------

Com várias aplicações biotecnológicas, os micro-organismos têm sido amplamente úteis para a humanidade, mesmo antes de sua existência, o que representam uma tecnologia promissora na área biotecnológica.

4. PARTE EXPERIMENTAL

As linhagens fúngicas utilizadas neste trabalho se encontravam preservadas nas coleções de trabalho dos laboratórios de Química de Microrganismo (UFAM) e Genética da Escola Superior de Ciências da Saúde (UEA). Apenas para caracterizá-las, descreve-se a seguir de forma resumida a obtenção, purificação e conservação das linhagens.

4.1 Coleta do Material Biológico

O material biológico foi coletado nos municípios de Manaus, Barcelos (a 405 km de Manaus, as margens do Rio Negro), Presidente Figueiredo (a 107 Km de Manaus) e Maués (Município do Médio Amazonas, banhado pelas águas do Rio Maués-Açu). No local da coleta os fragmentos de plantas e basidiomicetos foram acondicionados em sacos plásticos esterilizados sob refrigeração em caixas de isopor. Paralelamente foram coletados materiais vegetais e basidiomicetos para posteriores identificações e documentação (excicatas) nos herbários do INPA, da Universidade Federal do Amazonas e/ou da Universidade do Estado do Amazonas.

4.2 Esterilização do material biológico e isolamento dos fungos endofíticos e basidiomicetos

O material biológico coletado foi lavado com detergente líquido e água corrente. Em seguida, dentro do fluxo laminar, o material foi esterilizado superficialmente com álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 3-5% por 2-4 minutos, álcool 70% por 30 segundos e água destilada esterilizada, a fim de eliminar os micro-organismos presentes na superfície do material (SOUZA et al, 2004). Em seguida foram cortados em pequenos pedaços de aproximadamente 4 mm x 4 mm em matrizes de 3 x 3 ou 2 x 2 e inoculados, em triplicata, em placas de petri contendo meios de cultura sólidos (BDA, ISP2 e Aveia),

suplementados com antibióticos (tetraciclina e ampicilina 100 µg/mL) para inibição do crescimento de bactérias e actinomicetos ou com cetoconazol e tetraciclina (20 µg/mL e 100 µg/mL respectivamente) para inibição do crescimento de fungos e bactérias Gram negativas. Uma alíquota de 50 µL da água destilada utilizada no final do processo de assepsia superficial foi espalhada com alça de vidro para controle do processo de assepsia.

As placas foram incubadas em gradiente de temperaturas aumentadas periodicamente de 18, 26 e 40 °C. Os isolados foram coletados individualmente a medida que surgiam dos fragmentos inoculados e repicados nos mesmos meios de cultura empregados no isolamento com o objetivo de purificá-los.

4.3 Purificação, Conservação e Identificação

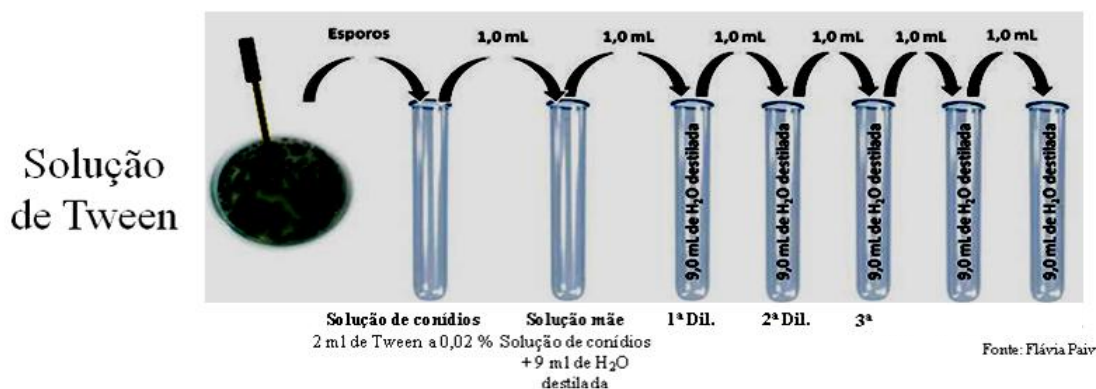
Para os fungos que mesmo após os repiques ainda permaneciam em misturas, a purificação final foi realizada de duas formas:

1. Fungos mitospóricos: A purificação desses fungos foi realizada pela Técnica de Tween (Azevedo e Costa, 1973) ou diluição seriada que consiste na imersão de uma pequena quantidade de conídios em tubo de ensaio contendo 2 mL da solução de tween 80% previamente autoclavada, agitação em vortex, transferência de 1 mL para outro tubo contendo 9 mL de H₂O destilada autoclavada e cinco diluições sucessivas (Figura 9) em tubos de ensaio contendo 9 ml de H₂O destilada autoclavada. Das três últimas diluições (10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}) foram recolhidos 50 µL e inoculados, em triplicata, em placas contendo meio de cultura apropriado para cada fungo. Ao observar o crescimento do fungo de um único esporo, este foi transferido para novas placas contendo meio de cultura apropriado para o seu crescimento.

2. Fungos não mitospóricos e basidiomicetos: foram purificados por repiques sucessivos em três pontos em placas de petri contendo meio de cultura apropriado para cada fungo (Figura 10).

Após a purificação, os micro-organismos foram identificados pela análise das estruturas macro e microscópicas: hifas, micélio e estruturas de reprodução (sexual e assexual) e comparação com literatura específica à taxonomia de cada grupo (KIFFER & MORELET, 1997).

Figura 9: Representação esquemática de diluição seriada a partir da solução de Tween.

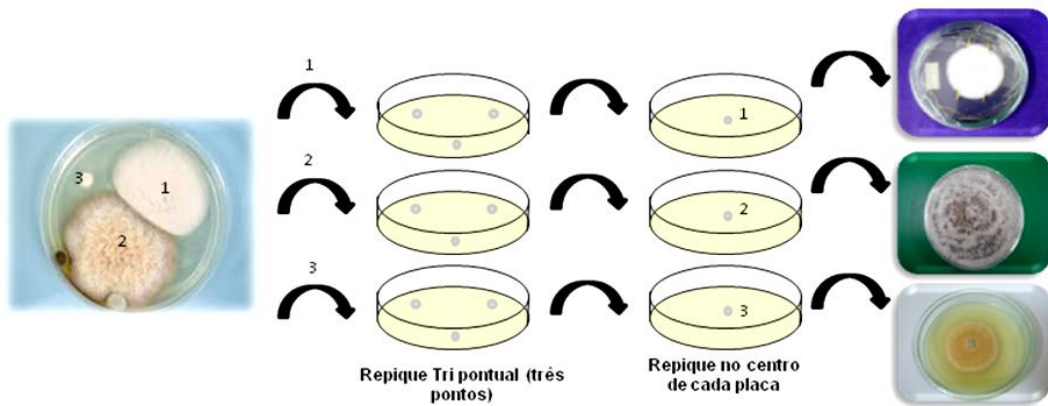


Fonte: Flávia Paiva, 2011 (modificada).

Os fungos endofíticos purificados foram conservados em óleo mineral, água com glicerol a 20% e água destilada para os isolados contendo conídios (CASTELLANI, 1939).

Os fungos basidiomicetos foram conservados em palitos de dente esterilizados em autoclave colocados sobre o meio contendo o inóculo. Este tipo de conservação é realizado com intuito de não perder a atividade enzimática (comunicação pessoal Lopez, J.M. – curso Brasil-Espanha, realizado em Manaus/AM, 2009).

Figura 10: Representação esquemática da purificação por sucessivos repiques.



Fonte: Adriana da Silva.

4.4 Fermentação em estado sólido (FES) de resíduos agrícolas regionais

Para estimular a produção de celulasas e xilanase, utilizou-se o processo de fermentação em estado sólido (FES). Foram selecionadas aleatoriamente 10 linhagens de fungos ainda não identificados: 5 fungos endofíticos do gênero *Penicillium* e 5 basidiomicetos (Tabela 2). Para a FES, foram selecionados os seguintes resíduos agrícolas:

Substratos	Código	Nome Científico
1. Casca de cupuaçu <i>in natura</i>	(C. Cup)	<i>Theobroma grandiflorum</i>
2. Semente de cupuaçu <i>in natura</i>	(Cç.. Cup)	
3. Casca de maracujá <i>in natura</i>	(C. Maj.)	<i>Passiflora edulis</i>
4. Semente de maracujá <i>in natura</i>	(Sem. Maj.)	
5. Casca de macaxeira <i>in natura</i>	(C. Max.)	<i>Manihot esculenta</i>
6. Casca de urucum <i>in natura</i>	(C. Uru.)	<i>Bixa orellana</i>
7. Casca de guaraná <i>in natura</i>	(C. Gua.)	<i>Paullinia cupana</i>
8. Casca de coco <i>in natura</i>	(C. Coc.)	<i>Cocos nucifera</i>
9. Bagaço de cana de açúcar <i>in natura</i>	(B. Cana)	<i>Saccharum officinarum</i>
10. Resíduo de pau rosa	(R. Pau Rosa)	<i>Aniba rosaeodora</i>

Os resíduos de casca de cupuaçu e semente de cupuaçu foram coletados em sítio localizado na BR AM 010 à 146 km de Manaus, a casca de urucum coletados no Campus da Universidade Federal do Amazonas, casca de guaraná e torta de pau rosa foram coletados no município de Maués e casca de maracujá, caroço de maracujá, casca de coco, casca de macaxeira e bagaço de cana de açúcar foram resíduos adquiridos comercialmente no município de Manaus.

Cada fungo foi fermentado em erlenmeyers contendo 5 g de substrato sólido *in natura*, triturados e previamente autoclavado a 121 °C, por 15 minutos. Para os *Penicillium* spp., o inóculo se deu com a adição de 20 µl de suspensão de conídios na concentração 10⁷ esporos/ml (equivalente a solução-padrão 3 da escala de McFarland) e para os basidiomicetos com a adição de 5 fragmentos, de 5 mm de diâmetro de ágar contendo as hifas. Os micro-organismos foram cultivados em triplicata por oito dias a 28° C (Figura 11). Após três dias (72 h) e oito dias (192 h) foram registrados os crescimentos miceliares por fotografia.

Outras seis linhagens, sendo cinco *Aspergillus niger* e um *Colletotrichum*, descritas na tabela 2 foram utilizadas na fermentação submersa (FS) descrita no item 4.8.

Tabela 2: Identificação das linhagens fúngicas isoladas da floresta Amazônica.

Sequ.	Linhagens	Planta hospedeira ou local de isolamento (Código de Laboratório)	Número de depósito
1	Bas. 1	Basidiomyceto coletado no município de Maués (Bas 3 M 1.1.1)	22 LG – ESA-UEA
2	Bas. 2	Basidiomyceto coletado no município de Presidente Figueiredo (B05 1.1)	01 LG-ESA-UEA
3	Bas. 3	Basidiomyceto coletado no Campus da UFAM no município de Manaus (B01)	13 LG-ESAUEA
4	Bas. 4	Basidiomyceto coletado no município de Presidente Figueiredo (B05 3.1)	03 LG – ESA-UEA
5	Bas. 5	Basidiomyceto coletado no município de Presidente Figueiredo (B05 1.3)	02 LG – ESA-UEA
6	<i>A. niger</i> 1	Flor de <i>Peperonia pellucida</i> (EjFlor 3)	308

7	<i>A. niger</i> 2	Isolado de planta marinha não identificada em Salinas (PA)	458
8	<i>A. niger</i> 3	F40 a	461
9	<i>A. niger</i> 4	F52	462
10	<i>A. niger</i> 5	F73	459
11	Pen. 1	Cortex do caule de <i>Strychnos</i> cf. <i>toxifera</i> (Stsp C1-2/1-1 ^a)	183
12	Pen. 2	Cortex do caule de <i>Strychnos</i> cf. <i>toxifera</i> (Stsp C2-3/1-2C)	180
13	Pen. 3	Cortex da raiz de <i>Maurithia flexuosa</i> (PB R2 2.2)	135
14	Pen. 4	Cortex da raiz de <i>Strychnos</i> cf. <i>toxifera</i> (Stsp R2 1.1)	233
15	Pen. 5	Casca do galho de <i>Rollinea</i> sp. (Ansp cG3 1.2c)	44
16	<i>Colletotrichom</i>	Folha de <i>Palicourea longiflora</i> . (Mg F40 1.1a)	12

Figura 11: Fermentação em estado sólido em diferentes substratos.



4.5 Obtenção do extrato enzimático dos micro-organismos sem FES

Após oito dias de cultivo dos micro-organismos em FES foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada aos frascos e agitados por 1 minuto em vortex, seguindo-se filtração a vácuo com filtros millipore de 0,22 μm (Figura 12). Os líquidos filtrados foram

acondicionados em microtubos de 2 mL e congelados para posteriores ensaios qualitativos, quantitativos e análise dos açúcares livres.



Figura 12: Sistema de filtração a vácuo com filtros de millipore de 0,22 μm .

4.5.1 Avaliação do resgate das enzimas

Para avaliar o rendimento das enzimas foram selecionados aleatoriamente, após oito dias de cultivo, os meios fermentados *in natura* em Sem. Maj. e C. Uru. Este procedimento foi realizado semelhante ao item 4.5, porém em triplicata sendo que foram adicionados apenas 5 mL de água destilada na segunda e terceira filtração. Após todo esse processo os líquidos filtrados foram acondicionados em microtubos de 2 mL e congelados para posteriores ensaios qualitativos de celulasas pela técnica de difusão em ágar – *cup plate*.

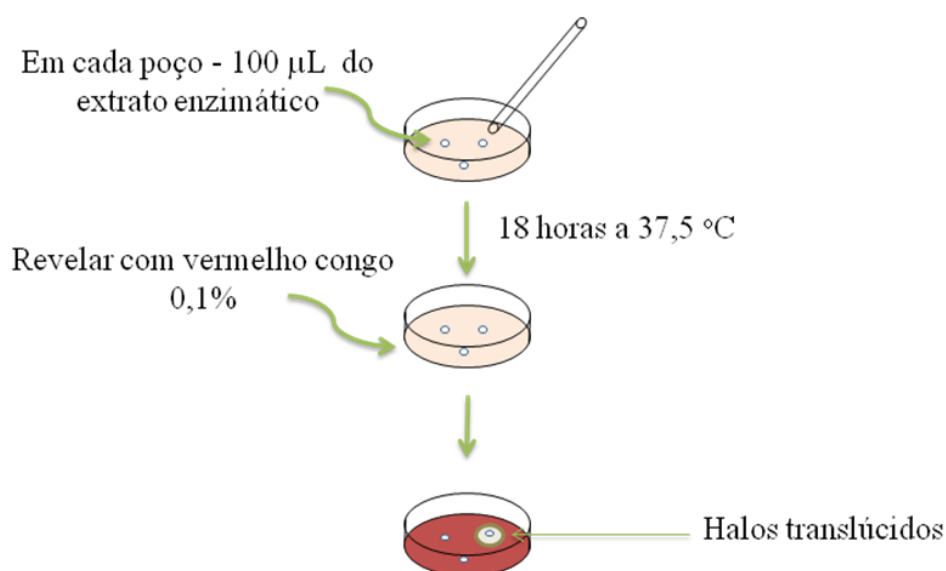
4.6 Detecção de celulasas pela técnica de difusão em ágar

A avaliação qualitativa das celulasas foi realizada em meio contendo uma mistura de 9,0 g de ágar, 5,0 g de CMC (carboximetilcelulose) e 500 mL de tampão acetato de sódio 200 mM e pH 5,0. Depois de esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121 °C, ainda semi-aquecido, o meio foi distribuído em placas de petri até o nível de

aproximadamente 7 mm, e depois de solidificados foram perfurados com tubo de vidro oco esterilizado com 5 mm de diâmetro. Nos poços feitos (*cup plate*), foram inoculados 100 μ L de cada extrato enzimático (Figura 13). Após 18 horas de incubação a 37,5 °C, as placas foram coradas com vermelho congo 0,1%.

As reações enzimáticas positivas foram identificadas pela formação de um halo translúcido ao redor de cada *cup plate*. A atividade enzimática foi registrada pelo diâmetro do halo em centímetros, que foram medidos com régua pelo verso da placa de petri (Teixeira, 1994). O restante do extrato enzimático foi conservado em geladeira.

Figura 13: Esquema dos ensaio qualitativo de celulase realizado pela técnica de difusão em ágar.



Fonte: Adriana da Silva.

4.7 Análises quantitativas de celulasas e xilanase

Os extratos enzimáticos conservados das culturas foram avaliados quanto a produção de CMCase, β -glicosidase, FPase e xilanase. As atividades enzimáticas foram avaliadas conforme descrição a seguir.

4.7.1 Análises quantitativas de CMCase

A dosagem da atividade da endoglucanase carboximetilcelulase (CMCase) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por GHOSE (1987), e consistiu na adição de 50 µL do extrato enzimático, em microtubo de 2 mL contendo 450 µL do substrato CMC a 1% em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. A mistura foi incubada por 10 minutos a 50 °C. Após a incubação os açúcares redutores foram determinados segundo método descrito por MILLER (1959), o qual consistiu na adição de 500 µL do reagente ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS), aquecimento por cinco minutos em banho fervente, resfriamento por cinco minutos em banho de gelo, adição de 4 mL de água destilada e leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. A curva padrão que correlaciona valores de absorvância com a quantidade de produto formado foi obtida utilizando-se soluções de glicose.

Para cada amostra analisada preparou-se um controle com 450 µL do mesmo substrato (CMC), 500 µL do reagente (DNS) e 50 µL do extrato enzimático, respectivamente, o qual foi mantido por cinco minutos em banho fervente. Em seguida, adicionou-se 4 mL de água destilada e fez-se a leitura em espectrofotômetro também a 540 nm. O controle foi preparado para evitar uma super estimativa da atividade enzimática, devido a grupos redutores no extrato enzimático entre outros.

4.7.2 Análises quantitativas de β-glicosidase

Para a determinação da atividade de β-glicosidase, 1000 µL de extrato enzimático foram incubados com 1000 µL de solução de celobiose (Sigma, EUA) por 30 min. a 50 °C. Transcorrido o tempo reacional, os tubos foram imediatamente aquecidos a 100 °C por 5 minutos de forma a promover a inativação das enzimas. Em seguida, foram adicionados 1000 µL de reagente enzimático para dosagem de glicose (Kit enzimático Laborlab, Brasil)

e os tubos foram novamente incubados, desta vez a 37 °C por 10 min. Finalmente, as soluções tiveram suas absorvâncias a 530 nm registradas. Cada análise foi realizada em triplicata. A curva padrão que correlaciona valores de absorvância com a quantidade de produto formado foi obtida utilizando-se soluções de glicose.

4.7.3 Análises quantitativas de FPase

Para a quantificação da atividade de FPase, foram incubados em termociclador utilizando placa de PCR, a 50 °C por 60 min, 20 µL de extrato enzimático com 1 círculo de papel de filtro Whatman nº 1 de 0,02 cm de diâmetro e 40 µL de tampão citrato de sódio, pH 4,8. Para cada amostra, preparou-se um controle de enzima incubando-se 20 µL de extrato enzimático com 40 µL de tampão citrato de sódio, pH 4,8, a 50 °C por 60 min. Também preparou-se um controle do substrato incubando 60 µL de tampão citrato de sódio pH 4,8 com 1 círculo de papel de filtro Whatman nº1 de 0,02 cm e um branco contendo apenas 60 µL de tampão citrato de sódio pH 4,8 a 50 °C por 60 minutos. Transcorrido o tempo reacional, adicionou-se 120 µL de reagente de DNS e manteve-se em termociclador a 100 °C por 15 min. Em seguida, foram transferidos 20 µL da amostra para placa de Elisa contendo 180 µL de água Milliq. Por fim, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 540 nm. Cada análise foi realizada em quadruplicata.

4.7.4 Análises quantitativas de Xilanase

A atividade de xilanase foi realizada incubando-se, em microtubos (2 mL), 50 µL de extrato enzimático com 450 µL de solução de 1% Xilano (spelts, Sigma) em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 5,0 por 10 minutos a 50 °C. Em seguida, foram adicionados 500 µL de solução de DNS (MILLER, 1959) de forma a parar a reação enzimática, os tubos foram incubados por 10 minutos a 100 °C. Após o banho fervente, as amostras foram

resfriadas em banho de gelo e por fim adicionados 4,0 mL de água destilada. Para cada amostra analisada foi preparado um branco com 450 µL do mesmo substrato, 500 µL da solução de DNS e 50 µL do extrato enzimático, respectivamente e posteriormente mantido por 10 minutos em banho fervente. Em seguida, adicionaram-se 4 mL de água destilada. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 540 nm. Cada análise foi realizada em triplicata (exceto o branco). Para atividade de xilanase, uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de xilose por minuto nas condições de ensaio utilizando a curva padrão de xilose.

4. 8 Fermentação submersa (FS) utilizando palha de trigo como indutor

Este procedimento foi realizado com o objetivo de observar o comportamento dos micro-organismos ensaiados na produção de celulases e xilanases na presença de palha de trigo (PT), um substrato rico em celulose e hemicelulose. O experimento foi realizado no Laboratório de Bioquímica da Universidade de São Paulo, no Instituto de Física de São Carlos (IFSC).

Para este experimento, foram selecionados os 10 fungos utilizados na FES, cinco *A. niger* endofíticos e um *Colletotrichum* endofítico (como out group). A fermentação procedeu-se da seguinte maneira: em erlenmeyers de 500 mL foram adicionados 100 mL da solução de Manachini (MANACHINI et al., 1987) acrescido de 5% de palha de trigo como indutor previamente lavado por 3 dias e seco a 60°C, ajustando-se o pH final para 5,0 e autoclavados. Para os *Penicillium* spp. e *A. niger* a fermentação ocorreu com adição de 20 µL da suspensão de conídios na concentração de 10^7 esporos/mL nos respectivos erlenmeyers autoclavados e para os basidiomicetos e o *Colletotrichum* com adição de 5 fragmentos (5 mm de diâmetro) de ágar contendo as hifas. Os micro-organismos foram fermentados em triplicata por 5 dias, a temperatura de 28 °C a 200 rpm (Figura 14). A cada

24 h foi retirada uma alíquota de 5 mL e centrifugada a 9000 rpm por 10 minutos para obtenção do extrato enzimático. Os ensaios quantitativos ocorreram conforme descrito no item 4.7.

SOLUÇÃO DE MANACHINI

KH_2PO_4	2,0 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,9 g
Extrato de levedura.....	1,0 g
Água destilada	1000 mL

Figura 14: Cultivo das dezesseis linhagens fúngicas Amazônicas por fermentação submersa utilizando palha de trigo como indutor.



4.9 Curva de produção das enzimas celulolíticas e xilanolítica

Após a avaliação dos resultados quantitativos obtidos pela FS (item 4.8), foi selecionado um fungo com melhor desempenho nas produções enzimáticas e dois substratos utilizados na FES como boas fontes de carbono. Para a curva de produção das enzimas envolvidas, o microrganismo selecionado foi submetido a nova fermentação submersa como segue: foram adicionados 100 mL da solução de Manachini (MANACHINI et al, 1987) em erlenmeyeres de 250 mL acrescidos com 5 g do substrato selecionado, aferindo-se o pH final para 5.0. Os erlenmeyeres foram autoclavados, inoculados com 20 μ L da suspensão de esporos da melhor linhagem e mantidos em Shaker por 5 dias a 30 °C e sob agitação de 150 rpm, sendo que para cada dia foram preparados uma triplicata. A partir do segundo dia foi retirado uma triplicata, cada erlenmeyer foi filtrado a vácuo com filtros millipore de 0,22 μ m e o extrato enzimático recolhido em tubos Falcon de 45 mL. Uma porção de cada réplica foi separada para avaliação da curva de produção enzimática (CMCase, β -glicosidase e xilanase), utilizando-se os mesmos procedimentos descritos no item 4.7.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do crescimento das linhagens fúngicas nos diferentes substratos cultivados em FES

Linhagens de *Penicillium* spp. – Decorridas 72 h de cultivo após a fermentação em estado sólido (FES) dos dez substratos pelas 5 linhagens fúngicas, verificou-se o bom crescimento dos Pen. 1, Pen. 4 e Pen. 5 em C. Maj. e C. Max e dos Pen. 2 e Pen. 3 em Sem.Cup. Após 192 h de cultivo todas as linhagens de *Penicillium* spp. apresentaram bom crescimento nos substratos. Também foram bons substratos para estas linhagens o Sem.Cup e Sem. Maj, principalmente após 192 h (Tabela 3). Por outro lado, analisando a taxa de crescimento após 192 h de cultivo para cada fungo, percebeu-se que o Pen. 5 foi o de melhor desempenho, obtendo bom crescimento em pelo menos 6 substratos, C. maj., C. Max., C. Uru., C. Guar., Sem. Cup. e Sem. Maj. seguido-se os Pen. 3 e Pen. 2 com bom crescimento em 5 substratos como observado na tabela 3.

Os resultados observados para os *Penicillium* spp. demonstraram que o tempo de 192 h de cultivo foi o suficiente para o crescimento e infiltração das hifas nos substratos visto que a biomassa era a única fonte de carbono.

Tabela 3: Avaliação da taxa de crescimento observado para as cinco espécies de *Penicillium* sp. em diferentes substratos.

Substratos in	Linhagens / Crescimento												
	Pen 1		Pen 2		Pen 3		Pen 4		Pen 5		Cont.		
	72 h	192 h	72 h	192 h	72 h	192 h	72 h	192 h	72 h	192 h	72 h	192 h	
<i>natura</i>													
B. Cana	-	++	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
C. maj.	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	
C. Max.	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	
C. Cup.	-	-	+	+++	-	-	-	-	-	+	-	-	

C. Uru.	+	++	+	++	+	++	+	+++	+	+++	-	-
Sem.Cup.	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	++	+++	-	-
Sem. Maj.	++	+++	++	+++	+	+++	+++	+++	++	+++	-	-
C. Coc.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. Guar.	+	++	+	++	++	+++	+	++	+	+++	-	-
R. Pau Rosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Níveis de crescimento: - (não apresentou crescimento); + (baixo crescimento); ++ (médio crescimento); +++ (bom crescimento).

Basidiomicetos – Para os basidiomicetos, os níveis de crescimento se mostraram inferiores quando comparados com os níveis de crescimento observados para os *Penicillium* spp. (Tabela 4), mas foi possível observar que quatro basidiomicetos obtiveram bom crescimento após 192 h de cultivo utilizando a C. Max. como substrato. Verificou-se também que dos 5 basidiomicetos testados apenas o Bas. 1 obteve bom crescimento para quatro diferentes substratos sendo C. Maj., C. Max., C. Gua e Sem.Cup. Todavia, o Bas. 5 foi o único fungo que conseguiu crescer em R. Pau Rosa detectando-se um baixo crescimento em 72 h e médio crescimento em 192 h de cultivo.

Os resultados observados demonstraram que, com exceção da C. Max., os substratos avaliados não foram boas fontes de carbono para o crescimento dos basidiomicetos nas condições experimentais aplicadas.

Tabela 4: Avaliação da taxa de crescimento para os 5 basidiomicetos nos diferentes substratos.

Substratos <i>in natura</i>	Linhagens / Crescimento												
	Bas 1		Bas 2		Bas 3		Bas 4		Bas 5		Cont.		
	72 h	192 h	72 h	192 h	72 h	192 h	72 h	192 h	72 h	192 h	72 h	192 h	
B. Cana	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. maj.	+	+++	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
C. Max.	+	+++	-	+++	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
C. Cup.	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-
C. Uru.	+	++	-	-	-	-	+	+++	-	-	-	-	-

Sem.Cup.	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sem. Maj.	-	+	-	-	++	+++	-	-	-	++	-	-
C. Coc.	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
C. Guar.	+	+++	+	++	-	-	-	+	-	-	-	-
R. Pau Rosa	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-

Níveis de crescimento: - (não apresentou crescimento); + (baixo crescimento); ++ (médio crescimento); +++ (bom crescimento)

5.2 Avaliação da produção e do procedimento de extração de celulases através das análises por difusão em ágar

Através do procedimento descrito no item 4.5.1, foi possível observar para as linhagens e meios selecionados (figuras 15 e 16) que as atividades das enzimas da primeira extração e das outras duas consecutivas foram semelhantes. Os halos translúcidos que se formaram ao redor dos *cup plates* mostraram-se com o mesmo tamanho de diâmetro para as três extrações de uma mesma amostra. Isto pode significar que o processo de extração utilizado não foi eficiente o bastante ou é um reflexo das limitações deste método utilizado. Em todo o caso esse ensaio indica que pode haver perda do rendimento se for realizada apenas uma extração pelo procedimento empregado.

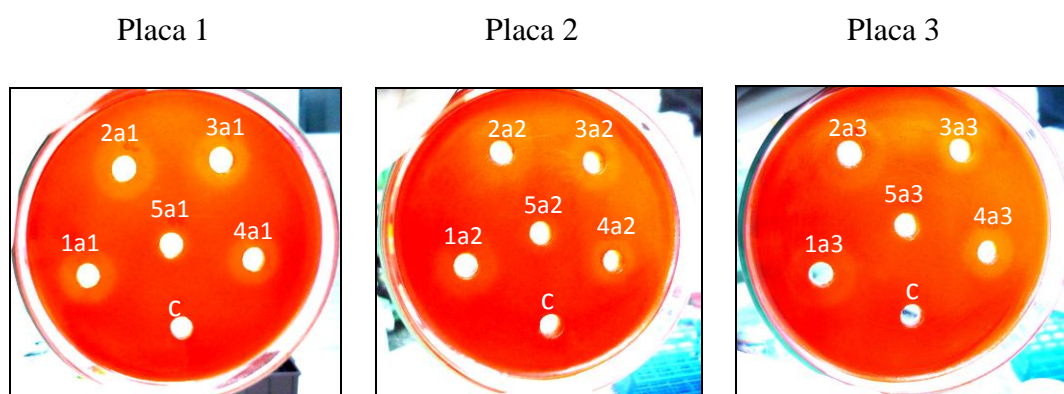


Figura 15: Ensaio comparativos dos extratos enzimáticos obtidos pela FES utilizando Sem. Maj. como substrato. Placa 1: Ensaio qualitativo da primeira extração (1a1 = Pen. 1; 2a1 = Pen. 2; 3a1 = Pen. 3; 4a1 = Pen. 4; 5a1 = Pen. 5 e C = controle); Placa 2: Ensaio qualitativo da segunda extração (1a2 = Pen. 1; 2a2 = Pen. 2; 3a2 = Pen. 3; 4a2 = Pen. 4; 5a2 = Pen. 5); Placa 3: Ensaio qualitativo da terceira extração (1a3 = Pen. 1; 2a3 = Pen. 2; 3a3 = Pen. 3; 4a3 = Pen. 4 e 5a3 = Pen. 5)

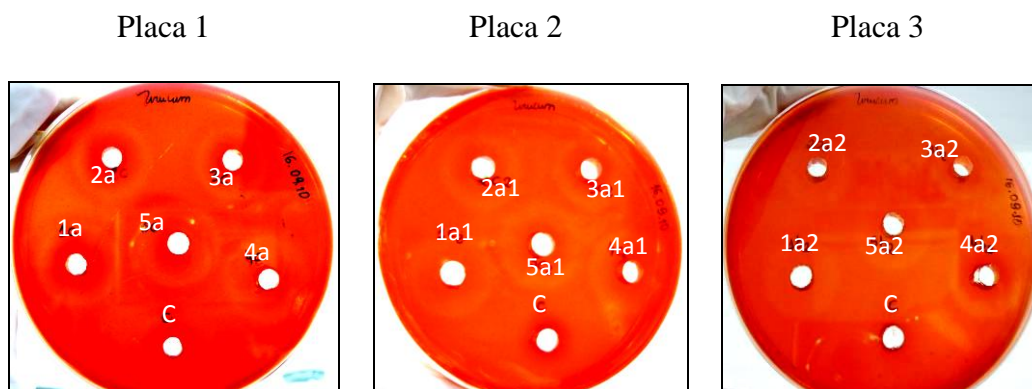


Figura 16: Ensaios comparativos dos extratos enzimáticos obtidos pela FES utilizando *C. Uru.* como substrato. Placa 1: Ensaio qualitativo da primeira extração (1a1 = Pen. 1; 2a1 = Pen. 2; 3a1 = Pen. 3; 4a1 = Pen. 4; 5a1 = Pen. 5 e C = controle); Placa 2: Ensaio qualitativo da segunda extração (1a2 = Pen. 1; 2a2 = Pen. 2; 3a2 = Pen. 3; 4a2 = Pen. 4; 5a2 = Pen. 5); Placa 3: Ensaio qualitativo da terceira extração (extração (1a3 = Pen. 1; 2a3 = Pen. 2; 3a3 = Pen. 3; 4a3 = Pen. 4 e 5a3 = Pen. 5)

5.3 Avaliação qualitativa da produção de celulase

Após o período de incubação das placas de Petri nos ensaios de avaliação dos extratos das linhagens estudadas em diferentes substratos e depois de coradas com vermelho congo (item 4.6), foi possível observar a formação de halos translúcidos ao redor dos *cup plates* para a maioria das linhagens de *Penicillium* spp. testadas e para alguns basidiomicetos (Tabela 5). Deve-se considerar que esses resultados não indicam que os demais basidiomicetos testados não produzam celulases, pois a observação de halo depende de vários fatores além do material que compõe o meio de cultura a ser utilizado no método. Por outro lado, segundo NEIROTTI E AZEVEDO (1988) as substâncias químicas presentes no meio de cultura podem levar a resultados falso-positivos, pois elas podem interferir no corante, além de inibir as ligações destes com os polissacarídeos ou até mesmo levar o corante à sua precipitação.

Os maiores valores observados foram para o Pen. 2 com os diâmetros dos halos de: 3,50 cm para C. Max, 3,30 cm para C. Cup. e C.Maj. e 3,00 cm para B.Cana. Diâmetros de halos acima de 2,0 cm foram observados para o Pen. 5 quando cultivado em C. Maj., C.

Max. e B. Cana., para o Pen. 3 quando cultivado em C. Max. e C. Gua. e para os Pen. 1, 2 e 4 quando cultivados em C. Gua. Este método foi utilizado por ser rápido e de fácil verificação quanto à produção de celulases, embora precise ser confirmado por outras metodologias devido às limitações discutidas no parágrafo precedente.

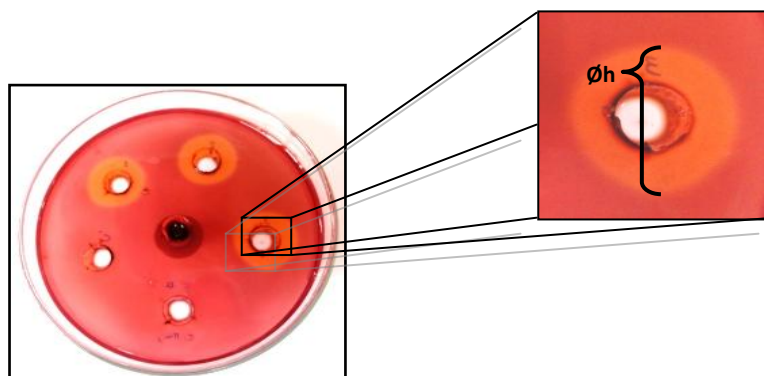
Tabela 5: Produção de celulase pelas linhagens de *Penicillium* spp. e Basidiomicetos cultivados em dez diferentes substratos.

Substratos	¹ Med	Pen 1	Pen 2	Pen 3	Pen 4	Pen 5	Bas 1	Bas 2	Bas 3	Bas 4	Bas 5
C. Cup.	Øh	-	3,30	-	-	-	-	-	-	-	-
Sem.Cup	Øh	1,41	1,48	1,60	-	1,78	1,03	-	-	-	-
C. Maj.	Øh	1,80	3,30	1,90	1,60	2,50	0,70	-	-	-	-
Sem. Maj.	Øh	1,82	1,90	1,51	1,90	1,04	0,78	-	2,07	-	1,52
C. Max.	Øh	1,30	3,50	2,20	1,70	2,30	-	1,00	0,80	-	1,10
C. Uru.	Øh	1,28	1,69	1,23	1,07	0,69	0,82	-	-	0,88	-
C. Coc.	Øh	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. Gua.	Øh	2,17	2,35	2,25	2,15	1,80	1,62	1,30	-	0,79	-
R. Pau rosa	Øh	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,10
B. Cana	Øh	-	3,00	-	-	2,30	-	-	-	-	-

¹Medição: Øh = Diâmetro do halo (cm), (-) não houve formação de halos nas condições testadas.

A zona mais clara observada ao redor dos *cup plates* (Figura 17) em forma de halos translúcidos corresponde à ação enzimática da celulase, ou seja, a quebra do CMC pela presença das enzimas celulases, pois não houve a coloração com o vermelho congo o qual se liga apenas a fibras de celulose e não a produtos formados pela quebra do CMC (WOOD, 1988).

Figura 17: Placa com meio CMC revelada com vermelho congo 0,1%. O halo translúcido ($\emptyset h$) indica a ação enzimática celulase.



5.4 Análises quantitativas de celulases (CMCase, β -glicosidase e FPase) e xilanase em diferentes resíduos agrícolas

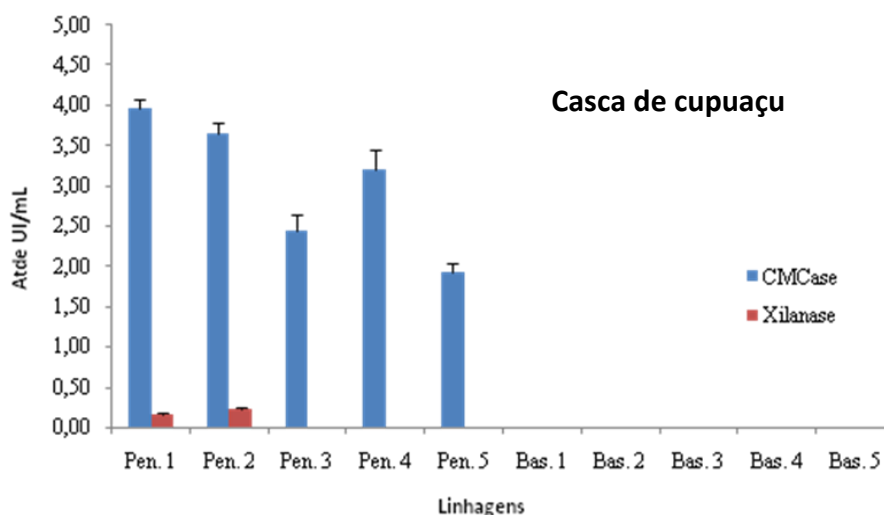
5.4.1 Casca e semente de cupuaçu

Após 192 h de cultivo, foi possível avaliar a atividade enzimática de CMCase e xilanase dos diferentes fungos em C. Cup. (Figura 18) e Sem. Cup. (Figura 19).

Pelas produtividades de CMCase observadas em casca e semente de cupuaçu, foi possível verificar que ambos os substratos levaram a produção de CMCase pelas linhagens de *Penicillium* spp. avaliadas, obtendo resultados de 2,0 e 1,5 UI/mL em C. Cup. e Sem. Cup., respectivamente. Em trabalhos futuros esses resultados podem ser melhorados pela modificação racional dos parâmetros cinéticos como pH e temperatura, da concentração de substrato, entre outros. As maiores produções de CMCase em ambos substratos foram observadas para o Pen. 1 com 3,958 e 6,562 UI/mL e para o Pen. 2 com 3,646 e 3,055 UI/mL em C. Cup. e Sem. Cup., respectivamente. Vale destacar que os melhores resultados observados nos ensaios qualitativos anteriores foram para Pen. 2 em C. Cup. e para Pen. 3 e Pen. 5. em Sem. Cup. Não houve registro de atividade CMCase para os

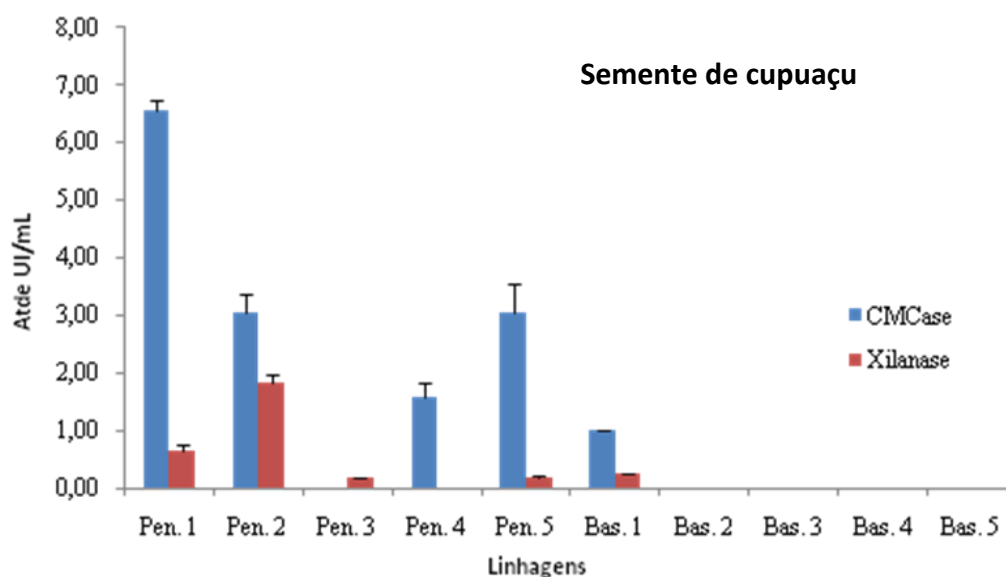
basidiomicetos em C. Cup., porém verificou-se uma baixa atividade enzimática para o Bas. 1 em Sem. Cup. com valor igual a 1,005 UI/mL. A atividade xilanásica em geral para os meios e fungos avaliados foi menor que a atividade CMCásica, mas valores acima de 0,15 UI/mL foram observados em C. Cup e acima de 0,50 UI/mL em Sem. Cup para os Pen. 1 e Pen. 2. A maior produção dessa enzima foi apresentada pelo Pen. 2 com 1,824 UI/mL em Sem. Cup.

Figura 18: Atividades de CMCase e xilanase das linhagens fúngicas avaliadas em casca de cupuaçu.



A produção das enzimas β -glicosidase e FPase em geral não foi elevada. Os valores mais significativos de β -glicosidase foram obtidos para os quatro primeiros *Penicillium* spp. em C. Cup (Figura 20) e para os dois primeiros *Penicillium* spp. em Sem. Cup. (Figura 21). A produção de β -glicosidase foi maior em Sem. Cup. com atividade igual a 0,013 UI/mL para Pen. 1.

Figura 19: Atividades de CMCase e xilanase das linhagens fúngicas avaliadas em semente de cupuaçu.



Dentre os 5 basidiomicetos avaliados, apenas para o Bas. 1 foi observada produção de β -glicosidase, com 0,004 UI/mL em Sem. Cup., porém este valor é desprezível quando comparado com os valores observados para os *Penicillium* spp. Atividades de FPase foram verificadas somente para Pen. 1 com valores que atingiram 0,014 e 0,019 UI/mL para C. Cup e Sem. Cup., respectivamente (Figura 21).

Pelos resultados observados para ambos os substratos utilizados, foi constatado que a C. Cup. apresentou-se como o melhor substrato na produção das celulases CMCase e β -glicosidase, e a Sem. Cup. como o melhor substrato para xilanase.

Figura 20: Atividades de β -glicosidase e FPase das linhagens fúngicas avaliadas em casca de cupuaçu.

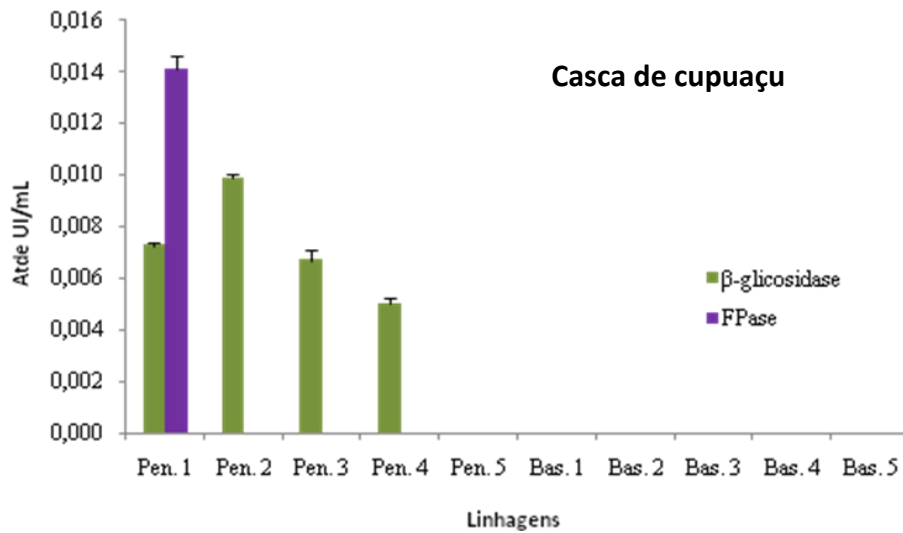
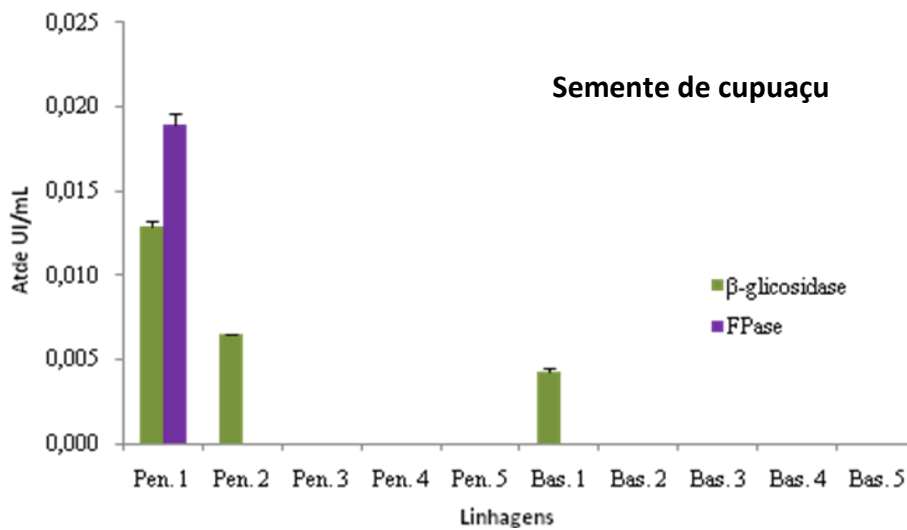


Figura 21: Atividades de β -glicosidase e FPase das linhagens fúngicas avaliadas em semente de cupuaçu.



5.4.2 Casca e semente de maracujá

As figuras 22 e 23 apresentam as atividades em casca e semente de maracujá (C. Maj. e Sem. Maj.). Dos 5 *Penicillium* spp. avaliados, pelo menos quatro foram eficientes na produção das enzimas CMCase e xilanase, com destaque para o Pen. 2 o qual obteve a maior atividade CMCásica de 13,444 UI/mL, seguido do Pen. 3 com 7,061 UI/mL, ambos

em C. Maj. O resultado apresentado pelo Pen. 2 confere com o resultado obtido no ensaio qualitativo em que foi observado para a mesma linhagem o maior diâmetro de halo em C. Maj. No entanto, o mesmo não foi observado para o Pen. 3, visto que este foi o terceiro a obter o maior halo observado em C. maj. (Tabela 5). As atividades enzimáticas de CMCase em Sem. Maj. foram menores que em C. Maj., com resultados que variaram entre 1,2 e 2,5 UI/mL para os *Penicillium* spp. Com relação aos basidiomicetos, percebeu-se que três deles foram capazes de produzir em Sem. Maj não somente celulases, mas também xilanase.

De acordo com os resultados observados, foi possível verificar as maiores produções das enzimas celulolíticas em casca de maracujá quando comparados com os resultados observados na semente, resultados estes que conferem com a literatura onde confirma grande quantidade de carboidratos nas cascas. Segundo Oliveira et al. (2002) as cascas são constituídas basicamente por carboidratos (8,23 %), proteínas (1,07 %) e pectinas, o que possibilita o aproveitamento das mesmas para fabricação de doces.

Para a atividade de xilanase, as maiores produções foram conferidas em Sem. Maj. quando comparadas com os resultados observados na casca. Todas as linhagens de *Penicillium* spp., bem como os mesmos basidiomicetos que apresentaram atividade CMCásica, apresentaram os melhores resultados para xilanase.

A maior produção enzimática em Sem. Maj. foi observada para o Pen. 1 com 1,663 UI/mL e a menor para o Pen. 2 com 0,247 UI/mL. Valores de atividade enzimática na ordem de 0,50 UI/mL foram observados para Pen. 2 e Pen. 5 quando cultivados em C. Maj.

Figura 22: Atividades de CMCase e xilanase das linhagens fúngicas avaliadas em casca de maracujá.

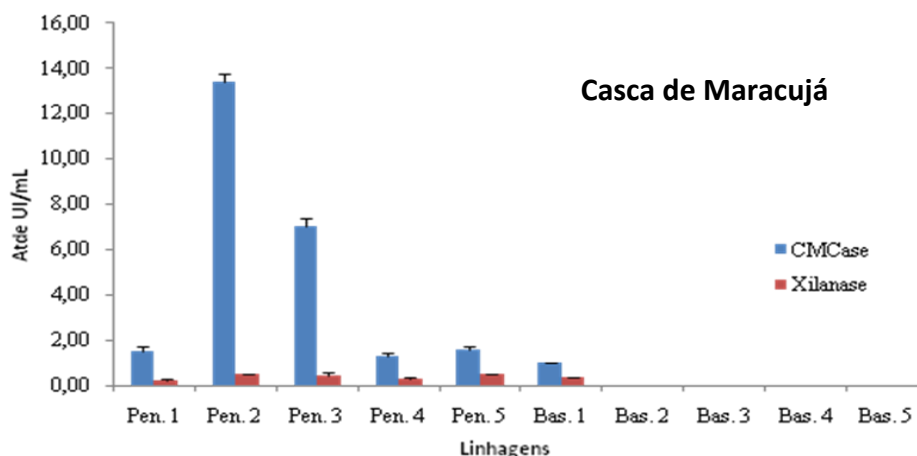
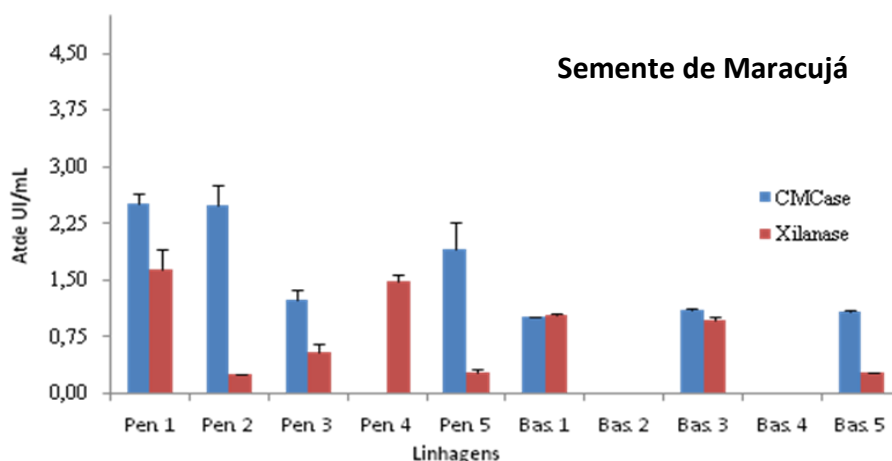


Figura 23: Atividades de CMCase e xilanase das linhagens fúngicas avaliadas em semente de maracujá.



As atividades de β -glicosidase e FPase (Figs. 24 e 25) constatadas em casca de maracujá foram tão baixas quanto as observadas em casca e semente de cupuaçu, com valores entre 0,004 a 0,020 UI/mL para ambas as enzimas. Em Sem. Maj., as atividades expressas ficaram abaixo de 0,008 UI/mL. Comparativamente, a semente de maracujá é um melhor substrato para a produção de CMCase, β -glicosidase e xilanase e a casca de maracujá para produção FPásica.

Figura 24: Atividades de β -glicosidase e FPase das linhagens fúngicas avaliadas em casca de maracujá.

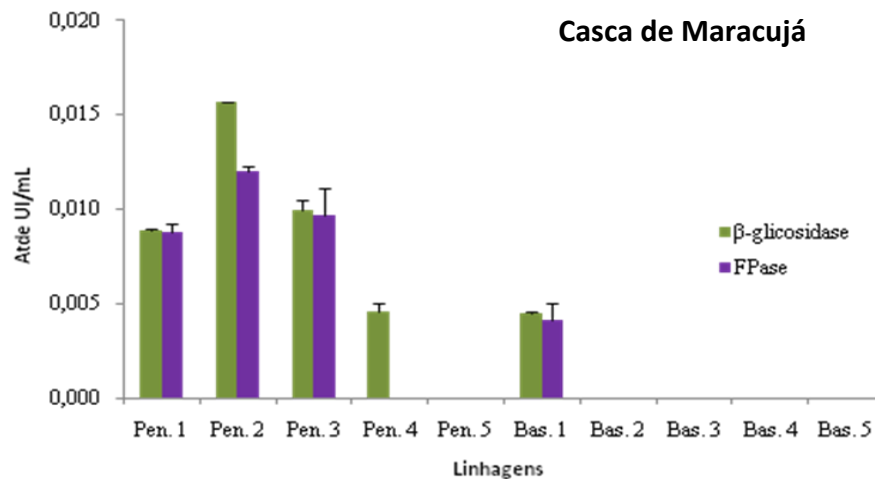
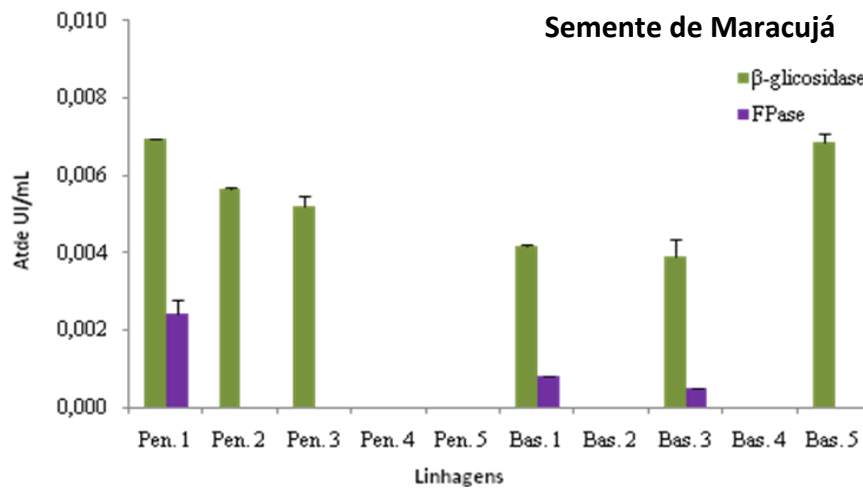


Figura 25: Atividades de β -glicosidase e FPase das linhagens fúngicas avaliadas em semente de maracujá.



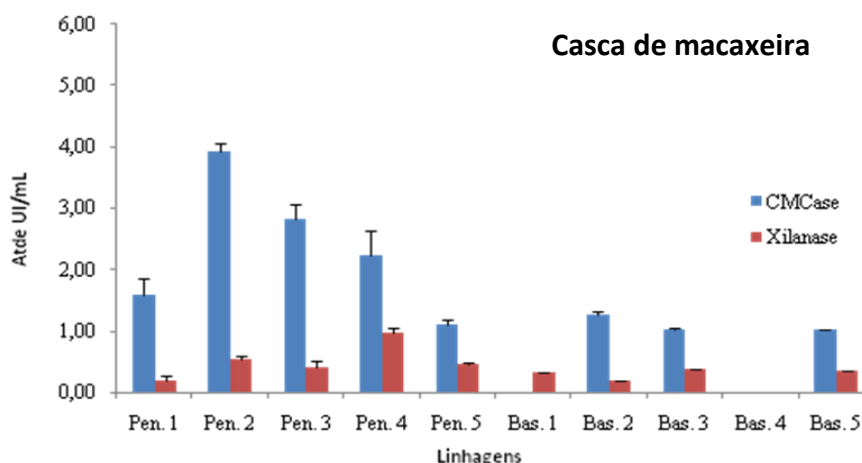
5.4.3 Casca de macaxeira

A Figura 26 mostra a produção de CMCase e xilanase pelos dez fungos avaliados. A produção enzimática de CMCase estabelecida após 192 h de fermentação em estado sólido foi relevante para todas as linhagens de *Penicillium* spp. e para três basidiomicetos. Pen. 2 e Pen. 3 expressaram as maiores atividades com 3,924 UI/mL e 2,825 UI/mL, respectivamente, resultados coerentes com os apresentados pelos ensaios qualitativos, em

que ambos apresentaram excelentes atividades, tendo o Pen. 2 apresentado o maior halo (Tabela 5).

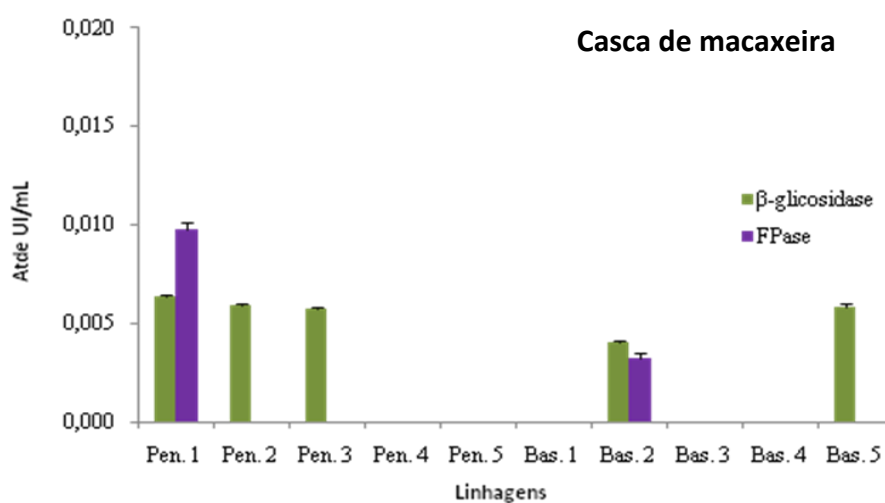
Em contraste, foram verificadas baixas atividades de xilanase pelas linhagens ensaiadas em C. Max., com resultados bem menos significativos que na produção de CMCCase, porém relevantes quando comparados com as atividades observadas anteriormente para os demais substratos. A maior atividade de xilanase foi observada para o Pen. 4 com 0,966 UI/mL.

Figura 26: Atividades de CMCCase e xilanase das linhagens fúngicas avaliadas em casca de macaxeira.



De acordo com a figura 27 foi possível verificar alguma atividade de β -glicosidase em três linhagens do gênero *Penicillium* e dois basidiomicetos. A atividade enzimática se mostrou linear para as três linhagens de *Penicillium* spp. com valores próximos a 0,006 UI/mL. Das dez linhagens avaliadas quanto a produção de FPase, apenas duas mensuraram atividade enzimática. Pen. 1 e Bas. 2 registraram produção de 0,010 e 0,003 UI/mL, respectivamente. Com os resultados acima descritos foi possível inferir que a C. Max. é um melhor substrato para CMCCase e xilanase que para β -glicosidase e FPase.

Figura 27: Atividades de β -glicosidase e FPase das linhagens fúngicas avaliadas em casca de macaxeira.

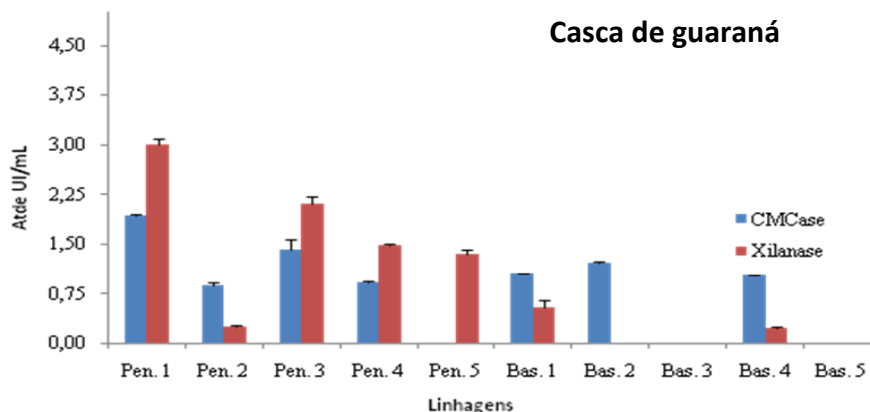


5.4.4 Casca de guaraná

As atividades de CMCase e xilanase produzidas pela biodegradação da C. Gua. estão apresentadas na figura 28. Houve produção enzimática de CMCase em no mínimo sete linhagens avaliadas, quatro de *Pencillium* spp. e três de basidiomicetos. O Pen. 1 apresentou a maior produção com atividade igual a 1,935 UI/mL, embora esta linhagem tenha sido a terceira no teste qualitativo de difusão em ágar (Tabela 5). As atividades CMCásicas das demais linhagens foram da ordem de 1,4 a 0,8 UI/mL. Sete linhagens também conseguiram produzir xilanase, com resultados mais elevados aos de CMCCase para quatro dessas linhagens.

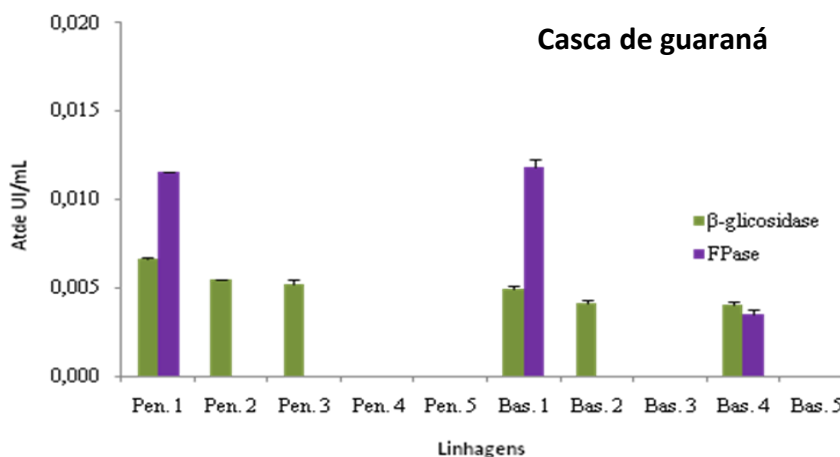
A mesma linhagem com maior produção CMCásica (Pen. 1) também obteve a maior produção xilanásica com atividade igual a 3,013 UI/mL. As demais apresentaram atividades que variaram entre 2,109 e 0,237 UI/mL.

Figura 28: Atividades de CMCase e xilanase das linhagens fúngicas avaliadas em casca de guaraná.



Quanto à atividade de β -glicosidase, seis linhagens expressaram produção enzimática nesse substrato (Figura 29): três *Penicillium* spp. e três basidiomicetos. Todas obtiveram atividade celulolítica de 0,004 a 0,006 UI/mL.

Figura 29: Atividades de β -glicosidase e FPase das linhagens fúngicas avaliadas em casca de guaraná.



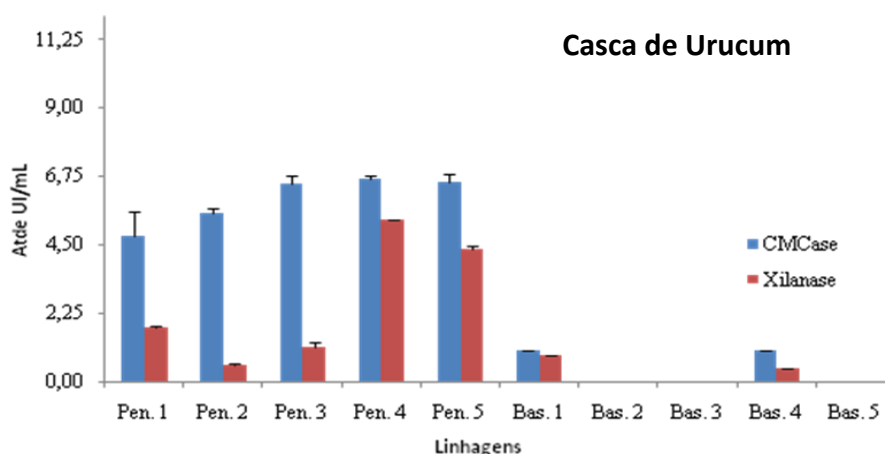
Dentre as seis linhagens, três conseguiram expressar atividade FPásica: a Pen. 1 e dois basidiomicetos. A atividade FPásica observada foi na ordem de 0,011 para o Bas. 1 e

o Pen. 1. e de 0,003 para o Bas. 4. Para a maioria das linhagens cultivadas os resultados revelaram que a casca de guaraná é um substrato mais acessível e de maior rendimento para a produção de CMCase e xilanase que para β -glicosidase e FPase.

5.4.5 Casca de urucum

As atividades de CMCase e xilanase foram expressas pela maioria das linhagens avaliadas, com exceção dos Bas. 1, 3 e 5 (Figura 30). A produção de CMCase foi melhor para as 5 linhagens de *Penicillium* spp., com atividades entre 4,773 e 6,685 UI/mL. A maior atividade foi expressa pelo Pen. 4, o qual no entanto foi a segunda linhagem nos ensaios de difusão em ágar. Essa mesma linhagem de *Penicillium* sp. (Pen. 4) também apresentou a maior atividade xilanásica, com 5,302 UI/mL, seguida do Pen. 5 com 4,352 UI/mL. Os demais *Penicillium* spp. apresentaram atividades entre 1,768 e 0,543 UI/mL.

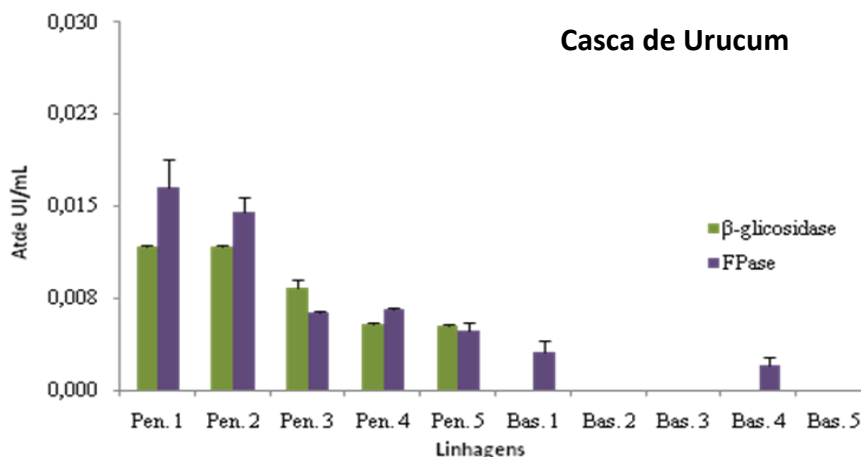
Figura 30: Atividades de CMCase e xilanase das linhagens fúngicas avaliadas em casca de urucum.



Atividades de β -glicosidase e FPase abaixo de 0,02 UI/mL foram observadas para os 5 *Penicillium* spp. (Figura 31). A maior produção de FPase foi expressa para o Pen. 1 com atividade igual a 0,017 UI/mL enquanto que a menor produção foi observada para o

Bas. 4. Apesar das baixas atividades de β -glicosidase e FPase, este substrato foi a única fonte de carbono que levou a produção das três celulases pelas 5 linhagens de *Penicillium* spp. avaliadas, assim destacando-se como boa fonte de carbono para a otimização da produção celulolítica por este gênero de fungos.

Figura 31: Atividades de β -glicosidase e FPase das linhagens fúngicas avaliadas em casca de urucum.



5.4.6 Bagaço de cana de açúcar

Sabendo que o bagaço da cana de açúcar contém cerca de 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina (PANDEY et al., 2000) e que pode ser utilizado na produção de enzimas de alto valor agregado (VALASKOVÁ E BALDRIAN, 2006), este também foi utilizado para avaliar a produção de celulases e xilanase pelas linhagens selecionadas. Pelos ensaios quantitativos percebeu-se atividade CMCásica somente para linhagens de *Penicillium* spp., e apenas um destes *Penicillium* sp. produziu xilanase (Figura 32).

A maior produção CMCásica foi registrada para o Pen. 2 com atividade igual a 4,793 UI/mL. Esta mesma linhagem apresentou o maior halo nos ensaios qualitativos (Tabela 5). A produção das celulases β -glicosidase e FPase foi observada apenas para o Pen. 1 com atividades de 0,006 e 0,002 UI/mL, respectivamente (Figura 33).

Pelos resultados é possível inferir que a baixa produção de xilanase pode estar relacionada ao baixo percentual de hemicelulose neste substrato, pois a sua composição chega a metade da composição de celulose apresentada em resíduos de bagaço de cana, logo pela grande quantidade de celulose existente neste substrato houve maior degradação da celulose no espaço de tempo de cultivo para esse ensaio, espaço de tempo que pode não ter sido o suficiente para observar a produção de xilanase.

5.3.7 Resíduo de pau rosa

Apesar de não existir relatos sobre a produção de celulasas e xilanasas pela degradação de resíduos de pau rosa, o ensaio quantitativo revelou a produção de CMCase por uma linhagem avaliada. O Bas. 5 foi o único fungo a produzir essa enzima com atividade igual a 1,029 UI/mL. Não houve produção de xilanase, β -glicosidase e FPase pelas demais linhagens avaliadas.

Figura 32: Atividades de CMCase e xilanase das linhagens fúngicas avaliadas em bagaço de cana de açúcar.

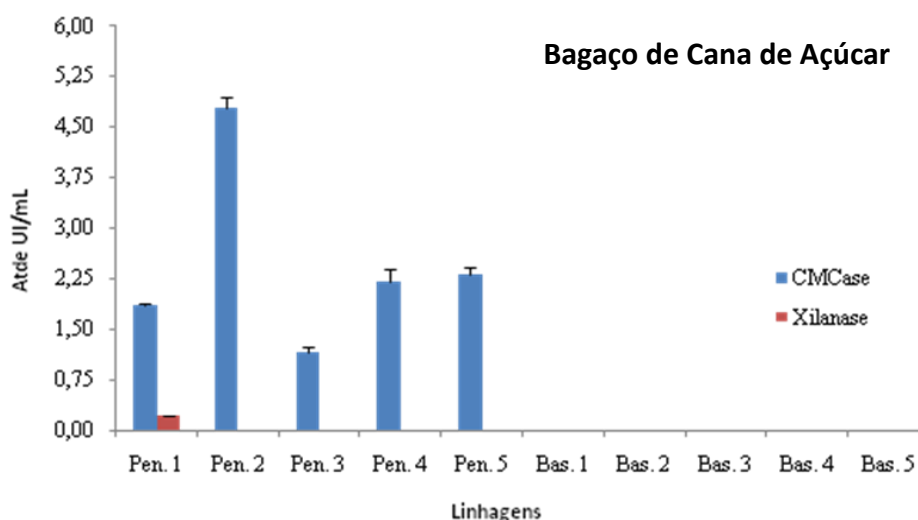
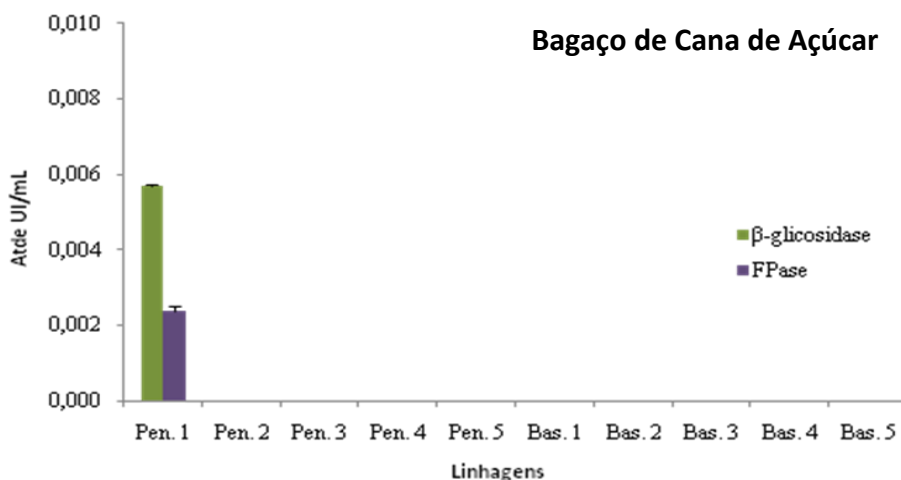


Figura 33: Atividades de β -glicosidase e FPase das linhagens fúngicas avaliadas em bagaço de cana de açúcar.



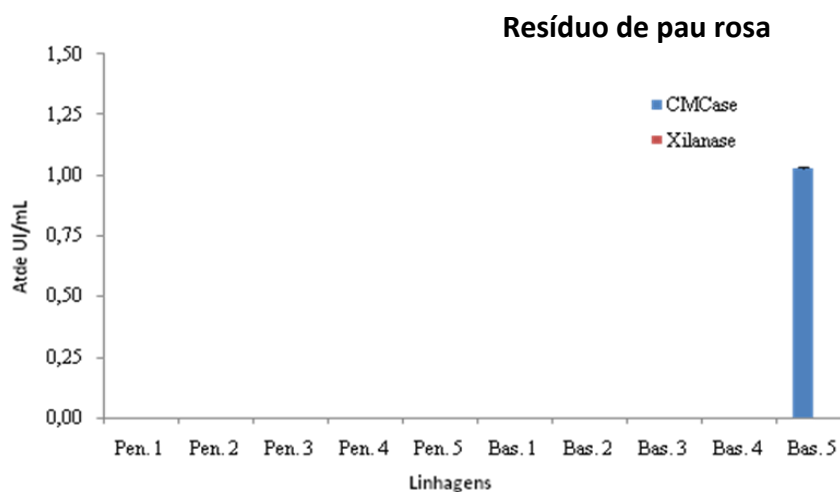
Sabe-se que o pau rosa é muito utilizado nas indústrias de perfumaria por produzir óleo essencial distinto, composto de aproximadamente 87% de linalol na madeira. Este terpeno pode ser um dos principais responsáveis pela resistência destas árvores em campo, contudo monoculturas para extração do óleo essencial tem sofrido com a ação de fungos e insetos xilófagos. A extração do óleo gera no mínimo 80% ou mais de resíduos que são de difícil degradação, pois são oriundos do lenho, principal produtor dos óleos essenciais.

A detecção de CMCase pelo basidiomiceto 5 é bastante coerente, uma vez que o mesmo também apresentou um médio crescimento neste substrato (Tabela 4) e uma produção qualitativa para celulase de $\varnothing h = 1,10$ cm no teste de difusão em ágar. É possível que a produção enzimática em resíduo de pau rosa dependa, além da otimização de parâmetros como temperatura, umidade e pH, da eliminação completa de seus componentes voláteis. Por outro lado, a seleção de novos basidiomicetos pode ser a solução para a produção enzimática neste substrato.

Um outro elemento que pode também justificar o não crescimento das outras linhagens fúngicas é a composição deste resíduo, que *in natura* é uma madeira compacta

com massa específica aparente de 0,70 a 0,80 g/cm³ a 15% de umidade (CARVALHO, 1994). Essa alta densidade pode ser resultado de uma alta concentração de lignina e os basidiomicetos são bons produtores de lignases o que corrobora com a hipótese que os outros fungos avaliados não eram bons produtores de lignases e por esse motivo não cresceram.

Figura 34: Atividades de CMCase e xilanase das linhagens fúngicas avaliadas em resíduo de pau rosa.



5.4.8 Casca de coco

Alguns relatos quanto à produção de celulases e xilanase foram descritos utilizando casca de coco como substrato. COELHO et al. (2001) investigaram a produção de várias enzimas e obtiveram resultados de produção máxima na faixa de 24 a 96 horas, o que correspondeu ao tempo de produção industrial corrente.

Neste trabalho não ocorreu produção enzimática utilizando casca de coco como substrato. Um dos fatores que pode ser responsável pela falta de produção enzimática é a alta umidade que contém na casca de coco, que mesmo apesar de favorecer o crescimento deles neste caso dificultou a oxigenação do meio e conseqüentemente o crescimento do

microrganismo. Algumas formas de favorecer o crescimento dos micro-organismos são a realização de uma pré-secagem do substrato ou até mesmo a utilização simultânea de outro substrato como, por exemplo, o farelo de trigo, pois em contato com esse tipo de resíduo ocorrerá à diminuição de umidade das fibras de coco e com isso melhorar a oxigenação do meio.

5.5 Comparação da produção de celulases e xilanase pelas linhagens avaliadas nos diferentes substratos

5.5.1 Atividade celulolítica CMCase

Após 192 h de cultivo foi possível avaliar a atividade enzimática de CMCase dos diferentes fungos em quase todos os substratos testados (Tabela 6 e Figura 35), com exceção da casca de coco em que não houve produção enzimática e do R. Pau Rosa com apenas um fungo produtor de CMCase. Comparando-se os diferentes substratos, percebeu-se que a C. Max. foi o substrato que levou a maior quantidade de fungos à produção da enzima CMCase alcançando valores de atividade enzimática entre 1,026 a 3,924 UI/mL, seguidos dos substratos C. Maj., C. Guar. e C. Uru.

Analisando a produção de CMCase de todas as linhagens avaliadas nos diferentes substratos foi detectado o Pen 02 como o melhor produtor dessa enzima alcançando atividade igual a 13,444 UI/mL em C. Maj. Esta atividade foi quase o dobro da atividade apresentada pelo segundo melhor produtor dessa enzima com 7,061 UI/mL registrado para o Pen. 3 quando fermentado no mesmo substrato (C. Maj.).

Quanto à curva de produção enzimática das 16 linhagens em FS com palha de trigo (item 4.8), observou-se que as 5 linhagens de *A. niger* obtiveram os maiores resultados (Tabela 7 e Figura 36), sendo estes registrados no 5º dia de cultivo. A maior atividade

CMCásica foi verificada pelo *A. niger* 4 com resultado igual a 22,237 UI/mL, seguido do *A. niger* 3 com 22,211 UI/ mL. A curva de produção enzimática observada para os *A. niger* se mostrou crescente durante todo o tempo de cultivo, com exceção do *A. niger* 1 onde houve um decréscimo no 4° dia.

As linhagens do gênero *Penicillium* tiveram resultados acima de 2,50 UI/mL no 3° dia de cultivo, sendo 2,659 UI/mL para o Pen. 3; 2,777 UI/mL para o Pen. 5 e 3,023 UI/mL para o Pen. 4. O Pen. 1 demonstrou uma atividade de 5,388 UI/mL no 2° dia de cultivo, o melhor resultado de atividade de CMC_{case} quando comparados com os demais *Penicillium* spp. para este ensaio. A Curva de produção enzimática apresentada por estes fungos manteve-se crescente até o 3° dia, com exceção do Pen. 1 que apresentou um decréscimo no 3° e 4° dia.

Vale ressaltar que dos dezesseis fungos utilizados na fermentação submersa com palha de trigo, dez foram testados no processo de fermentação em estado sólido utilizando resíduos agrícolas como substrato, sendo 5 fungos do gênero *Penicillium* e 5 basidiomicetos.

Tabela 6: Resultados das atividades enzimáticas de CMCase em UI/mL dos dez fungos fermentados em estado sólido em diferentes substratos.

Atividade enzimática CMCase (UI/mL)										
Linh. Subst.	Bas. 1	Bas. 2	Bas. 3	Bas. 4	Bas. 5	Pen. 1	Pen. 2	Pen. 3	Pen. 4	Pen. 5
C. Cup	-	-	-	-	-	3,958 ± 0,111	3,646 ± 0,150	2,441 ± 0,195	3,200 ± 0,260	1,938 ± 0,111
C. Maj.	1,004 ± 0,009	-	-	-	-	1,503 ± 0,213	13,444 ± 0,301	7,061 ± 0,311	1,325 ± 0,121	1,606 ± 0,134
C. Max.	-	1,282 ± 0,031	1,026 ± 0,017	-	1,032 ± 0,005	1,606 ± 0,256	3,924 ± 0,135	2,825 ± 0,240	2,236 ± 0,391	1,111 ± 0,076
B. Cana	-	-	-	-	-	1,861 ± 0,022	4,793 ± 0,152	1,154 ± 0,085	2,194 ± 0,193	2,313 ± 0,100
Sem. Maj.	1,003 ± 0,007	-	1,106 ± 0,013	-	1,086 ± 0,023	2,521 ± 0,122	2,488 ± 0,277	2,671 ± 0,139	-	1,913 ± 0,362
Sem. Cup.	1,005 ± 0,002	-	-	-	-	6,562 ± 0,187	3,055 ± 0,337	-	1,584 ± 0,259	3,043 ± 0,517
C. Coc.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. Guar.	1,055 ± 0,002	1,205 ± 0,037	-	1,038 ± 0,010	-	1,935 ± 0,030	0,888 ± 0,037	1,407 ± 0,167	0,927 ± 0,014	-
C. Uru.	1,002 ± 0,002	-	-	1,029 ± 0,018	-	4,773 ± 0,831	5,539 ± 0,139	4,254 ± 0,229	6,686 ± 0,113	6,563 ± 0,277
R. Pau Rosa	-	-	-	-	1,029 ± 0,005	-	-	-	-	-

(-) Não houve atividade enzimática de CMCase.

Tabela 7: Resultados das atividades enzimáticas de CMCase em UI/mL dos dezesseis fungos em fermentação submersa utilizando palha de trigo.

<i>T. de Cultivo</i>	1° Dia	2° Dia	3° Dia	4° Dia	5° Dia
<i>Linh.</i>					
<i>Bas. 1</i>	0,172 ± 0,002	0,172 ± 0,002	0,294 ± 0,043	0,190 ± 0,004	0,189 ± 0,003
<i>Bas. 2</i>	-	0,632 ± 0,005	0,412 ± 0,050	0,421 ± 0,001	0,404 ± 0,007
<i>Bas. 3</i>	0,127 ± 0,012	0,168 ± 0,005	0,301 ± 0,086	0,218 ± 0,018	0,154 ± 0,030
<i>Bas. 4</i>	0,123 ± 0,005	0,121 ± 0,002	0,171 ± 0,024	0,568 ± 0,050	3,414 ± 0,162
<i>Bas. 5</i>	-	0,558 ± 0,011	0,651 ± 0,013	0,641 ± 0,020	0,477 ± 0,007
<i>A.niger 01</i>	0,307 ± 0,000	1,121 ± 0,009	5,474 ± 0,417	3,698 ± 0,404	22,207 ± 1,049
<i>A.niger 02</i>	0,173 ± 0,019	1,187 ± 0,109	6,733 ± 0,544	18,551 ± 0,194	21,742 ± 0,130
<i>A.niger 03</i>	0,183 ± 0,004	1,042 ± 0,059	3,069 ± 0,047	16,026 ± 1,135	22,211 ± 0,300
<i>A.niger 04</i>	0,170 ± 0,008	1,803 ± 0,093	8,436 ± 0,330	19,885 ± 0,679	22,237 ± 0,149
<i>A.niger 05</i>	0,184 ± 0,008	2,349 ± 0,124	6,389 ± 0,558	15,196 ± 0,598	21,086 ± 0,347
<i>Pen. 1</i>	0,355 ± 0,006	5,388 ± 0,456	3,507 ± 0,048	2,024 ± 0,739	4,998 ± 0,258
<i>Pen. 2</i>	0,128 ± 0,004	0,469 ± 0,081	1,244 ± 0,059	0,973 ± 0,023	3,171 ± 0,179
<i>Pen. 3</i>	0,484 ± 0,013	2,349 ± 0,668	2,659 ± 0,268	1,781 ± 0,167	2,535 ± 0,151
<i>Pen. 4</i>	0,389 ± 0,006	1,512 ± 0,072	3,023 ± 0,313	1,217 ± 0,007	1,387 ± 0,019
<i>Pen. 5</i>	0,343 ± 0,008	2,673 ± 0,124	2,777 ± 0,178	1,397 ± 0,102	2,149 ± 0,139
<i>Colletotrichum</i>	0,146 ± 0,010	0,304 ± 0,009	2,396 ± 0,276	3,475 ± 0,346	3,849 ± 0,121
(-) Não houve atividade enzimática de CMCase.					

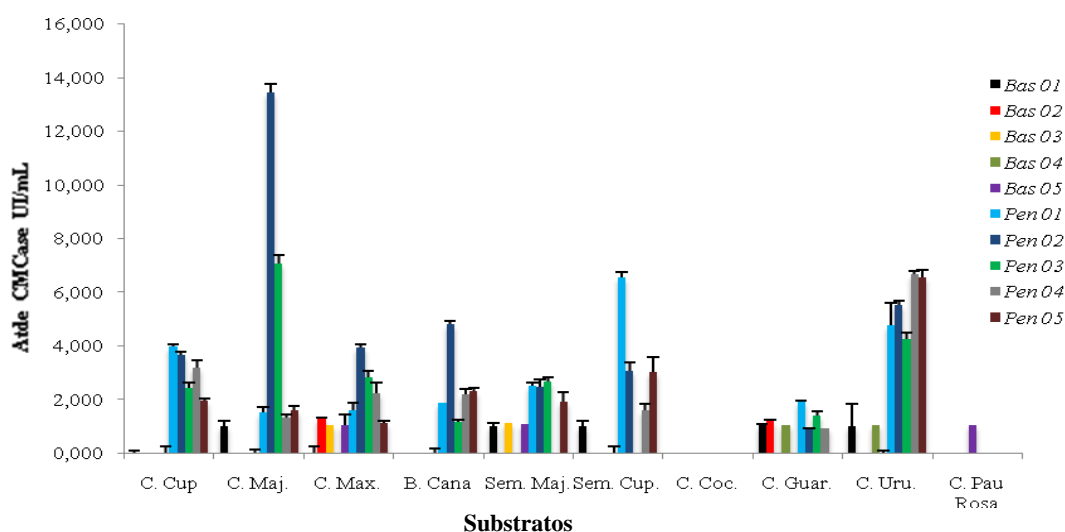


Figura 35: Produção de CMCase por dez fungos testados em FES utilizando diferentes substratos.

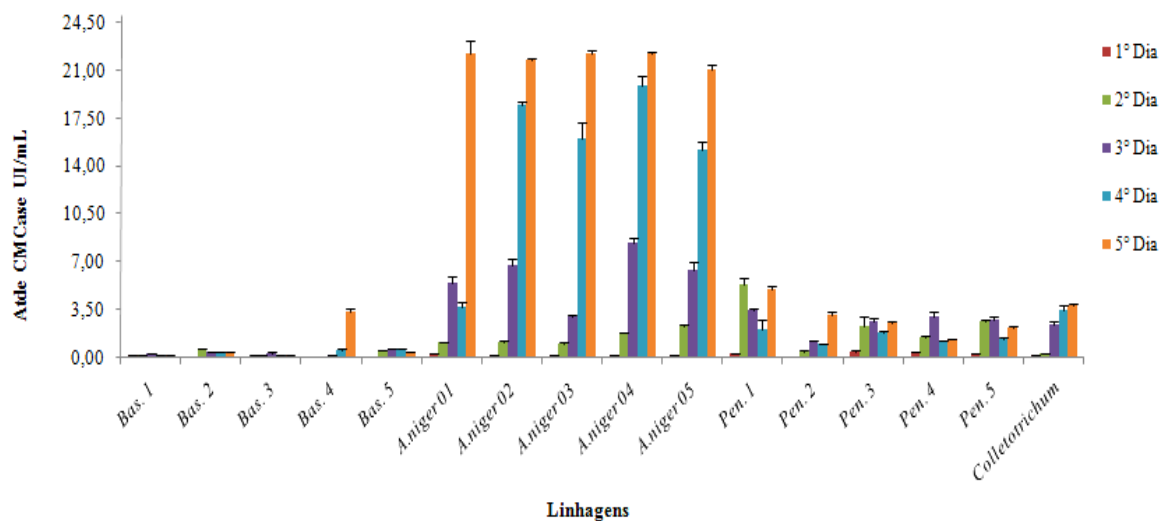


Figura 36: Produção de CMCase por dezesseis fungos testados em FS utilizando palha de trigo.

5.5.2 Atividade celulolítica β -glicosidase

A produção de β -glicosidase, uma celulase que hidrolisa a celobiose formando duas moléculas de glicose (MARTIN et al., 2006), foi expressa pela maioria das linhagens cultivadas pela FES nos dez diferentes substratos (Tabela 8). As maiores atividades foram apresentadas pelo Pen. 2 com em C. Maj. em Sem. Cup. (Figura 37). De todos os

substratos avaliados, apenas dois conseguiram induzir no mínimo 6 fungos que foi a Sem. Maj. e a C. Guar. Entretanto, o B.Cana induziu apenas um fungo para a produção da referida enzima.

Os resultados obtidos para alguns fungos cultivados em FS foram superiores a 0,050 UI/mL (Tabela 9), sendo *A. niger* e *Penicillium* spp. registrados com os maiores valores de β -glicosidase. As maiores atividades enzimáticas observadas foram de 0,341 UI/mL para o Pen. 2 no 5° dia de cultivo e 0,336 UI/mL para Pen. 5 no 4° dia de cultivo. As maiores atividades de β -glicosidase relatadas por basidiomicetos foram observadas pelo Bas. 3 com 0,083 UI/mL no 4° dia de cultivo e Bas. 4 com 0,072 UI/mL no 5° dia de cultivo.

Avaliando a curva de produção de β -glicosidase desses fungos (Figura 38), percebeu-se que ela permaneceu crescente para três diferentes *A. niger* e três diferentes *Penicillium* spp. A produção de β -glicosidase também foi verificado para o fungo controle *Colletotrichum* com atividade de 0,268 UI/mL no 5° dia de cultivo. Este fungo mostrou baixas atividades de CMCase, porém obteve valores de β -glicosidase mais elevados que os valores descritos pelos *Penicillium* spp.

Sabe-se que um dos fatores que afeta a produção da enzima é o meio de cultivo, por exemplo, meio de cultivo com pH elevado pode contribuir para o aumento da produção desta enzima. Experimentos futuros com estas linhagens devem considerar a otimização do pH, o que deve contribuir para melhores valores de atividades de β -glicosidase que os aqui observados.

Tabela 8: Resultados das atividades enzimáticas de β -glicosidase em UI/mL dos dez fungos fermentados em estado sólido em diferentes substratos.

Atividade enzimática β -Glicosidase										
Linh. Subst.	Bas 01	Bas 02	Bas 03	Bas 04	Bas 05	Pen 01	Pen 02	Pen 03	Pen 04	Pen 05
C. Cup	-	-	-	-	-	0,0073 \pm 0,0001	0,0099 \pm 0,0002	0,0067 \pm 0,0004	0,0050 \pm 0,0002	-
C. Maj.	0,0045 \pm 0,0001	-	-	-	-	0,0089 \pm 0,0001	0,0157 \pm 0,0001	0,0099 \pm 0,0006	0,0046 \pm 0,0005	-
C. Max.	-	0,0040 \pm 0,0001	-	-	0,0050 \pm 0,0002	0,0057 \pm 0,0001	0,0064 \pm 0,0001	0,0059 \pm 0,0001	-	-
B. Cana	-	-	-	-	-	-	0,0057 \pm 0,0001	-	-	-
Sem. Maj.	0,0042 \pm 0,0001	-	0,0039 \pm 0,0004	-	0,0047 \pm 0,0002	0,0069 \pm 0,0000	0,0057 \pm 0,0000	0,0052 \pm 0,0003	-	-
Sem. Cup.	-	-	-	-	-	0,0137 \pm 0,0003	0,0065 \pm 0,0001	-	-	0,0043 \pm 0,0002
C. Coc.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. Guar.	0,0049 \pm 0,0002	0,0042 \pm 0,0002	-	0,0041 \pm 0,0002	-	0,0066 \pm 0,0001	0,0054 \pm 0,0000	0,0052 \pm 0,0003	-	-
C. Uru.	-	-	-	-	-	0,0117 \pm 0,0001	0,0098 \pm 0,0001	0,0084 \pm 0,0007	0,0054 \pm 0,0001	0,0052 \pm 0,0002
C. Pau Rosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) Não houve atividade enzimática de β -Glicosidase.

Tabela 9: Resultados das atividades enzimáticas de β -glicosidase em UI/mL dos dezesseis fungos em fermentação submersa utilizando palha de trigo.

<i>T. de Cultivo Linh.</i>	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
<i>Bas. 1</i>	0,007 ± 0,001	0,007 ± 0,002	0,014 ± 0,004	0,012 ± 0,001	0,006 ± 0,001
<i>Bas. 2</i>	0,003 ± 0,003	-	0,006 ± 0,002	0,007 ± 0,001	0,001 ± 0,000
<i>Bas. 3</i>	0,021 ± 0,003	0,022 ± 0,006	0,024 ± 0,003	0,083 ± 0,001	0,004 ± 0,001
<i>Bas. 4</i>	0,001 ± 0,004	0,015 ± 0,002	0,004 ± 0,002	0,012 ± 0,001	0,072 ± 0,012
<i>Bas. 5</i>	0,002 ± 0,001	0,003 ± 0,001	0,002 ± 0,000	0,008 ± 0,002	0,004 ± 0,001
<i>A.niger 01</i>	0,001 ± 0,000	0,008 ± 0,001	0,009 ± 0,000	0,061 ± 0,007	0,265 ± 0,005
<i>A.niger 02</i>	0,019 ± 0,002	0,030 ± 0,003	0,029 ± 0,002	0,072 ± 0,010	0,326 ± 0,003
<i>A.niger 03</i>	0,006 ± 0,003	0,008 ± 0,003	0,017 ± 0,000	0,067 ± 0,009	0,330 ± 0,013
<i>A.niger 04</i>	0,029 ± 0,012	0,041 ± 0,002	0,031 ± 0,003	0,077 ± 0,006	0,333 ± 0,003
<i>A.niger 05</i>	0,033 ± 0,004	0,044 ± 0,007	0,029 ± 0,002	0,074 ± 0,003	0,325 ± 0,011
<i>Pen. 1</i>	-	0,018 ± 0,001	0,079 ± 0,006	0,096 ± 0,008	0,100 ± 0,010
<i>Pen. 2</i>	-	0,002 ± 0,001	0,019 ± 0,005	0,098 ± 0,011	0,341 ± 0,009
<i>Pen. 3</i>	0,001 ± 0,000	0,009 ± 0,002	0,044 ± 0,005	0,128 ± 0,010	0,119 ± 0,011
<i>Pen. 4</i>	0,003 ± 0,001	0,010 ± 0,000	0,025 ± 0,005	0,049 ± 0,002	0,103 ± 0,007
<i>Pen. 5</i>	-	0,024 ± 0,003	0,200 ± 0,012	0,336 ± 0,014	0,111 ± 0,009
<i>Colletotrichum</i>	0,015 ± 0,004	0,018 ± 0,002	0,029 ± 0,002	0,222 ± 0,011	0,268 ± 0,012

(-) Não houve atividade enzimática de β -Glicosidase

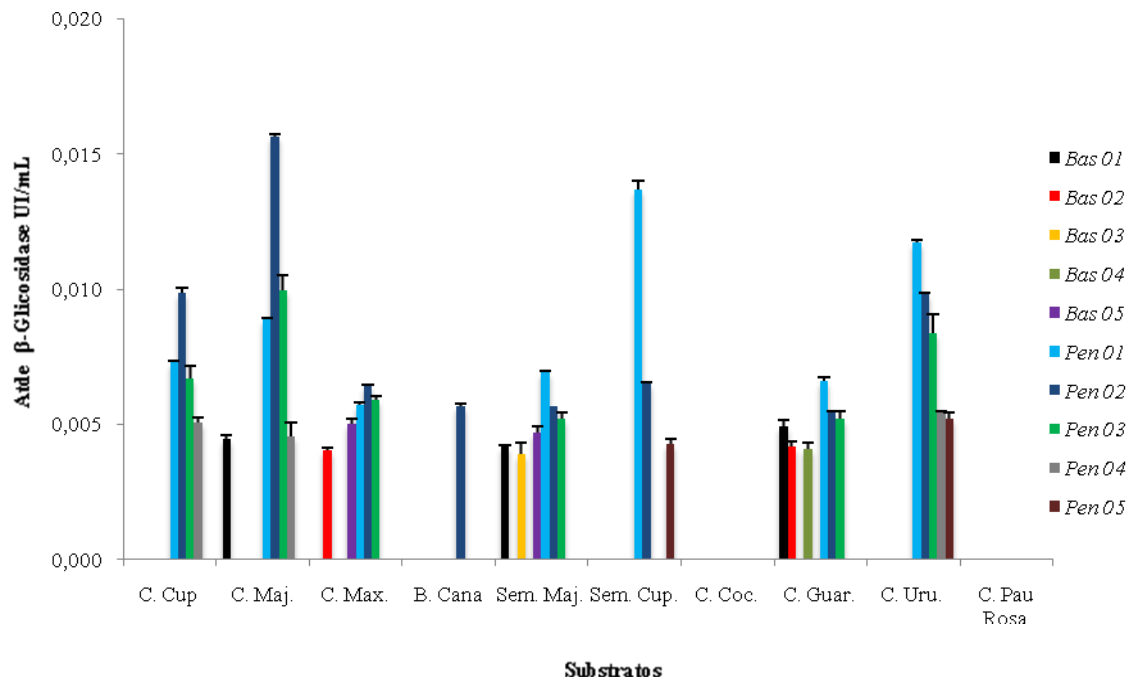


Figura 37: Produção de β -glicosidase por dez fungos testados em FES utilizando diferentes substratos.

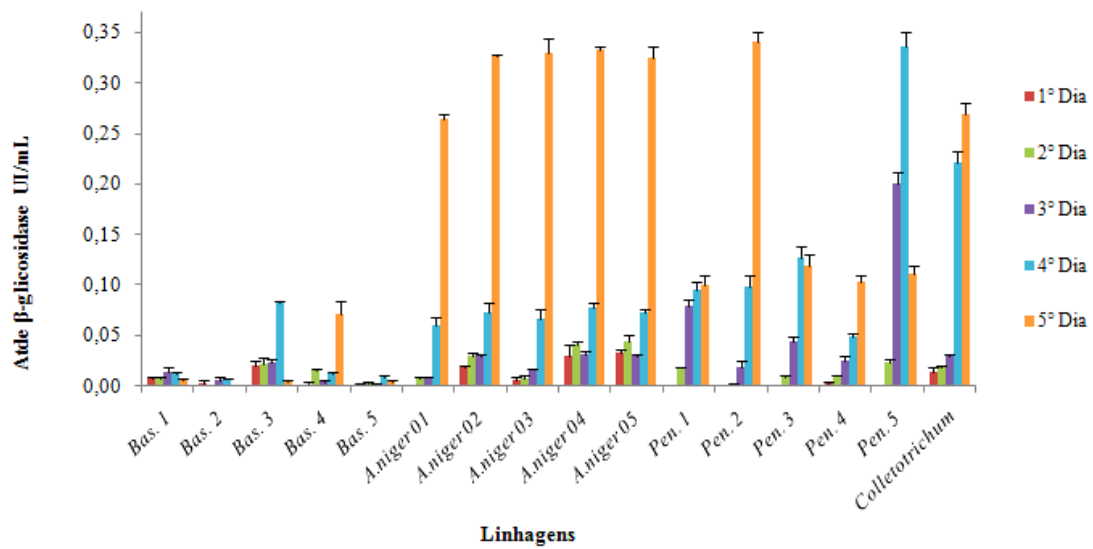


Figura 38: Produção de β -glicosidase por dezesseis fungos testados em FS utilizando palha de trigo.

5.5.3 Atividade celulolítica FPase

A produção da enzima FPase pelos 10 fungos cultivados nos 10 diferentes substratos em FES está apresentada na Figura 39. A maior produção dessa enzima foi obtida quando se utilizou C. Maj. como substrato sólido atingindo valor igual a 0,018 UI/mL e quando se utilizou C. Uru. com atividade de 0,015 UI/mL, sendo os resultados registrados para Pen. 2 e Pen. 1, respectivamente (Tabela 10). Entre os 10 fungos que apresentaram produção de FPase utilizando os substratos sólidos, o Pen. 1 registrou a segunda maior atividade, porém destacou-se dos demais por ter atividade enzimática em seis substratos testados. O Pen. 2 que apresentou as maiores atividades para CMCase e β -glicosidase, ambas em C. Maj., também apresentou maior produção de FPase neste substrato e a segunda maior atividade em C. Uru.

Analisando os substratos, ficou evidente que a C. Uru. foi a melhor fonte de carbono para produção de FPase, pois induziu atividade para esta enzima em sete linhagens (Figura 39).

Em contraste com os resultados observados na fermentação em estado sólido, estão os resultados observados para FS (Tabela 11). Os fungos *A. niger* obtiveram os melhores resultados para FPase, evidenciando o 5º dia de cultivo como o dia de maior produção dessa enzima (Figura 40). *A. niger* 1 mostrou a maior atividade com 0,313 UI/mL. Os demais *A. niger* também tiveram resultados promissores, com valores que variaram entre 0,014 UI/mL e 0,040 UI/mL no 4º dia de cultivo e entre 0,027 UI/mL e 0,291 UI/mL no 5º dia. Os valores de atividade registrados para os *Penicillium* spp. foram inferiores aos observados para *A. niger* em palha de trigo, entretanto, o Pen. 1 mostrou atividade enzimática 4 vezes superior aos apresentados em alguns resíduos agrícolas regionais submetidos a fermentação em estado sólido, registrando 0,046 UI/mL no 5º dia de cultivo. Conforme os valores observados nos ensaios realizados por FES e FS, verificou-se que a

presença de atividade CMCase ocorre com baixa produtividade simultânea de FPase, podendo haver alguma correlação neste fato ou ser apenas coincidência.

Com relação a curva de produção, observou-se um aumento gradual da produtividade FPásica até o 3º dia de cultivo para os *A. niger* 1, 2, 4 e 5, registrando-se decréscimo no 4º dia. Para o *A. niger* 3, o decréscimo ocorreu no 3º dia. De acordo com FLACHNER et al. (2004) e LESCHINE et al. (1995), o decréscimo da atividade enzimática FPase provavelmente está ligada a escassez de fonte de alimentos cruciais ao metabolismo e/ou acúmulo de metabolitos secundários como glicose e celobiose provocando com isso a inibição enzimática.

Muitas investigações já foram feitas com relação à atividade enzimática de celulases utilizando diferentes fungos, diferentes substratos e diferentes tipos de fermentação. KUHAD E SINGH (1993) e KIM et al. (1998), por exemplo, evidenciam a boa produção de enzimas celulolíticas por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Outros estudos mostraram que a produção de celulase pode ser promissora para outros fungos investigados como *Hemicola fuscoatra* (RAJENDRAN et al., 1994) e *Trichoderma harzianum* (Mes-Hartree et al., 1988).

Resultados abordados por ACHARYA et al. (2008) retrataram a otimização da produção de CMCase por *A. niger* utilizando pó de serra como substrato. Nesse estudo utilizaram FS para o crescimento do *A. niger* e pó de serra pré-tratado com NaOH em diferentes concentrações e encontraram valor máximo para CMCase de 0,181 UI/mL quando utilizaram 9,6% de pó de serra tratado com NaOH 2N. Valores superiores ao de ACHARYA foram encontrados para os 5 *A. niger* e os 5 *Penicillium* spp. avaliados neste trabalho quando fermentados com solução de sais e 5% de palha de trigo assim como quando realizou-se FES com 5% de resíduos agrícolas regionais. Os 5 fungos do gênero *Penicillium* apresentaram valores acima de 1,00 UI/mL quando fermentados em C. Cup.,

C. Maj., C. Max., B. Cana e C. Uru. Bem superior ainda, foram os 5 fungos do gênero *Aspergillus* cujas atividades ultrapassaram 20 UI/mL no 5° dia de cultivo.

Há relatos que fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Mucor* e *Rhizopus* se destacam quanto à produção de β -glicosidase, porém dentre estes, o *A. niger* destaca-se como o melhor produtor dessa enzima (FADEL, 2000; CHAUVE et al. 2010). Os ensaios com palha de trigo confirmam estes relatos, pois os maiores resultados também foram observados para os *A. niger*.

GOMATHI et al. (2012) avaliou a produção de CMCase ao cultivar *A. flavus* em meio líquido Czapek Dox e farelo de trigo como substrato e obteve atividade máxima no 3° dia de fermentação com 1,23 UI/mL. Nas condições de ensaio do presente trabalho as linhagens de *A. niger* endofíticas atingiram o auge de produção de CMCase no 5° dia de cultivo em FS e os *Penicillium* spp. com valores acima de 1,00 UI/mL para diferentes FES, demonstrando valores 17 e 13 vezes, respectivamente, superior ao encontrado por GOMATHI (2012).

Tabela 10: Resultados das atividades enzimáticas de FPase em UI/mL dos dez fungos fermentados em estado sólido em diferentes substratos.

Atividade enzimática FPase										
Linh. Subst.	Bas 01	Bas 02	Bas 03	Bas 04	Bas 05	Pen 01	Pen 02	Pen 03	Pen 04	Pen 05
C. Cup	-	-	-	-	-	0,011 ± 0,001	-	-	-	-
C. Maj.	0,004 ± 0,001	-	-	-	-	0,009 ± 0,001	0,018 ± 0,000	0,010 ± 0,001	-	-
C. Max.	-	0,003 ± 0,000	-	-	-	-	0,009 ± 0,000	-	-	-
B. Cana	-	-	-	-	-	-	0,002 ± 0,000	-	-	-
Sem. Maj.	0,001 ± 0,000	-	0,001 ± 0,000	-	-	0,002 ± 0,000	-	-	-	-
Sem. Cup.	-	-	-	-	-	0,012 ± 0,001	-	-	-	-
C. Coc.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. Guar.	-	-	-	-	-	0,010 ± 0,000	-	-	-	-
C. Uru.	0,003 ± 0,001	-	-	0,002 ± 0,001	-	0,015 ± 0,001	0,014 ± 0,001	0,006 ± 0,000	0,007 ± 0,000	0,005 ± 0,001
R. Pau Rosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) Não houve atividade enzimática de Fpase.

Tabela 11: Resultados das atividades enzimáticas de FPase em UI/mL dos dezesseis fungos em fermentação submersa utilizando palha de trigo.

<i>T. de Cultivo</i> <i>Linh.</i>	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
<i>Bas. 1</i>	-	-	-	-	-
<i>Bas. 2</i>	-	-	-	-	-
<i>Bas. 3</i>	-	-	-	-	-
<i>Bas. 4</i>	-	-	-	-	0,088 ± 0,010
<i>Bas. 5</i>	-	-	-	-	0,001 ± 0,000
<i>A.niger 01</i>	-	-	0,153 ± 0,013	0,040 ± 0,020	0,313 ± 0,007
<i>A.niger 02</i>	-	-	0,074 ± 0,015	0,014 ± 0,003	0,271 ± 0,010
<i>A.niger 03</i>	-	0,140 ± 0,006	0,087 ± 0,018	0,021 ± 0,000	0,290 ± 0,012
<i>A.niger 04</i>	-	-	0,071 ± 0,015	0,021 ± 0,003	0,291 ± 0,011
<i>A.niger 05</i>	-	-	0,086 ± 0,015	-	0,269 ± 0,015
<i>Pen. 1</i>	-	0,016 ± 0,001	-	0,026 ± 0,009	0,046 ± 0,004
<i>Pen. 2</i>	-	-	-	-	-
<i>Pen. 3</i>	-	-	0,014 ± 0,002	0,001 ± 0,004	0,007 ± 0,000
<i>Pen. 4</i>	-	-	0,017 ± 0,005	0,021 ± 0,002	-
<i>Pen. 5</i>	-	-	-	0,001 ± 0,000	-
<i>Colletotrichum</i>	-	-	0,053 ± 0,007	0,087 ± 0,006	0,103 ± 0,012

(-) Não houve atividade enzimática de Fpase

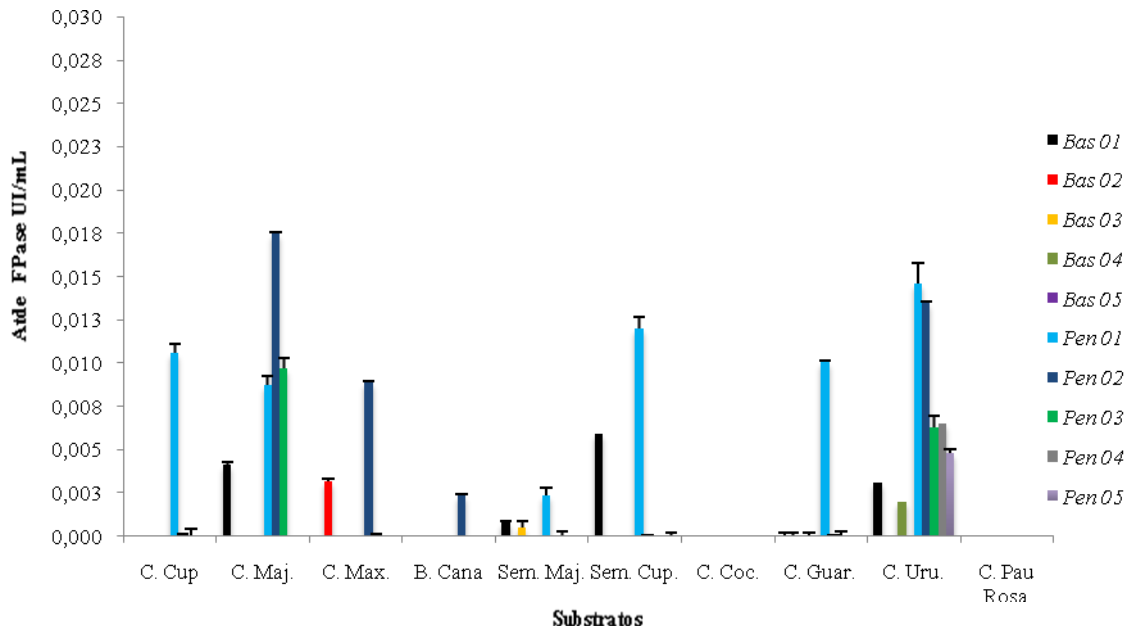


Figura 39: Produção de FPase por dez fungos testados em FES utilizando diferentes substratos.

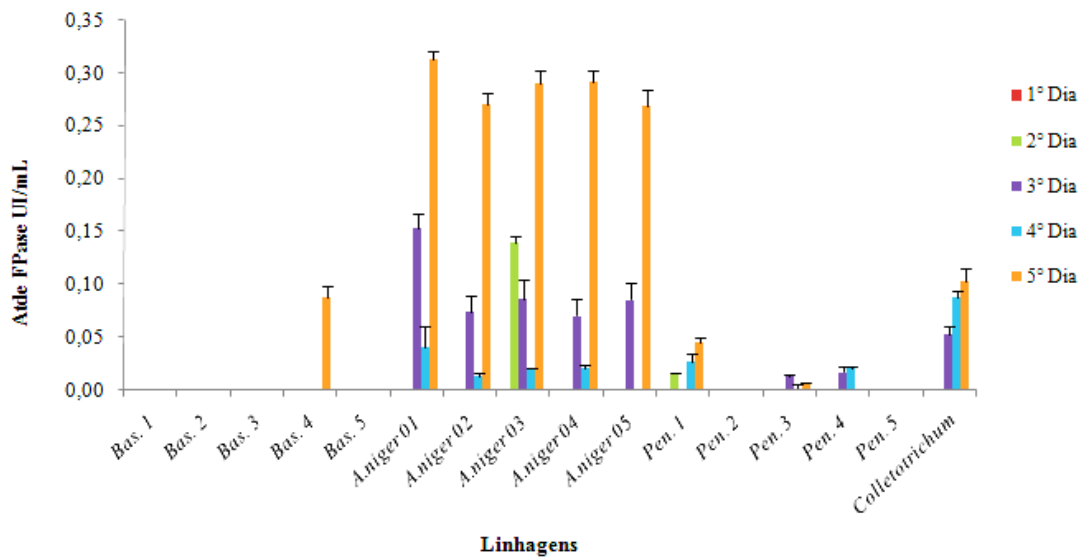


Figura 40: Produção de FPase por dezesseis fungos testados em FS utilizando palha de trigo.

Fatores que vão desde as características do substrato, tipo de microrganismos, condições operacionais e até a natureza do sistema enzimático são de grande importância, pois são eles que colaboram para eficácia da hidrólise da celulose. Dessa forma se torna limitada a comparação direta dos resultados de diferentes estudos.

5.5.4 Atividade Xilanolítica

Ao contrário do que foi observada para produção de celulasas por FES, a produção de xilanase nas mesmas condições (FES) não foi expressiva (Tabela 12), porém os maiores valores de atividade xilanolítica foram de 5,118 UI/mL e 4,352 UI/mL em C. Uru. para Pen. 4 e Pen. 5, respectivamente. C. Cup., C. Maj. e C. Max. mostraram-se como as fontes de carbono menos apropriados para produção de xilanase (Figura 41). Não foi possível observar a produção de xilanase quando se utilizou C. Coc. e R. Pau Rosa como substrato, todavia percebeu-se a produção desta enzima em oito diferentes substratos testados.

De todos os fungos que apresentaram atividade enzimática pela FES, apenas o Pen. 1 apresentou atividade xilanolítica nos oito substratos avaliados, tendo sua maior produção igual a 3,012 UI/mL ao utilizar C. Gua. como fonte de carbono. De todos os substratos avaliados, a C. Max. foi a fonte de carbono que induziu a maior quantidade de fungos à produção de xilanase.

Quando foram observados os resultados em FS, verificou-se uma grande diferença nos valores apresentados pelos *Penicillium* spp. (Tabela 13) quando comparados com os ensaios em FES, porém se deve considerar que estes fungos foram avaliados em fermentação submersa e em outro substrato, a palha de trigo. Alguns destes fungos apresentaram atividades superiores à atividade observada em FES, como foi o caso do Pen. 5. Este fungo obteve já no 2º dia de cultivo atividade xilanolítica de 9,050 UI/mL e no 5º

dia chegou a 84,085 UI/mL, resultado bem superior ao observado para o mesmo fungo em FES.

De todos os fungos testados em FS utilizando palha de trigo como indutor, os do gênero *Penicillium* se mostraram como os melhores produtores de xilanase. Além do Pen. 5 que obteve a maior atividade xilanolítica verificada no 5° dia de cultivo, o Pen. 3 atingiu 81,490 UI/mL no 4° dia e o Pen 1 com 75,830 UI/mL no 5° dia de cultivo. A curva de produção xilanolítica foi crescente para os Pen. 1 e 5, enquanto que os Pen. 2 e 3 mostraram um decréscimo no 5° dia de cultivo. Um decréscimo da produção de xilanase também foi percebido para o Pen. 4, porém registrado a partir do 4° dia. (Figura 42).

Os fungos do gênero *A. niger* foram os segundos melhores produtores de xilanase, e todos alcançaram valores de atividade acima de 28 UI/mL no 5° dia de cultivo. O *A. niger* 1 apresentou a maior atividade xilanolítica alcançando 49,778 UI/mL no 5° dia de cultivo. Diferentemente da curva de produção enzimática dos *Penicillium* spp., a curva de produção xilanolítica se mostrou crescente para a maioria dos *A. niger*. O *A. niger* 3 foi o único fungo a apresentar um decréscimo no período de cultivo, sendo este decréscimo observado no 4° dia de cultivo.

Atividade xilanolítica de 5,205 UI/mL foi observada para o basidiomiceto Bas. 4 em FS, no 5° dia de cultivo. Os demais basidiomicetos apresentaram resultados abaixo de 1,50 UI/mL durante os cinco dias de cultivo.

Percebe-se que diferentes fungos já foram investigados quanto à produção xilanolítica, porém poucos são os trabalhos com fungos endofíticos e basidiomicetos da Amazônia. Muitas espécies de *Penicillium*, por exemplo, foram avaliadas quanto à produção enzimática de xilanase e a maioria delas foi descritas como boas produtoras dessa enzima. Assim, REESE, MAGUIRE, PARRISH (1973) relataram a produção de xilanase por 250 micro-organismos de diversos gêneros. Destes, 11 foram selecionados,

entre os quais 5 eram pertencentes ao gênero *Penicillium* (*P. pusillum*, *P. islandicum*, *P. chermisinum*, *P. wortmanni* e *P. roseopurpureum*). Em outro caso, NAIR (2008) avaliou a produção de xilanase em pelo menos 34 linhagens fúngicas dentre elas fungos do gênero *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma* e obteve valor máximo de 40 IU/mL quando cultivou *A. sydowii* (SBS45) em meio líquido rico em minerais por 7 dias. O dobro deste resultado foi observado na FS usando palha de trigo para o Pen. 5 após cinco dias de cultivo e o Pen. 3 após quatro dias de cultivo com 84,04 IU/mL e 81,49 IU/mL, respectivamente, seguidos pelos Pen. 1 com 75,83 IU/mL e *A. niger* 01 com 49,78 IU/mL, ambos após cinco dias de cultivo.

SIMÕES et al. (2009) investigou a produção de xilanase por 17 fungos filamentosos em diferentes condições e obteve a produção máxima de xilanase de 93,5 IU/mL para *Trichoderma viride* em fermentação submersa, utilizando farelo de trigo como fonte de carbono a 25 °C por 5 dias. OLIVEIRA, PORTO, TAMBOURGI (2006) descreve os resultados para produção de xilanase por *Penicillium janthinellum* em diferentes fontes de carbono tratadas com ácido, tendo obtido os valores de: 55,3 IU/mL para sabugo de milho, 54,8 IU/mL para casca de aveia, 23,0 IU mL para bagaço de cana e 23,8 IU/mL para palha de milho. Não houve otimização das variáveis que influenciam a produção enzimática em nenhum dos ensaios realizados no presente trabalho, no entanto, valores acima de 50 IU/mL foram observados para linhagens de *Penicillium* spp. endofíticas nos ensaio em FS (Tabela 12).

A produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por basidiomicetos tem sido pouco descrita na literatura. Dentre os relatos destaca-se o de QINNGHE et al. (2004) cujos experimentos com *Pleurotus ostreatus* (SYJ042) resultaram em 24,98 IU/mL de atividade xilanásica após 7 dias de cultivo. Um destaque deve ser registrado ao estudo com basidiomiceto *Coprinellus disseminatus* (SW-1) num período de incubação de 7 dias a 37

°C e pH 6,4 em que ocorreu a produção de xilanase até o nível máximo de 362.1 IU/mL (AGNIHOTRI et al., 2010). Estes valores são superiores aos encontrados para os basidiomicetos avaliados em ambos os ensaios (FES e FS) deste trabalho.

Comparando os dados apresentados pelos fungos cultivados em FES com os resultados da literatura descritos acima, pode-se inferir que os substratos utilizados neste ensaio proporcionaram baixa produção de xilanase, porém devem-se considerar as diferenças de metodologia de fermentação como tipo de substrato, tipo de cultivo (FES ou FS), e otimização das variáveis (pH e temperatura).

Neste presente trabalho vários foram os resíduos agrícolas regionais utilizados para a indução das enzimas celulolíticas e xilanolítica e muitos deles obtiveram níveis baixos de atividade celulolítica e/ou xilanolítica, não obstante é de grande importância o estudo com resíduos da região, pois eles foram avaliados por serem de baixo custo e encontrados abundantemente.

Tabela 12: Resultados das atividades enzimáticas de xilanase em UI/mL dos dez fungos por fermentação em estado sólido em diferentes substratos.

Atividade enzimática Xilanase										
Linh. Subst.	Bas 01	Bas 02	Bas 03	Bas 04	Bas 05	Pen 01	Pen 02	Pen 03	Pen 04	Pen 05
C. Cup	-	-	-	-	-	0,158 ± 0,038	0,233 ± 0,019	-	-	-
C. Maj.	0,371 ± 0,019	-	-	-	-	0,203 ± 0,126	0,510 ± 0,050	0,471 ± 0,101	0,339 ± 0,025	0,526 ± 0,009
C. Max.	0,336 ± 0,003	0,199 ± 0,009	0,386 ± 0,012	-	0,348 ± 0,013	0,190 ± 0,095	0,542 ± 0,045	0,418 ± 0,103	0,966 ± 0,083	0,464 ± 0,030
B. Cana	-	-	-	-	-	0,209 ± 0,014	-	-	-	-
Sem. Maj.	1,035 ± 0,020	-	0,966 ± 0,051	-	0,283 ± 0,002	1,633 ± 0,276	0,247 ± 0,014	0,537 ± 0,121	1,483 ± 0,098	0,268 ± 0,057
Sem. Cup.	0,257 ± 0,013	-	-	-	-	0,662 ± 0,087	1,824 ± 0,162	0,188 ± 0,007	-	0,207 ± 0,025
C. Coc.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. Guar.	0,534 ± 0,119	-	-	0,237 ± 0,011	-	3,012 ± 0,079	0,261 ± 0,012	2,109 ± 0,114	1,491 ± 0,010	1,357 ± 0,056
C. Uru.	0,867 ± 0,022	-	-	0,430 ± 0,005	-	1,768 ± 0,063	0,544 ± 0,028	1,111 ± 0,182	5,302 ± 0,018	4,352 ± 0,096
R. Pau Rosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) Não houve atividade enzimática de Xilanase.

Tabela 13: Resultados das atividades enzimáticas de xilanase em UI/mL dos dezesseis fungos em fermentação submersa utilizando palha de trigo.

<i>T. de Cultivo</i> <i>Linh.</i>	1° Dia	2° Dia	3° Dia	4° Dia	5° Dia
<i>Bas. 1</i>	0,117 ± 0,011	0,143 ± 0,017	0,145 ± 0,010	0,173 ± 0,017	0,183 ± 0,022
<i>Bas. 2</i>	-	0,785 ± 0,092	1,189 ± 0,136	1,019 ± 0,057	1,071 ± 0,150
<i>Bas. 3</i>	-	0,040 ± 0,003	0,532 ± 0,131	0,734 ± 0,187	0,461 ± 0,122
<i>Bas. 4</i>	0,066 ± 0,003	0,097 ± 0,003	2,436 ± 0,204	1,214 ± 0,282	5,205 ± 0,024
<i>Bas. 5</i>	0,727 ± 0,061	0,966 ± 0,078	0,984 ± 0,016	1,046 ± 0,023	1,099 ± 0,001
<i>A.niger 01</i>	0,114 ± 0,010	3,071 ± 0,351	9,249 ± 1,020	26,486 ± 1,527	49,778 ± 0,324
<i>A.niger 02</i>	0,282 ± 0,163	10,770 ± 0,054	18,876 ± 0,442	27,516 ± 0,451	29,905 ± 0,430
<i>A.niger 03</i>	0,273 ± 0,039	1,181 ± 0,073	33,005 ± 0,858	21,032 ± 0,628	28,292 ± 0,096
<i>A.niger 04</i>	0,107 ± 0,002	13,355 ± 0,289	20,600 ± 0,570	27,162 ± 0,587	29,753 ± 0,711
<i>A.niger 05</i>	0,123 ± 0,029	14,304 ± 0,050	16,372 ± 0,089	25,188 ± 0,868	29,525 ± 0,190
<i>Pen. 1</i>	0,556 ± 0,027	22,187 ± 0,906	41,595 ± 3,624	73,351 ± 0,073	75,830 ± 1,448
<i>Pen. 2</i>	0,086 ± 0,001	0,143 ± 0,019	8,644 ± 0,320	8,700 ± 1,542	2,223 ± 0,199
<i>Pen. 3</i>	0,935 ± 0,012	23,864 ± 1,437	76,613 ± 0,852	81,490 ± 0,344	66,757 ± 0,448
<i>Pen. 4</i>	0,033 ± 0,002	12,587 ± 0,151	47,228 ± 0,282	28,218 ± 1,420	23,038 ± 0,442
<i>Pen. 5</i>	0,958 ± 0,063	9,050 ± 0,607	18,132 ± 0,642	69,703 ± 0,545	84,045 ± 1,139
<i>Colletotrichum</i>	0,112 ± 0,017	3,823 ± 0,208	7,197 ± 0,064	7,554 ± 0,049	7,652 ± 0,181
(-) Não houve atividade enzimática de xilanase					

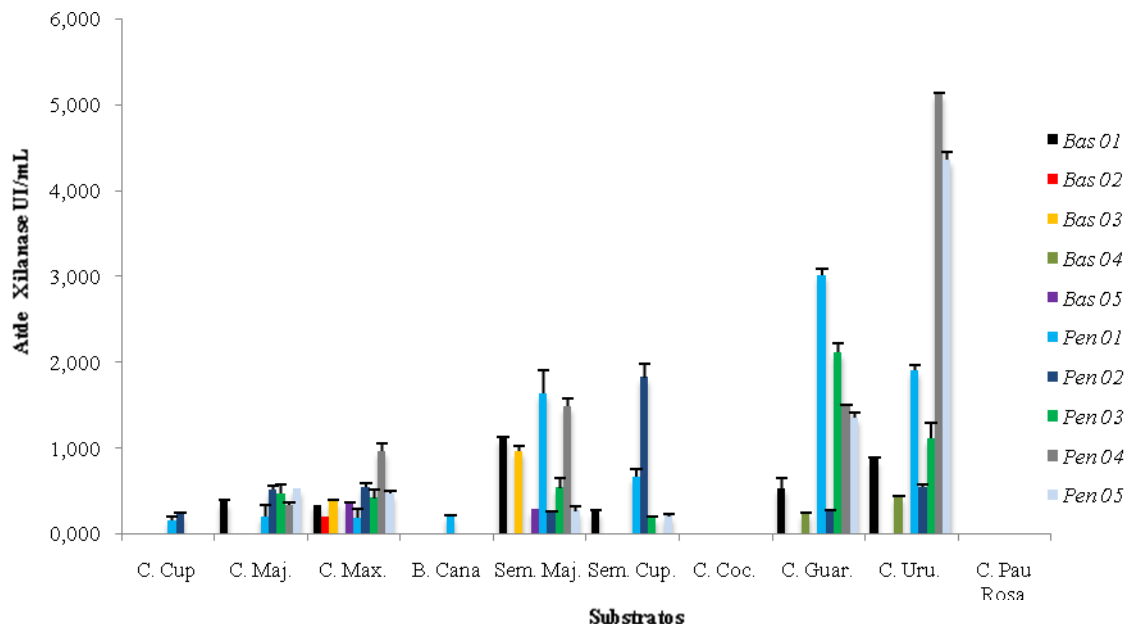


Figura 41: Produção de xilanase por dez fungos testados em FES utilizando diferentes substratos.

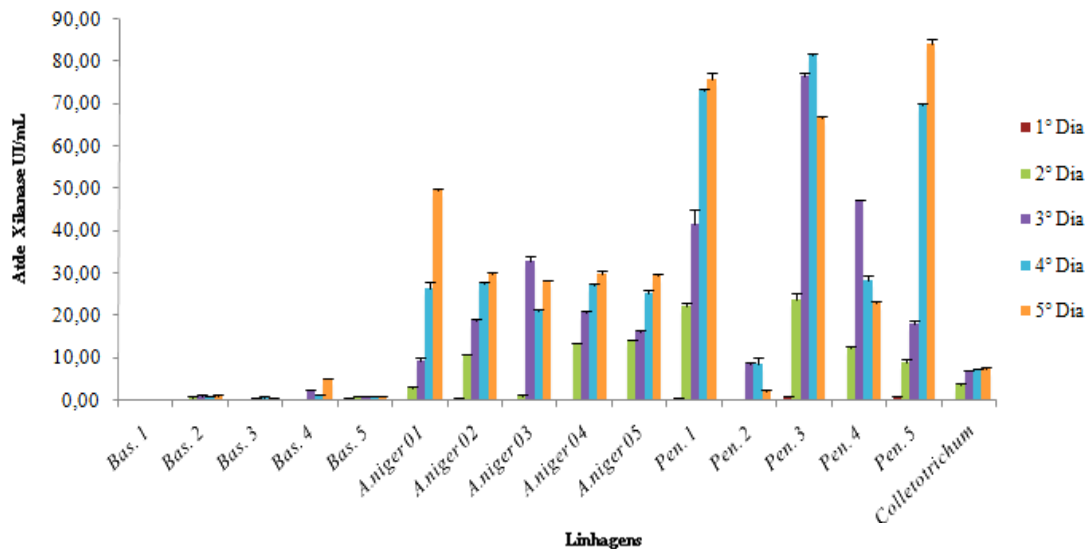


Figura 42: Produção de xilanase por dezesseis fungos testados em FS utilizando palha de trigo.

5.6 Curva de produção de CMCase pelo Pen. 5 utilizando C. Maj. e C. Max como substrato

Após avaliar a produção de celulasas e xilanase pelos dez fungos endofíticos fermentados em diferentes resíduos agrícolas regionais (FES) assim como pelos dezesseis fungos fermentados em palha de trigo, foi selecionado o fungo Pen. 5 por ter apresentado os melhores resultados da produção enzimática em FS, e dois diferentes substratos regionais (C. Maj. e C. Max) para avaliar a curva de produção das enzimas CMCase, β -Glicosidase e xilanase.

A curva de produção da endoglucanase (CMCase) foi realizada conforme o item 4.9 utilizando C. Maj. e C. Max como indutor. Os resultados obtidos são mostrados na figura 43.

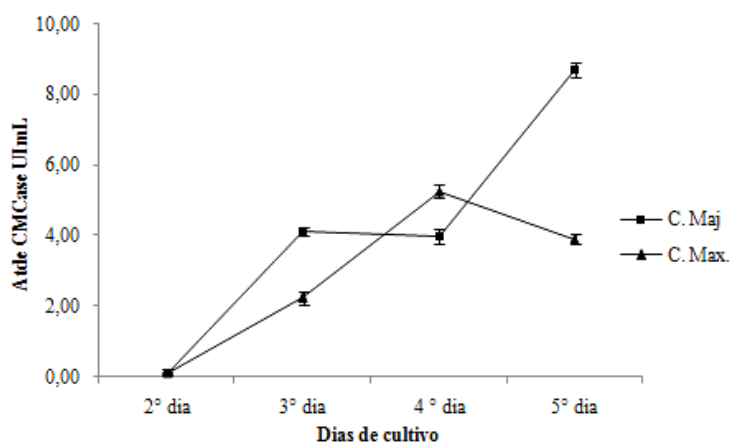


Figura 43: Curva de produção enzimática de CMCase (UI/mL) por Pen. 5 utilizando dois indutores (C. Maj. e C. Max).

Pelos resultados expostos, foi possível verificar a maior produção de CMCase quando utilizou-se C. Maj. como indutor com valor de 8,427 UI/mL no 5º dia de cultivo. Até o 3º dia de cultivo o Pen. 5 apresentou o mesmo perfil para ambos os substratos

(aumento acentuado). No 4° dia de cultivo a produção enzimática registrada para a C. Maj. foi praticamente a mesma do 3° dia, porém cresceu rapidamente atingindo o maior valor no 5° dia. Por outro lado na C. Max. a atividade máxima de 5,213 UI/mL foi atingida no 4° dia e no 5° dia decresceu. Vale ressaltar que os valores obtidos para os substratos utilizados neste ensaio foram maiores que os observados em palha de trigo, para a qual a atividade máxima foi de 2,777 UI/mL no 3° dia de cultivo.

Estes resultados demonstram que o mesmo fungo teve comportamento diferente na presença de diferentes indutores mostrando que houve influência dos mesmos na produção enzimática. Outro ponto de grande relevância é o dia de máxima atividade enzimática, fator decisivo para a produção industrial das enzimas, uma vez que foram observados diferentes dias com pico máximo de produção CMCásica como observado em C. Maj. no 5° dia de cultivo e C. Max. no 4° dia. Comparando a produção de CMCase pelo Pen. 5 na presença dos três indutores (C. Maj., C. Max e palha de trigo) é possível constatar que a melhor produção da enzima ocorreu em C. Maj.

Os resultados obtidos para curva de produção endoglucanásica (CMCase) podem ser comparados com os resultados relatados por CAMASSOLA E DILLON (2009) quando cultivaram um fungo do gênero *Penicilium* em FS e utilizaram outro tipo de substrato. Neste experimento CAMASSOLA avaliou a produção de endoglucanase por *Penicillium echinulatum* utilizando FS e 1% de bagaço de cana de pré-tratado e não tratada a 180 rpm, 28 °C por 6 dias e verificou que a maior produção de celulases foi obtida quando o fungo foi fermentado usando bagaço de cana não tratado resultando em 1,60UI/mL. A atividade encontrada por Camassola foi aproximadamente oito vezes inferior a observada em C. Maj. e 5 vezes inferior a apresentada em C. Max.

5.7 Curva de produção de β -Glicosidase pelo Pen. 5 utilizando C. Maj. e C. Max como indutor

A produção de β -Glicosidase expressa em UI/mL neste ensaio está apresentada na Figura 44.

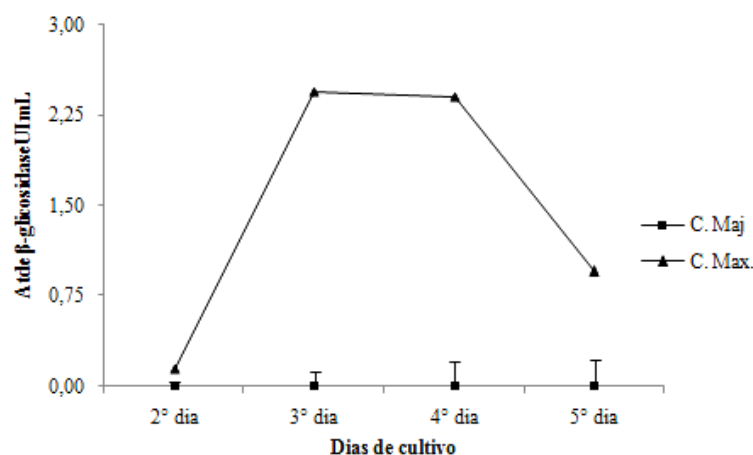


Figura 44: Curva de produção enzimática de β -Glicosidase (UI/mL) por Pen. 2 utilizando dois indutores (C. Maj. e C. Max.).

Em relação à produção β -Glicosídica, verificou-se atividade apenas em C. Max. com maior produção no 3º dia de cultivo com 2,448 UI/mL.

Ao contrário do perfil cinético de CMCCase, o perfil cinético de β -Glicosidase se mostrou semelhante durante o 3º e 4º dia de cultivo, com diminuição acentuada da atividade enzimática. É notável que este resultado também foi maior que o apresentado em palha de trigo onde o mesmo fungo obteve a maior produção no 4º dia de cultivo com 0,336 UI/mL. Não houve produção de β -Glicosidase pelo Pen. 5 nos dois substratos avaliados em FES.

Com intuito de verificar a produção qualitativa de glicose, produto final da ação da β -Glicosidase sobre a celobiose, realizou-se um teste qualitativo utilizando tiras reagentes.

Neste rápido experimento 50 μ L de cada extrato enzimático obtido no item 4.9 foi aplicado apenas sobre a parte inferior da tira que é reveladora da presença de glicose demarcada na Figura 45.

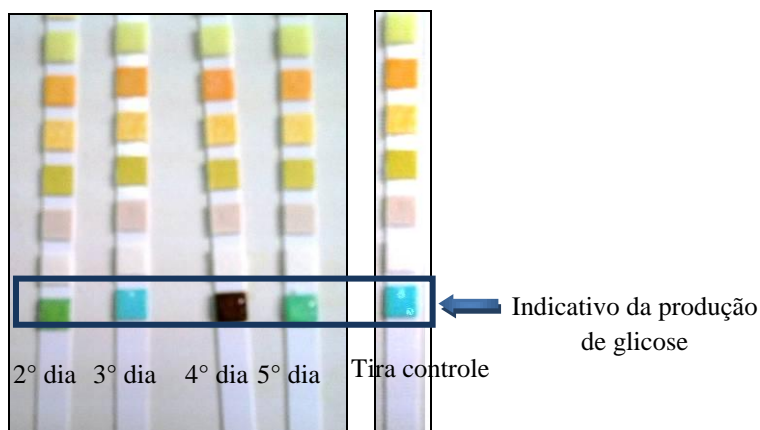


Figura 45: Tiras reagentes utilizadas como teste qualitativo para indicar a presença de glicose.

Nota-se que a produção qualitativa de glicose foi mais intensa no 4º dia de cultivo. No 3º dia não foi registrado a presença de açúcar, pois não houve mudança de cor na tira reagente (Figura 45), visto que este resultado foi igual ao da tira controle. Um dos fatores que pode ter interferido neste resultado foi o consumo da glicose pelo microrganismo.

Com os resultados apresentados em FES e em FS, constata-se a melhor produção de β -Glicosidase do Pen. 5 em FS utilizando C. Max. como indutor. CAMASSOLA E DILLON (2009) avaliaram a produção de β -Glicosidase por *Penicillium echinulatum* e trabalharam nas mesmas condições reportadas no item 5.5 deste trabalho, porém encontraram diferentes atividades, pois trabalharam com bagaço de cana pré-tratado e não tratado. Em bagaço de cana pré-tratado encontraram atividade de 0,18 UI/mL enquanto que em bagaço de cana não tratado observaram atividade de 0,21 UI/mL. Estes resultados mostraram que mesmo utilizando um pré-tratamento no substrato, eles ainda foram 10 vezes inferiores ao apresentado neste trabalho, mesmo não tendo sido feito nenhum tipo de tratamento para os substratos avaliados.

5.8 Curva de produção de xilanase pelo Pen. 5 utilizando C. Maj. e C. Max como indutor

Os valores de xilanase obtidos pela curva de produção do Pen. 5 estão apresentados na Figura 46. A produção da enzima xilanase foi maior quando utilizou-se o agente indutor C.Maj., a produção máxima ocorreu no 5º dia de cultivo com valor de 17,986 UI/mL. Quanto ao perfil cinético de ambos os substratos, pode-se inferir que ambos foram semelhantes uma vez que eles permaneceram crescentes até o 4º dia de cultivo, no entanto, em quantidades de produção diferentes um do outro. Enquanto houve a produção crescente de xilanase em C. Maj., em C. Max. esse aumento da produção se mostrou crescente até o 4º dia de cultivo e ao final da fermentação ocorreu uma diminuição da produção enzimática. A produção crescente de xilanase apresentada em C. Maj. pode ser comparada com a curva de produção realizada por FS com palha de trigo onde ocorreu a crescente produção de xilanase. No entanto, a maior produção dessa enzima ocorreu em palha de trigo com 84,045 UI/mL.

Os resultados obtidos no presente trabalho foram comparados com os obtidos com os de outros fungos do gênero *Penicillium*. Com relação à produtividade, os resultados deste trabalho foram melhores que algumas linhagens avaliadas como o de MISHRA et al. (1985) que cultivaram *Penicillium funiculosum* por 10 dias, sob agitação, e obtiveram atividade de 16,0 UI/mL.

Estudos realizados por HALTRICH et. al. (1996) mostraram que a produção de xilanase foi 12,2 UI/mL quando cultivaram *Penicillium kloeckeri* por cinco dias sob agitação. *Penicillium janthinellum* foi cultivado por PALMA et al. (1996) e OLIVEIRA, PORTO, TAMBOURGI (2006) em meio com bagaço de cana por 4 dias e em meio com sabugo de milho e palha de aveia por 6 dias, respectivamente, em condições agitadas, e

obtiveram 89,5 U/mL e 54,8 U/mL de atividade xilanásica. Este último relato mostrou produção de xilanase 3 vezes maior a apresentada pelo ensaio em FS com palha de trigo.

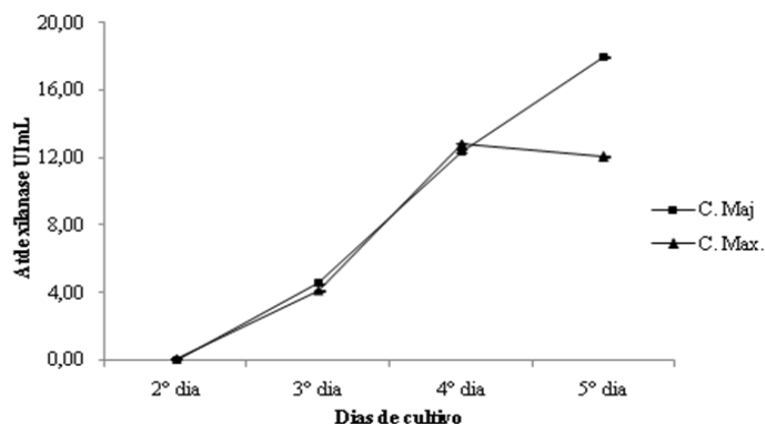


Figura 46: Curva de produção enzimática de xilanase (UI/mL) por Pen 02 utilizando dois indutores (C. Maj. e C. Max).

Investigações relatam que casca de maracujá e casca de macaxeira são mais ricas em pectina do que em celulose e hemicelulose, contudo, pode-se dizer que os substratos utilizados ainda proporcionaram, de maneira geral, boa produção de CMCase, β -Glicosidase e xilanase pelo Pen. 5 quando comparados com a literatura.

Vale ressaltar que este é um dos poucos trabalhos em que se utilizaram diferentes resíduos agrícolas regionais ensaiados com diferentes fungos endofíticos e basidiomicetos da região Amazônica Brasileira.

6. CONCLUSÃO

1. Coerente com dados da literatura, os fungos do gênero *Penicillium* (principalmente os Pen. 1, 2, 3 e 5) apresentaram, no ensaio qualitativo, capacidade de produzir enzimas celulases confirmada pela formação de halos translúcidos ao redor dos *cup plates* por fermentação em estado sólido de pelo menos quatro diferentes resíduos agrícolas regionais (C. Maj., C. Max., Sem. Maj. e Sem. Cup.);
2. Para a produção das enzimas CMCase e β -glicosidase por diferentes linhagens cultivadas em FES, oito dos dez substratos se mostraram apropriados: C. Maj., C. Max., C. Cup., C. Guar., C. Uru., B. Cana, Sem. Maj. e Sem. Cup. Destes, os cinco primeiros mostraram como boas fontes de carbono para os 5 *Penicillium* spp., o que leva a sua utilização para produção e otimização dessas enzimas;
3. As maiores atividades enzimáticas de CMCase (13,444 UI/mL), β -glicosidase (0,016 UI/mL) e FPase (0,018 UI/mL) em FES foram evidentes nos extratos enzimáticos do *Penicillium* sp. 2 em C. Maj., enquanto que em FS, destacaram-se as 5 linhagens de *A. niger* alcançando as maiores produções das três celulases no 5º dia de cultivo.
4. Os fungos do gênero *Penicillium* destacaram-se pela produção de xilanase em FES e em FS quando comparados com os demais fungos avaliados, mostrando-se como bons produtores dessa enzima nos dois diferentes meios de cultivo utilizados;
5. Com os resultados da curva de produção das enzimas CMCase e β -Glicosidase do cultivo do *Penicillium* 5 em FS utilizando dois diferentes substratos (C. Maj. e C. Max.) ficou evidente que a casca de macaxeira foi o melhor substrato quando comparado com a casca de maracujá, pois levou a produção máxima das duas celulases no menor tempo de cultivo, é certo que a otimização de parâmetros como pH e temperatura levam ao melhoramento da produção máxima da enzima para fins industriais;

6. Em comparação com algumas literaturas, as 5 linhagens de *Aspergillus niger* apresentaram ótimo potencial para a produção das enzimas CMCase e *A. niger* 1 para a produção de xilanase, enquanto que as 5 linhagens de *Penicillium* spp. cultivadas em C. Cup., C. Maj., C. Max., B. Cana e C. Uru. foram muito boas para a produção de CMCase e Pen. 5 e Pen 3 para produção de xilanase por FS.
7. Mesmo não sendo realizadas otimizações para o melhoramento da produção enzimática neste trabalho, foi possível constatar que este trabalho contribuiu para demonstrar o potencial dos fungos da floresta Amazônica quanto à produção enzimática celulolítica e xilanolítica pela biodegradação de resíduos agrícolas regionais e mesmo de resíduos de culturas não regionais. E por ser um dos poucos trabalhos em que se utilizaram diferentes resíduos regionais, sugere-se que o estudo de todas estas linhagens deve continuar, pois selecionar fungos com ótima produção dessas enzimas é um pré-requisito para a futura produção regional de bioetanol de segunda geração.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHARYA, P. B., ACHARYA, D. K., MODI, H. A. Optimization for cellulase production by *Aspergillus niger* using sawdust as substrate. *African Journal Biotechnology*, 7, 41479-4152, 2008.
- AGNIHOTRI, S.; DUTT, D.; TYAGI, C. H.; KUMAR, A.; UPADHYAYA, J. S. Production and biochemical characterization of a novel cellulasepoor alkali-thermo-tolerant xylanase from *Coprinellus disseminatus* SW-1 NTCC 1165. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 26, p. 1349-1359, 2010.
- BADHAN, A. K.; CHADHA, B. S.; KAUR, J.; SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 504-510, 2007.
- BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied microbiology and biotechnology*, Berlin, v. 56, p. 326-338, 2001.
- BEHKI, R. M. & KHAN, S. U.. Degradation of atrazine by *Pseudomonas*: N-dealkylation and dehalogenation of atrazine and its metabolites. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, v. 34, p. 746-749, 1986.
- BEHKI, R.; TOPP, E.; DICK, W.; GERMON, P. Metabolism of the herbicide atrazine by *Rhodococcus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, p. 19559-1959, 1993.
- BENNETT, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, v. 66, p. 101-7, 1998.
- BHAT, M. K.; BHA, T. S. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, v.18, p. 355-383, 2000.
- BORGES, D. G. **Preparação de derivados de β -glicosidases por imobilização em suportes sólidos derivatizados**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.
- BRINGHENTI, L.; CABELLO, C.; URBANO, L. H. Fermentação alcoólica de substrato amiláceo hidrolisado enriquecido com melão de cana. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 31(2), p. 429-432, 2007.
- BURKE, J. D.; MICHAEL, A. B.; WEINTRAUB, N.; CHARLOTTE, C.; HEWINS, R. Relationship between soil enzyme activities, nutrient cycling and soil fungal communities in a northern hardwood forest. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 43, n. 4, p. 795-803, 2011.
- CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. *Industrial Crops and Products*, 29, 642-647, 2009.

- CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid state fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, v. 103, p. 2196-2204, 2007.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras. Recomendações Silviculturais, potencialidades e uso da madeira.** EMBRAPA-CNPQ. Brasília. 640 p., 1994.
- CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A., MILAGRES, A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. *Química Nova*, v. 32, n.8, p. 2191-2195, 2009.
- CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. *Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, v. 42, p. 225-226, 1939.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA Jr., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, São Paulo, v. 33(1), p. 181-188, 2010.
- CHAUVE, M.; MATHIS, H.; HUC, D.; CASANAVE, D.; MONOT, F.; FERREIRA, N. L. Comparative kinetic analysis of two fungal β -glucosidases. *Biotechnology for Biofuels*, v 3, p. 1-8, 2010.
- COELHO, M. A. Z. Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais: Produção de Enzimas a Partir da Casca de Coco Verde, *B. CEPPA*, Curitiba, v. 19(1), p. 33-42, 2001.
- COWLING, E. B.; KIRK, T. K. Properties of cellulose and lignocellulose materials and substrats for enzymatic conversion processes. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, v. 6, p. 95-126, 1976.
- FADEL, M. Production physiology of cellulases and β -glucosidase enzymes of *Aspergillus niger* grown under solid state fermentation conditions. *Journal Biology Sciences*, v. 5, p. 401-411, 2000.
- FENGEL, D.; WEGENER, G.; Wood: **Chemistry, ultrastructure, reactions**, Walter de Gruyter: Berlin, 613 p., 1989.
- FERRAZ, A. **Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos.** In: ESPOSITO, E. e AZEVEDO, J.L. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.** Caxias do Sul. EDUCS, cap. 6, p. 215-242, 2004.
- FLACHNER, B.; RÉCZER, K. β -glucosidase production and characterization of some *Aspergillus* strains. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, Lausanne, v. 18 (3), p. 303-307, 2004.
- GHOSE, T. K. Measurement of Cellulase Activities. *Pure and Applied Chemistry*, v. 59, p. 257-268, 1987.
- GODFREY, T.; WEST, S. *Industrial Enzymology*. 2 ed. London: The Macmillan Press Ltda, 1996.

- GOMATHI, D.; MUTHULAKSHMI, C.; GURU KUMAR, D.; RAVIKUMAR, G.; KALAISELVI, M.; UMA, C. Production of Bio-Ethanol from Pretreated Agricultural byproduct using enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification. *Microbiology*. v. 81 (2), p. 201-207, 2012.
- GUTIERREZ, L. E. Produção de glicerol por linhagens de *Saccharomyces* durante fermentação alcoólica. *Anais ESALQ*, v. 48, p. 55-59, 1991.
- HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. *Bioresource Technology*, Essex, v. 58, p. 137-161, 1996.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 235-251, 2006.
- KIFFER, E. & MORELET, M. *Les Deutèromycetes – classification et clés d'identification générale*. INRA Editions, Paris, 306 p., 1997.
- KIM, E.; IRWIN, D. C.; WALKER, L. P.; WILSON, D. B. Factorial optimization of a six-cellulase mixture. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 58, p. 494-501, 1998.
- KIRK, T. K. & FARELL, R. L. Enzymatic "Combustion": The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*. v. 41, p. 465-505, 1987.
- KUHAD, R. C.; SINGH, A. Lignocellulose biotechnology: current and future prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 13, p. 151-172, 1993.
- LESCHINE, S. Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v. 49, p. 399-426, 1995.
- LEVANON, D. Roles of fungi and bacteria in the mineralization of pesticides atrazine, alachlor, malathion and carbofuran in soil. *Soil Biology Biochemistry*, v. 25(8), p. 1097-1105, 1993.
- LIU, Z.; CHI, Z.; WANG, L.; LI, J. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils, *Biochemical Engineering Journal*, v. 40, p. 445-451, 2008.
- LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H. V.; PRETORIUS, I. S.; Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*. v. 66 (3), p. 506-577, 2002.
- MANACHINI, P. L.; FORTINA, M. G.; PARINI, C. Purification and properties of endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnology Letters*, v. 9, p. 21-224. 1987.

- MARCONATO, M. S.; SANTINI, G. A. **Alternativas para a Geração de Energia Renovável no Brasil: a Opção pela Biomassa.** Julho-2008. Disponível em: <[www.ecodesenvolvimento.org.br/.../energias-alternativas...opcao-pela.../Energia Renovavel-no-Brasil.-A-opcao-pela-Biomassa.pdf](http://www.ecodesenvolvimento.org.br/.../energias-alternativas...opcao-pela.../Energia%20Renovavel-no-Brasil.-A-opcao-pela-Biomassa.pdf)>, Acessado em Abril de 2013.
- MARTIN, C.; MARCET, M.; ALMAZÁN, O.; JONSSON, L. J. Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 1767-1773, 2006.
- MARTINEZ, D.; BERKA, R. M.; HENRISSAT, B.; SALOHEIMO, M.; ARVAS, M.; BAKER, S. E.; CHAPMAN, J.; CHERTKOV, O.; COUTINHO, P. M.; CULLEN, D.; DANCHIN, E. G.; GRIGORIEV, I. V.; HARRIS, P.; JACKSON, M.; KUBICEK, C. P.; HAN, C. S.; HO, I.; LARRONDO, L. F.; DE LEON, A. L.; MAGNUSON, J. K.; MERINO, S.; MISRA, M.; NELSON, B.; PUTNAM, N.; ROBBERTSE, B.; SALAMOV, A. A.; SCHMOLL, M.; TERRY, A.; THAYER, N.; WESTERHOLM-PARVINEN, A.; SCHOCH, C. L.; YAO, J.; BARABOTE, R.; BARBOTE, R.; NELSON, M. A.; DETTER, C.; BRUCE, D.; KUSKE, C. R.; XIE, G.; RICHARDSON, P.; ROKHSAR, D. S.; LUCAS, S. M.; RUBIN, E. M.; DUNNCOLEMAN, N.; WARD, M.; BRETTIN, T. S. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnology*, v. 26 (5), p. 553-60, 2008.
- MATHEW, G. M.; SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Progress in research on fungal cellulases for lignocellulose degradation. *Journal of Science Industrial Resources*, v. 67, p. 898-907, 2008.
- MES-HARTREE, M.; DALE, B. E.; CRAIG, W. K. Comparison of steam and ammonia pretreatment for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 29, p. 462-468, 1988.
- MILLAR, A. Produção, **Purificação e Caracterização do Complexo Pectinolítico do Fungo *Aspergillus niveus*.** Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 2008.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MISHRA, C.; SEETA, R.; RAO, M. Production of xylanolytic enzymes in association with the cellulolytic activities of *Penicillium funiculosum*. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 7, p. 295-299, 1985.
- NAIR, S. G.; SINDHU, R.; SHANKAR, S. Fungal xylanase production under solid state and submerged fermentation conditions. *African journal of microbiological research*, v. 2, p. 82-86, 2008.
- NEIDLEMAN, S. I. Enzymes in the food industry: a backward glance. *Food Technology*. Chicago, v. 45, p. 88-91, 1991.

- NEIROTTI, E.; AZEVEDO, J. L. Técnica semiquantitativa de avaliação da produção de celulases em *Humicola* sp. *Revista de Microbiologia*, v. 19, p. 78-81, 1988.
- OLIVEIRA, L. F. DE; NASCIMENTO, M. R. F.; BORGES, S. V.; RIBEIRO, P. C. do N.; RUBACK, V. R. An alternative use for the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa) peel: preserve processing. *Food Science and Technology (Campinas)*. v. 22 (3), p. 259-262, 2002.
- 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*, v. 97, p. 862-867, 2006.
- OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. F. Preservação e prospecção de recursos microbianos. *Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da Unicamp*, v.7, p. 1-19, 2006.
- OSTROWSKI, A. P; VARGAS, F.; PIZZINATTO, L. E. ; ARAÚJO, J. H. B. de. Obtenção de álcool etílico a partir de amido de mandioca. *Mostra de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar (IMICTI)*, UFSC, p. 1-21, 2006.
- OUWEHAND, A. C.; SUOMALAINEN, T.; TÖLKKÖ, S. & SALMINEN, S. In vitro adhesion of propionic acid bacteria to human intestinal mucus. *Lait*, v. 82, P. 123-130, 2002.
- PALMA, M. B.; MILAGRES, A. M. F.; PRATA, A. M. R.; MANCILHA, I. M. Influence of aeration and agitation on the xylanase activity from *Penicillium janthinellum*. *Process Biochemistry*, London, v. 31, p. 141-145, 1996.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agroindustrial residues: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 69-80, 2000.
- PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. *Microbiologia: Conceitos e Aplicações*. São Paulo: MAKRON Books, v.1, p. 521, 1996.
- PÉREZ, S.; SAMAIN, D. Estructure and engineering of celluloses. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, v. 64, p. 25-116, 2011.
- PIZARRO, A. V. L.; PARK, E. Y. Lypase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. *Process Biochemistry*, London, v. 38, p. 1077-1082, 2003.
- QINNGHE, C.; XIAOYU, Y.; TIANGUI, N.; CHENG, J.; QIUGANG, M. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 1561-1566, 2004.
- RAJENDRAN, P.; GUNASEKHARAN, P.; LAKSHMANAN, M.. Cellulase activity of *Humicola fuscoatra*. *Indian Journal Microbiology*, v. 34, p. 289-295, 1994.
- RAVINDRAN, A.; ADAV, S. S.; SZE, S. K. Characterization of extracellular

- lignocellulolytic enzymes of *Coniochaeta* sp. during corn stover bioconversion. *Process Biochemistry*, v. 47(12), p. 2440-2448, 2012.
- REESE, E. T.; MAGUIRE, A.; PARRISH, F. W.; Production of β -Dxylopiranosidases by fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 19, p. 1065-1074, 1973.
- REX, L. Activation diagrams in enzyme catalysis. *Journal of Theoretical Biology*, v.24 (3), p. 247-265, 1969.
- RIBEIRO FILHO, N. M.; FLORENCIO, I. M.; ROCHA, A. S.; DANTAS, J. P.; FLORENTINO, E. R.; SILVA, F. L H da. Aproveitamento do caldo do sorgo sacarino para produção de aguardente. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 10 (1), p. 9-16, 2008.
- ROLAND, J. C.; REIS, D.; VIAN, B. Liquid crystal order and turbulence in the planar twist of the growing plant cell walls. *Tissue and Cell*, v. 24 (3), p. 335-345, 1992.
- SACHS, L. G. **Vinagre**. Fundação Faculdades “Luiz Menghel” Bandeirantes, 2001. Disponível em: <<http://dbt.ffalm.br/sachs/TPA/vinagre.pdf>>. Acesso em dezembro de 2013.
- SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, v.17, p. 185-194, 2009.
- SANDGREN, M.; SAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 89 (3), p. 246-291, 2005.
- SCHUSTER, A.; KUBICEK, C. P.; SCHMOLL, M. Dehydrogenase GRD1 represents a novel component of the cellulase regulon in *Trichoderma reesei* (Hypocrea jecorina). *Applied Environment Microbiology*, v.77 (3), p. 4553-63, 2011.
- SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. *Química Nova*, v. 32 (3), p. 661-671, 2009.
- SILVEIRA, V. D. Micologia. Structural characterisation of galactoglucomannan secreted by suspension-cultured cells of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Carbohydrate Research*, v. 303 (1), p. 79-92, 1997.
- SIMÕES, M. L. G.; TORNISIELO, S. M. T.; TAPIA, D. M. T. Screening of culture condition for xylanase production by filamentous fungi. *African Journal of Biotechnology*, v. 8, p. 6317-6326, 2009.
- SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 1, p. 541-549, 2010.
- SJÖSTRÖM, E. **Wood Chemistry. Fundamentals and Applications**, 2 Ed., Academic Press, San Diego, p. 293, 1993.

- SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, (2-3), p. 205-218, 2003.
- SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazônica*, Manaus, v. 34 (2), p. 185-195, 2004.
- SOUZA, M. A. C. & MUTTON, M. J. R. Flocculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum* em processos industriais de fermentação alcoólica avaliada por técnica fotométrica. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 28(4), p. 893-898, 2004.
- STEVENS, B. J. H., PAYNE, J. Cellulase and xylanase production by yeast of the genus *Trichosporon*. *Journal of Genetic Microbiology*, Oxford, v. 100, p. 381-393, 1977.
- SZENGYEL, Z.; ZACCHI, G.; VARGA, A.; RÉCZEY, K. Cellulase production of *Trichoderma reesei* Rut C 30 using steam-pretreated spruce. Hydrolytic potential of cellulases on different substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 84-86, p. 679-91, 2000.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.
- VALASKOVÁ, V.; BALDRIAN, P. Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Pictoporus betulinus*. *Research in Microbiology*, v. 157 (2), p.119-124, 2006.
- WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. N. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiological Reviews*. Oxford, v. 52, p. 305-317, 1988.
- WOOD, T. M.; SADDLER, J. N. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. *Methods in Enzymology*, v. 160, p. 3-11, 1988.
- WRIGHT, J. D.; WYMAN, C. E.; GROCHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose: Process evaluation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 17, p. 75-90, 1988.
- ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. *Biotechnology Bioenergy*, v. 88, p. 797-824, 2004.