



UNIVERSIDADE FEDERAL DO SUL E SUDESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
FACULDADE DE QUÍMICA

TAIANA SOUSA BEZERRA

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR FUNGO DO AMBIENTE AMAZÔNICO
E ESTUDO DAS MELHORES CONDIÇÕES REACIONAIS**

MARABÁ – PA

2022

TAIANA SOUSA BEZERRA

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR FUNGO DO AMBIENTE AMAZÔNICO
E ESTUDO DAS MELHORES CONDIÇÕES REACIONAIS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Química da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará - Unifesspa, como requisito parcial, necessário para a obtenção do Grau de Licenciatura em Química. Orientador: Prof. Dr Darlisson de Alexandria Santos

MARABÁ - PA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Setorial Campus do Taurarizinho da Unifesspa

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará
Biblioteca Setorial Campus do Taurarizinho

B574p Bezerra, Taiana Sousa
Produção de celulases por fungo do ambiente amazônico e estudo das melhores condições reacionais / Taiana Sousa Bezerra. — 2022.
46 f.: il. color.

Orientador (a): Darlisson de Alexandria Santos.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Instituto de Ciências Exatas, Faculdade de Química, Curso de Licenciatura Plena em Química, Marabá, 2022.

1. Química - Bioquímica. 2. Microbiologia do Solo - Amazônia. 3. Enzimas hidrolíticas.). I. Santos, Darlisson de Alexandria, orient. II. Título.

Elaborado por Adriana Barbosa da Costa – CRB-2/994

TAIANA SOUSA BEZERRA

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR FUNGO DO AMBIENTE AMAZÔNICO
E ESTUDO DAS MELHORES CONDIÇÕES REACIONAIS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Química da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará - Unifesspa, como requisito parcial, necessário para a obtenção do Grau de Licenciatura em Química. Orientador: Prof. Dr Darlisson de Alexandria Santos

Conceito: _____

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Darlisson de Alexandria Santos
Faculdade de Química – UNIFESSPA – Orientador

Prof. Dr. Sebastião da Cruz Silva
Faculdade de Química – UNIFESSPA – Examinador

Prof. Dr. Emerson Paulinho Boscheto
Faculdade de Química – UNIFESSPA – Examinador

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, à Deus, que fez com que meus objetivos fossem alcançados, durante todos os meus anos de estudos, permitido que eu tivesse determinação para não desanimar durante a realização deste trabalho.

Aos familiares, por todo o apoio e pela ajuda. Aos meus pais Francisco das Chagas Bezerra e Elinete Ângela de Sousa, as minhas irmãs Thamires, Thais e Tailana, são vocês, através da sua presença, seus sorrisos, seus abraços, suas palavras, apoio, compreensão, amor e amizade, que dão sentido à minha vida e a tornam mais prazerosa.

Aos meus colegas de turma, por compartilharem comigo tantos momentos e aprendizado, principalmente aos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui com Alciene Lima, Mayara Thays, Shirlene Brandão, e Fernanda Silva e em especial, Adriele Barbosa, Eduardo Amoury, Layane Evellin e José Airton, que me incentivaram e que certamente fizeram total diferença, obrigada por todo o companheirismo ao longo desses anos.

Agradeço especialmente a Franco Farias, obrigada pelo companheirismo, amizade e ajuda incondicional.

É com muita admiração que venho mostrar toda minha gratidão ao meu orientador Prof. Dr. Darlisson de Alexandria Santos, pela oportunidade de ser sua aluna de iniciação científica, me ensinou todas as técnicas utilizadas neste trabalho, sempre me motivando... Foi um período de muito aprendizado... Obrigada por não medir esforços para ajudar-me, por ser tão gentil e paciente, pela compreensão e pelos sábios conselhos sempre que precisei... Há! E as muitas risadas! Obrigada por tudo!

Sou grata ao corpo docente da Unifesspa, que sempre transmitiram seu saber com muito profissionalismo, me ajudaram muito no meu progresso acadêmico, e especialmente a Prof^a. Dr. Marilene Oliveira, e aos Profs. Drs. Sebastião Silva e Geiso Rafael, por todos os conselhos, pela ajuda e pela paciência com a qual guiaram o meu aprendizado.

À UNIFESSPA, ao CNPq e à FAPESP, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Diversos microrganismos, como bactérias e fungos, podem produzir enzimas lignocelulolíticas, sendo que os fungos são mais estudados sobretudo devido ao fato de possuir um maior código genético e, portanto, uma maior possibilidade de apresentarem os genes responsáveis pela produção das celulases. Dentre as espécies fúngicas reportadas em estudos recentes, existem aquelas isoladas do ambiente amazônico, o qual é uma enorme reserva de biodiversidade no mundo e possui muitos micro-ecossistemas e condições climáticas ideais para o crescimento fúngico. No entanto, a potencialidade dos microrganismos de ambiente amazônico na produção de celulases é pouco estudada. Assim, este trabalho se propõe ao isolamento e estudo de novas linhagens fúngicas do ambiente amazônico, as quais sejam capazes de produzir celulases com elevadas atividades hidrolíticas. Foi possível realizar o isolamento de oito linhagens fúngicas do solo da região arborizada do Campus II da Unifesspa. Das oito linhagens isoladas e purificadas, cinco delas foram avaliadas quanto a sua capacidade em produzir enzimas celulases. Observou-se que todas as linhagens fúngicas estudadas apresentaram atividade, dentre quais pode-se destacar as linhagens A1C2-03, A1C2-05 e A1C2-06, que apresentaram atividades celulolíticas semelhantes e bem promissoras para a continuação da pesquisa. Para continuação da pesquisa foi analisado o melhor tempo de cultivo para a produção de celulases pela linhagem fúngica A1C2-03, a qual foi cultivada em meio de cultura sólido rico em farelo de trigo. O crescimento fúngico foi realizado durante 10 dias, obtendo-se 3 dias como tempo ótimo. Logo em seguida foram analisados os principais parâmetros utilizados na reação de hidrólise enzimática da celulose: pH (2-7), temperatura (40-80 °C) e a estabilidade térmica das celulases da linhagem A1C2-03 (40 °C-80 °C). As condições reacionais ótimas determinadas foram: pH ótimo de 2,8 e temperatura ótima de 40 °C, além de determinar que a estabilidade térmica das celulases diminui significativamente com ao aumento da temperatura acima de 50 °C.

Palavras-chaves: Fungos amazônicos, Celulase, Enzimas hidrolíticas, Celulose.

ABSTRACT

Several microorganisms, such as bacteria and fungi, can produce lignocellulolytic enzymes, and fungi are more studied mainly due to the fact that they have a greater genetic code and, therefore, a greater possibility of presenting the genes responsible for the production of cellulases. Among the fungal species reported in recent studies, there are those isolated from the Amazon environment, which is a huge biodiversity reserve in the world and has many micro-ecosystems and ideal climatic conditions for fungal growth. However, the potential of microorganisms from the Amazonian environment in the production of cellulases is poorly studied. Thus, this work proposes the isolation and study of new fungal strains from the Amazonian environment, which are capable of producing cellulases with high hydrolytic activities. It was possible to isolate eight fungal strains from the soil of the wooded region of Campus II of Unifesspa. Of the eight strains isolated and purified, five of them were evaluated for their ability to produce cellulase enzymes. It was observed that all the fungal strains studied showed activity, among which we can highlight the strains A1C2-03, A1C2-05 and A1C2-06, which showed similar cellulolytic activities and very promising for the continuation of the research. For the continuation of the research, the best cultivation time for the production of cellulases by the fungal line A1C2-03, which was cultivated in solid culture medium rich in wheat bran, was analyzed. Fungal growth was carried out for 10 days, with 3 days being the optimal time. Soon after, the main parameters used in the enzymatic hydrolysis reaction of cellulose were analyzed: pH (2-7), temperature (40-80 °C) and the thermal stability of cellulases of the A1C2-03 lineage (40 °C-80 °C). The optimal reaction conditions determined were: optimal pH of 2.8 and optimal temperature of 40 °C, in addition to determining that the thermal stability of cellulases significantly decreases with increasing temperature above 50 °C.

Keywords: *Amazonian fungi, Cellulase, Hydrolytic enzymes, Cellulose.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica	17
Figura 2	Açúcares que compõem as unidades de hemicelulose	18
Figura 3	Representação estrutural molecular da fração celulósica de materiais lignocelulósicos	19
Figura 4	Ligações intra e intermoleculares das moléculas de glicose	20
Figura 5	Representação da função enzimática durante o processo de hidrólise da celulose	22
Figura 6	Possível mecanismo de hidrolise enzimatica da celulose	22
Figura 7	Processo da reação de hidrólise enzimática da celulose.	32
Figura 8	Fotos das linhagens fungicas isoladas do solo do Campus II da Unifesspa.	33
Figura 9	Fotos da linhagem fúngica A1C2-03 em meio de cultura contendo farelo de trigo.	35
Figura 10	Linhagem fúngica A1C2-03, o valor de pH utilizado e os tampões utilizados.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Microrganismos produtores de celulase	25
Tabela 2	Lista de reagentes utilizados no trabalho	27
Tabela 3	Linhagens fúngicas isoladas no Campus II da Unifesspa e descrição visual dos mesmos	33
Tabela 4	Atividades celulolíticas determinadas para linhagens fúngicas isoladas do solo do Campus II da Unifesspa	34
Tabela 5	Valores de pH dos tampões utilizados no trabalho.	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Atividade enzimática celulolítica (U/mL de extrato enzimático) determinada de acordo com o período de cultivo para a linhagem A1C2-03 isolada do solo do Campus II da Unifesspa	35
Gráfico 2	pH ótimo para a realização da hidrólise enzimática da celulose usando celulasas da linhagem A1C2-03	37
Gráfico 3	Temperatura ótima para a realização da hidrólise enzimática da celulose usando celulasas da linhagem A1C2-03	38
Gráfico 4	Estabilidade térmica ótima para a realização da hidrólise enzimática da celulose usando celulasas da linhagem A1C2-03	39

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS, SÍMBOLOS

min	Minuto
°C	Grau Centígrado
%	Porcentagem
mL	Mililitro
pH	Potencial Hidrogeniônico
T	Temperatura
V	Volume
mg	Miligrama
g	Gramma
2G	Segunda Geração
l	Litro
DNS	Ácido 3,5- dinitrosalicílico
SSF	Fermentação em Estado Sólido
FPase	Atividade Celulolítica Total
M	Molaridade
U	Unidade de atividade
cm	Centímetro
nm	Nanômetro
dL	Decilitro
μmol	Micromol
CMCase	Carboximetilcelulase
FSM	Fermentação Submersa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo Geral	16
2.2. Objetivos Específicos	16
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
3.1. O complexo celulásico – Mecanismos de ação e aplicação	17
3.2. Liginina.....	17
3.3. Hemicelulose	18
3.4. Celulose	19
3.5. Celulases.....	21
3.6. Produção de celulases por fungos.....	23
3.7. Fungos amazônicos produtores de celulases	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1. Reagentes.....	27
4.2. Equipamentos e materiais de laboratório.....	27
4.2.1. Equipamentos	28
4.2.2. Materiais de laboratório.....	28
4.3. Coleta das amostras de solo e isolamento dos microrganismos	29
4.4. Cultivo dos fungos.....	29
4.4.1. Meio de cultura contendo extrato de malte	29
4.4.2. Preparo da solução de esporos para inoculo das linhagens fúngicas.....	30
4.5. Fermentação em estado sólido.....	30
4.6. Extração do caldo enzimático contendo as celulases	30
4.7. Preparação do reagente DNS.....	31
4.7.1. Determinação da atividade de enzimas celulolíticas	31
4.7.2. Determinação da atividade de celulases totais (FPase)	31
4.7.3. Construção da curva analítica para a quantificação dos açúcares redutores	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1. Isolamento e purificação de linhagens fúngicas do solo do Campus II.....	32
5.2. Determinação da atividade celulolítica das linhagens isoladas	34
5.3. Estudo do melhor período de cultivo do fungo A1C2-03 frente à sua atividade	34
5.4. Determinação das condições reacionais ótimas das celulases produzidas	36

5.4.1.	pH do tampão	36
5.4.2.	Temperatura.....	38
5.4.3.	Estabilidade Térmica	39
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. INTRODUÇÃO

A busca por novas linhagens fúngicas produtoras de enzimas celulolíticas é uma grande demanda mundial devido a necessidade de encontrar alternativas aos combustíveis fósseis, os quais são responsáveis por grande parte da poluição atmosférica. Esta busca torna-se ainda mais plausível quando as alternativas encontradas podem solucionar o maior empecilho do uso de combustíveis de fontes renováveis: a competição com a produção de alimentos. Esta competição existe devido ao fato de que o etanol produzido atualmente usa, na maioria dos casos, matéria-prima que também é usada como alimento.

Nos EUA usa-se o milho como matéria-prima e no Brasil usa-se cana-de-açúcar, que é também usada para a produção de sacarose. Assim, a descoberta de celulasas capazes de hidrolisar a celulose com alto rendimento e que sejam produzidas com baixo custo se tornaria uma importante saída para solucionar alguns dos principais problemas no setor energético. ^[1]

Dentre as espécies fúngicas capazes de produzir celulasas, reportadas em estudos recentes, existem aquelas isoladas do ambiente amazônico, o qual é uma enorme reserva de biodiversidade no mundo e possui muitos micro-ecossistemas e condições climáticas ideais para o crescimento fúngico. ^[2]

Uma das espécies fúngicas de ambiente amazônico relatadas como produtoras de celulase é o *Trichoderma harzianum*, com duas linhagens desta espécie sendo reportadas em trabalhos diferentes atestando tal capacidade. O primeiro trabalho, reportado por Delabona et al. (2012), mostrou que as celulasas produzidas pela linhagem *T. harzianum* P49P11 possuem uma grande atividade frente ao bagaço de cana-de-açúcar tratado com explosão a vapor. ^[3]

O outro trabalho foi realizado por Souza et al. (2018), no qual usou a linhagem *T. harzianum* 422 obtendo-se também uma boa atividade das celulasas frente ao bagaço de cana-de-açúcar, este tratado com moinho de bolas e tratamento hidrotérmico. ^[4]

Espécies fúngicas do gênero *Aspergillus* também já foram relatadas como isoladas do ambiente amazônico e com capacidade de produzir celulasas com boas atividades enzimáticas. São elas *A. niger* P47C3 e *A. fumigatus* P40M2, que produziram celulasas usando diferentes substratos para cultivo (farelo de soja, farelo de trigo e farelo de trigo misturado com bagaço de cana-de-açúcar, demonstrando que diversos materiais podem ser usados como substratos indutores da produção de celulasas. ^[5]

A potencialidade dos microrganismos de ambiente amazônico na produção de celulasas

é enorme, embora seja pouco estudada. Um exemplo é o trabalho descrito por Toyama et al. (2018) que descreve a descoberta de uma β -glicosidase, uma das enzimas do complexo celulásico, através de uma análise metagenômica da água do lago Poraquê. A descoberta do gene de uma celulase presente em microrganismos de ambiente aquático mostra que ainda há muito a se conhecer acerca da microbiota amazônica e seu potencial biotecnológico. ^[6]

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Bioprospecção de fungos do ambiente amazônico capazes de produzir enzimas lignocelulolíticas visando a produção de celulases e sua aplicação no reaproveitamento de biomassa vegetal.

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar o isolamento de linhagens na região de Marabá;
- Avaliar o potencial das linhagens como produtoras de celulases;
- Avaliar a influência da composição do meio de cultura na produção de celulases pelas linhagens com maior atividade celulolítica;
- Produzir celulases a partir do cultivo do fungo em meio de cultura rico em lignocelulose;
- Estudar as condições reacionais ótimas para a atividade hidrolítica das celulases.

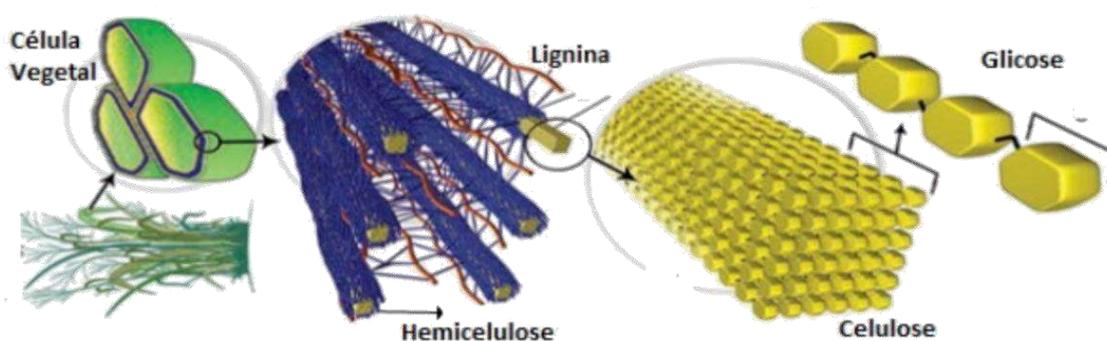
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. O Complexo Celulásico – Mecanismos de Ação e Aplicação

Os materiais lignocelulósicos são descritos como a maior biomassa não alimentar e um dos recursos renováveis mais abundantes do planeta, essas biomassas vegetais são constituídas por três principais frações poliméricas: lignina, hemicelulose e celulose, que são unidas entre si por ligações covalentes glicosídicas. Essas frações principais são responsáveis por 98 % de toda a matéria seca dos materiais. ^[7]

A Figura 1 tem representada esta biomassa vegetal que é formada por uma complexa estrutura interligada pela junção dos monômeros de glicose, que formam a celulose, envoltos pela hemicelulose e conectados pela lignina.

Figura 1: Estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica.



Fonte: Adaptado de WYMAN, & YANG, 2009. ^[8]

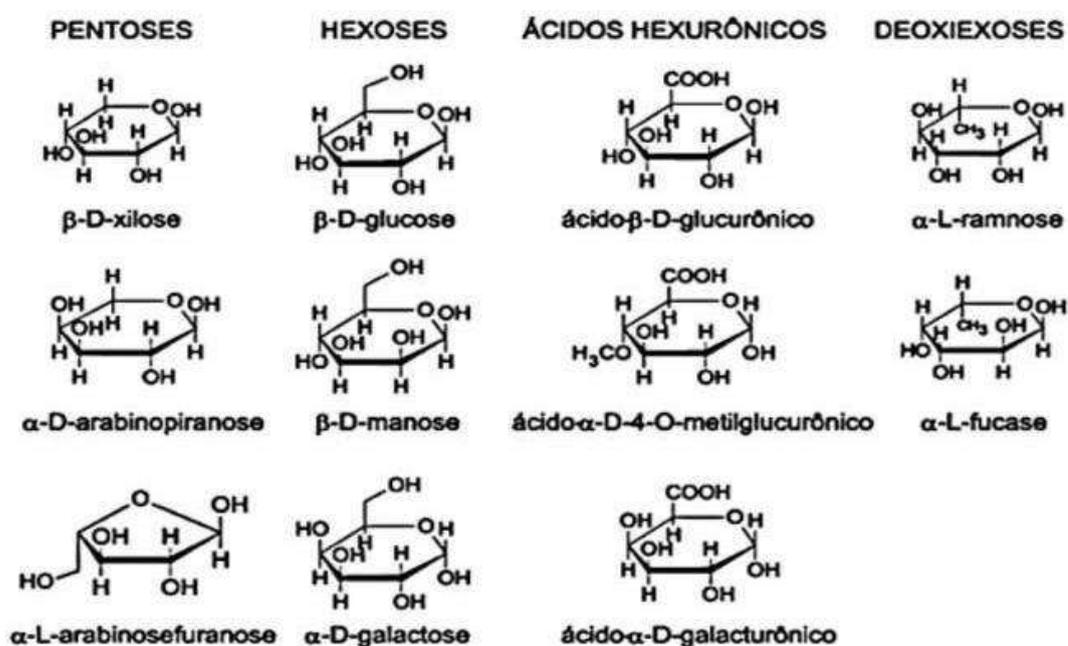
3.2. Lignina

A lignina é o segundo biopolímero mais abundante nos materiais lignocelulósicos, podendo representar até 25 % de toda a biomassa. Possui uma estrutura complexa com um sistema heterogêneo e ramificado, formada pela polimerização radicalar de unidades de fenilpropanóides (álcool p-cumarílico, álcool coniferílico, álcool sinapílico, coniferaldeído e aceto de sinapila), os quais não podem ser usados como uma matéria-prima para a produção de etanol por meio de fermentação microbiana, e afeta de forma significativa o desempenho técnico econômico da produção de álcool combustível 2G. ^[9]

3.3. Hemicelulose

As hemiceluloses são polissacarídeos heterogêneos, sendo o segundo maior hidrato de carbono em biomassa lignocelulósica, constituído principalmente de xilana, presente na parede celular de células vegetais. Quimicamente, as hemiceluloses são formadas por vários resíduos de açúcares como D-xilose, D-manose, D-arabinose e D-galactose, dentre outros, e por seus ácidos urônicos ligados entre si através de ligações β -1,4-glicosídicas (Figura 2). Hemiceluloses são ramificadas na natureza através das suas cadeias laterais, criando uma estrutura amorfa diferente da estrutura linear e cristalina da celulose. Portanto, por serem intimamente associadas com a lignina e a celulose, as hemiceluloses têm sua conformação estrutural alterada de acordo com o local em que são encontradas. Sendo assim, a hemicelulose ajuda a estabilizar a parede celular através de pontes de hidrogênio com a celulose, formadas na etapa anterior a lignificação. Além disso, ela é ligada por ligações covalentes à lignina, ou seja, a ligação entre hemicelulose e lignina são mais fortes e consistentes que hemicelulose com celulose. ^{[10][11][12]}

Figura 2: Açúcares que compõem as unidades de hemicelulose.



Fonte: Adaptado de HUEBRA, 2016. ^[13]

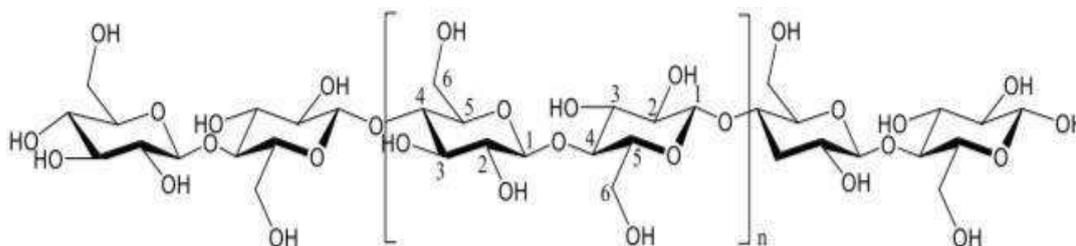
3.4. Celulose

O reaproveitamento de biomassa, sobretudo dos materiais lignocelulósicos, tem sido alvo de diversas pesquisas. Grande parte destas pesquisas visam o desenvolvimento de biotecnologia através do reaproveitamento da celulose – principal componente dos materiais lignocelulósicos – através da hidrólise para a produção de açúcares fermentescíveis e posterior produção do bioetanol.

A celulose é o polímero mais abundante na biosfera e o principal constituinte das biomassas. Corresponde de um terço a metade do tecido das plantas e é constantemente sintetizado pela fotossíntese. É um homopolissacarídeo não ramificado formado por unidades monoméricas de celobiose, a qual é formada pela junção de duas unidades de D-glicose unidas através de ligações glicosídicas, como mostra a Figura 3. Os anéis de glicose adotam uma conformação mais estável na forma de cadeira com os grupos hidroxila na posição equatorial.

[14] [15] [16]

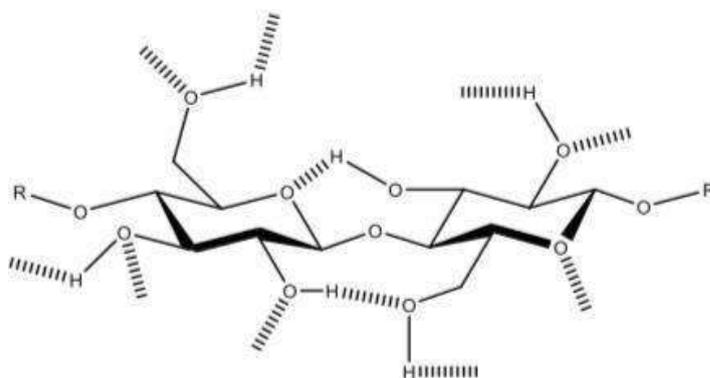
Figura 3: Representação estrutural molecular da fração celulósica de materiais lignocelulósicos.



Fonte: Adaptado de BUANAFINA & COSGROVE, 2014. [17]

A resistência do substrato a hidrólise será definida pelo grau de polimerização e pelo índice de cristalinidade entre cada fibra de celulose, estabilizada por inúmeras pontes de hidrogênio, intra e intermolecular. As múltiplas ligações de hidrogênio (Figura 4) ligam as 36 unidades de glucanas (polissacarídeo composto por monômeros de D-glicose), e cada uma dessas unidades de glucana pode ser composta de até 15000 unidades de D-glicose unidas por ligações β -1,4-glicosídicas, fazendo-as impenetráveis à água e, portanto, insolúveis, originando fibras compactas e que constituem a parede celular dos vegetais. [18] [19]

Figura 4: Ligações intra e intermoleculares das moléculas de glicose.



Fonte: Adaptado de DONINI et al., 2010. [20]

O tamanho e a forma da parede celular, assim como a composição química dos materiais lignocelulósicos varia de espécie para espécie. De maneira geral, a celulose está presente em maior quantidade, seguida da hemicelulose e, por fim, da lignina. [21]

A composição química de resíduos lignocelulósicos é interessante ao ponto de vista biotecnológico, pois geralmente esses resíduos são compostos de 20 % a 60 % de celulose, 20 % a 30 % de hemicelulose e 15 % a 30 % de lignina. [22]

O Brasil, por apresentar uma economia fortemente ligada à agricultura, gera grandes quantidades de resíduos da agroindústria, e especial atenção vem sendo dada para o reaproveitamento desses subprodutos, contribuindo para a minimização de problemas ambientais e energéticos. [23]

As fontes lignocelulósicas agroindustriais são consideradas uma alternativa promissora no qual o objetivo é o uso de matérias-primas de baixo custo. Além disso, devido à sua estrutura específica, a biomassa lignocelulósica é capaz de ser empregada para obter um amplo espectro de produtos químicos. Na literatura encontra-se um leque de aplicações destas biomassas renováveis na produção de bioetanol, ácidos orgânicos, proteínas, enzimas e outros. Subprodutos lignocelulósicos da moagem do grão de trigo, resíduos do milho, do arroz e outros, que, como mencionado, podem ser utilizados como substratos para produção de enzimas e outros produtos da fermentação. [24]

3.5. Celulases

As celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre a celulose, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais, a glicose é o que desperta maior interesse industrial devido à possibilidade de sua conversão em etanol. [25]

As celulases produzidas por fungos e bactérias apresentam um alto custo de produção, devido aos substratos formados e à baixa taxa de crescimento. É importante destacar que a maior parte das pesquisas realizadas sobre a produção de celulases têm-se centrado em fungos. [26]

A conversão enzimática da celulose em glicose é uma tarefa árdua, devido à natureza física do substrato, que é composta principalmente de fibras cristalinas insolúveis, chamadas de microfibrilas, nas quais as pontes de hidrogênio mantêm as moléculas unidas. Essas fibras são embebidas em uma matriz de hemicelulose e lignina, a qual reduz a acessibilidade às enzimas celulolíticas. [27] [28] [29]

A hidrólise enzimática é realizada por celulases, as quais possuem alta especificidade de substrato, sendo que as condições reacionais são mais brandas (pH 4,8 e temperatura entre 45-50 °C) que as condições de hidrólise com ácidos inorgânicos (hidrólise ácida). Devido às condições serem brandas, uma menor quantidade de subprodutos é liberada. A maior limitação dessa metodologia é a necessidade de usar grandes quantidades de enzimas, o que encarece muito o processo enzimático. [30]

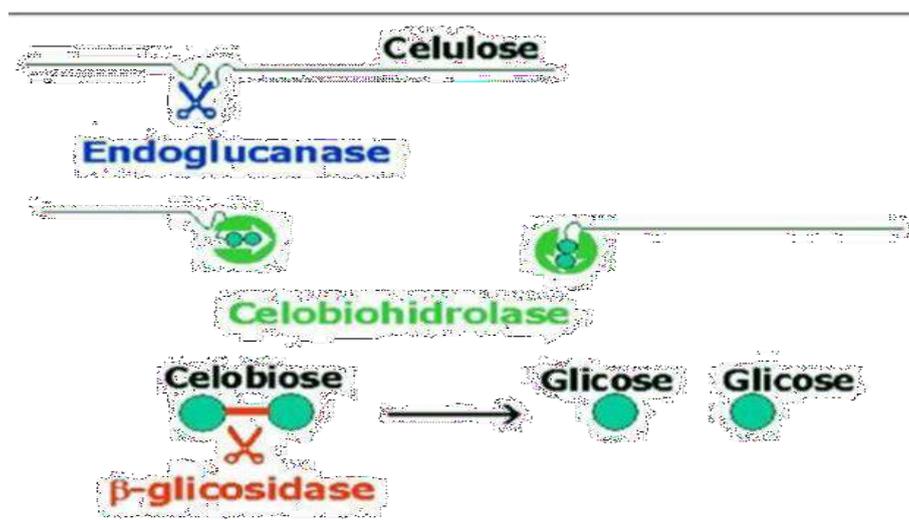
A hidrólise enzimática das pontes glicosídicas ocorre por meio da catálise ácida geral, em que são necessários dois aminoácidos críticos: um doador de prótons e um nucleófilo/base. A catálise ácida é, usualmente, promovida pelos resíduos aspartato e/ou glutamato. Nessa catálise ocorre uma reação de remoção simples ou dupla, resultando em inversão ou retenção, respectivamente, da configuração anomérica do átomo de carbono do glicosídeo hidrolisado. [31] [32]

A classificação das celulases, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, as divide em três grandes grupos: a) As **endo 1,4-β-D-glucanases** que hidrolisam a cadeia celulósica internamente de maneira aleatória; b) As **exo-1,4-β-D-glucanases** que hidrolisam a cadeia celulósica a partir de suas extremidades liberando celobioses; e c) As **1,4-β-D-glicosidases** que promovem a hidrólise da celobiose em glicose e podem também clivar unidades glicosídicas a partir de celuloligossacarídeos. As enzimas do complexo celulásico

atuam em conjunto e apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais. Tal efeito é conhecido como sinergia.

A Figura 5 tem representada a função de cada uma dessas enzimas durante o processo de hidrólise da celulose até a liberação dos monômeros de glicose.

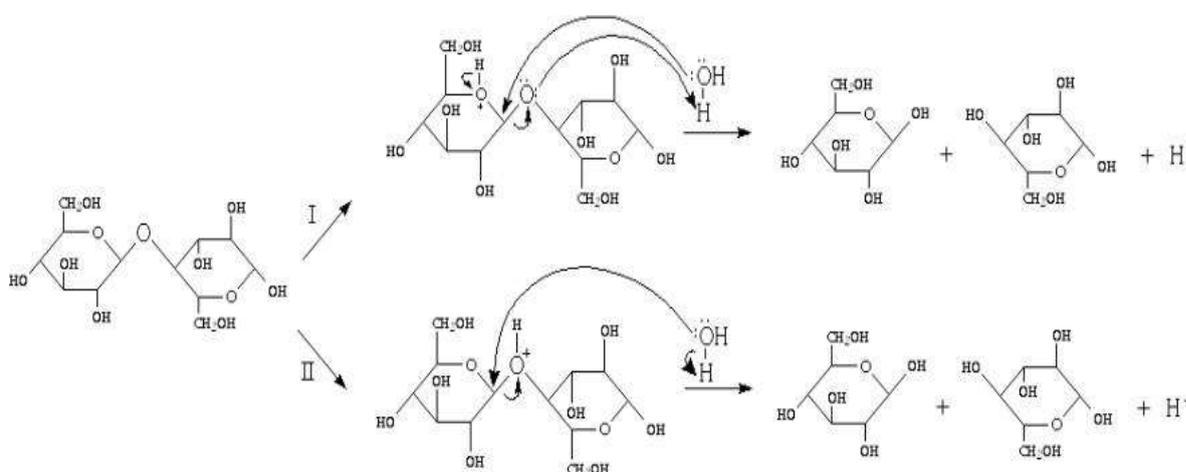
Figura 5: Representação da função enzimática durante o processo de hidrólise da celulose.



Fonte: Adaptado de OGEDA & PETRI, 2010. [33]

Observando esse potencial natural dos microrganismos, diversos estudos têm sido realizados com o intuito de possibilitar a produção destas celulasas em larga escala e viabilizar a obtenção de compostos químicos renováveis advindos de resíduos lignocelulósicos. [34]

Figura 6: Possível Mecanismo da Hidrólise Enzimática da Celulose



Fonte Adaptado de PAULA, 2009. [35]

3.6. Produção de Celulases por Fungos

Diversos microrganismos, como bactérias e fungos, podem produzir enzimas lignocelulolíticas, sendo que os gêneros fúngicos são os mais explorados comercialmente devido à capacidade de secretarem altos níveis de proteína e também, devido à possibilidade de suas enzimas atuarem naturalmente de maneira bastante efetiva na hidrólise da biomassa. [36]

Os fungos que decompõem substâncias celulósicas ocorrem no solo, colonizando vegetais, suas raízes e resíduos, com importante função de reciclagem de nutrientes. A atividade fúngica depende do conteúdo de matéria orgânica no solo, a qual determina, sobremaneira, a ocorrência e a distribuição desses organismos. [37]

A determinação de condições ideais para os processos de produção de enzimas significa, obviamente, aumento de rentabilidade e aumento da atividade enzimática dos extratos resultantes. Dessa forma, as condições de cultivo dos microrganismos, como pH, temperatura, tempo de cultivo, teor de umidade, tipo de substrato e tipo de fermentação (sendo fermentação submersa ou em estado sólido), devem ser levadas em consideração.

O pH do meio afeta a taxa de crescimento dos microrganismos, as variações de pH podem causar importantes alterações na constituição microbiana. Para que o pH se mantenha num valor ótimo para atividade biológica e produção enzimática, é essencial que exista uma suficiente capacidade tampão que permita neutralizar possíveis alterações durante o crescimento. [38]

De acordo com Pinto (2003), a temperatura influencia diretamente a germinação dos esporos, crescimento e formação de produtos. Durante o cultivo o calor deve ser dissipado para não ocorrer o aumento da temperatura e com isso prejudicar o processo. Vale lembrar que, de acordo com as características morfológicas e metabólicas destes microrganismos, a temperatura ideal de cultivo pode variar significativamente de uma linhagem para outra. [39]

Outro fator importante é o tempo de cultivo, que tem por objetivo obter-se o melhor tempo para se atingir uma maior produção de celulases ativas. Quanto menor o tempo necessário para atingir a produtividade máxima da enzima, melhor, pois também reduzirá o custo da produção em larga escala.

O teor de umidade do substrato é um parâmetro intimamente relacionado, pois é usado para difundir gases inibidores, solutos e metabólitos. A quantidade de água presente na biomassa depende do tipo de material lignocelulósico utilizado, da biomolécula alvo e do tipo de microrganismo. Quando a umidade é elevada resulta na diminuição da porosidade,

problemas nas trocas gasosas e contaminação cruzada. Por outro lado, baixos teores de umidade ocasionam problemas no crescimento dos microrganismos. O teor de umidade para o cultivo do microrganismo depende da porosidade do substrato, ou seja, o quanto ele consegue reter água. Por isso a umidade tem que estar relacionada com a umidade da biomassa para poder promover o crescimento do agente fermentador. Existe um valor de umidade para cada microrganismo associado ao substrato que não necessariamente será o melhor valor para a excreção do produto de interesse. [40] [41]

A fermentação em estado sólido (FES) também chamada de fermentação semissólida, ou fermentação em meio semissólido, visa o crescimento de microrganismos em meio sólido. Os substratos utilizados na FES são de origem agroindustrial como: grãos de arroz, raízes de mandioca, farelo de soja, farelo de arroz, farelo de trigo entre outros. A água existente nesses sistemas encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas. A umidade necessária para o crescimento microbiano encontra-se adsorvida, ou agregada ao meio. [40] [42] [43]

A FES é uma das técnicas mais utilizadas pela comunidade científica devido à sua simplicidade, ao baixo custo, e à alta produtividade e elevada concentração dos produtos. O principal fator limitante dessa técnica, refere-se à dificuldade de vários grupos microbianos em crescer sob baixos teores de umidade, o que acaba por restringir o processo ao uso de fungos filamentosos, que se adaptam bem a essa condição, ao se considerar a possibilidade de reprodução das condições de crescimento natural desses organismos. Na fermentação submersa (FSM) a água chega a constituir cerca de 90 a 99% da massa total do material a ser fermentado. [43] [44]

Esse tipo de fermentação apresenta como principais vantagens, o fácil acompanhamento da formação do produto e consumo do substrato e o controle dos parâmetros fermentativos como pH, temperatura, oxigenação e esterilidade. Como principais desvantagens, têm-se o grande volume de resíduos gerados e a dificuldade de separação produto / substrato. Embora a FSM apresente algumas desvantagens em relação à FES, processos envolvendo limitações no teor de água livre no sistema são evitados quando se objetiva a geração de muitos produtos, especialmente em escalas maiores, onde são requeridos biorreatores. [42] [45] [46]

Um estudo de De Vries e Visser (2001), revisou estudos de enzimas de *Aspergillus* envolvidas na degradação de polissacarídeos da parede celular de plantas. e concluíram que a enzima produzida por esse fungo é uma proteína com alto teor de glicosilato. [47]

Tao et al (2010) estudaram a hidrólise da polpa de cana-de-açúcar pela linhagem do

fungo filamentosos *Aspergillus glaucus* XC9, que posteriormente resultou em endoglucanase purificada. Há também 21 estudos em que dois fungos filamentosos foram usados simultaneamente para a produção de enzimas como é o caso de trabalhos desenvolvidos por Gutierrez-Correa e Tengerdy (1997) e Deshpande e colaboradores (2008) que utilizando cultura mista de fungos do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus* para a produção de celulase, apresentaram produções maiores dessas enzimas usando fungos filamentosos separadamente. [48] [49] [50]

Os fungos filamentosos são os mais utilizados em processos industriais. Suas propriedades fisiológicas, enzimáticas e bioquímicas possibilitam seu crescimento em substratos sólidos e sua conversão biológica, o que aumenta a capacidade de hidrólise desses microrganismos. [51]

A Tabela 1 apresenta mais exemplos de fungos produtores de celulase.

Tabela 1: Fungos com alto potencial na produção de celulases.

Microrganismos	Espécie	Referência da Literatura	
Fungos	<i>Aspergillus terreus</i> UniMAP AA-6	Gunny et al. (2015)	[52]
	<i>Aspergillus flavus</i> BS1	Sajith et al. (2014)	[53]
	<i>Acremonium cellulolyticus</i>	FAO (1997)	[54]
	<i>Trichoderma asperellum</i> RCK2011 (Wild)	Raghuwanshi et al. (2014)	[55]
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	FAO (1997)	[54]
	<i>Melanoporia</i> sp. CCT 7736	De Oliveira et al. (2016)	[56]

3.7. Fungos Amazônicos Produtores de Celulases

Como se sabe, o Brasil se destaca em termos de biodiversidade e, portanto, há um amplo campo a explorar na busca de microrganismos que possuem as características desejadas para tal aplicação. A região amazônica, por sua vez, é um reservatório de espécies com alto potencial de uso, principalmente devido às suas condições edafoclimáticas que favorecem a existência de microrganismos que decompõem e degradam a vegetação rasteira da floresta.

O solo da floresta amazônica é coberto por uma fina camada de serrapilheira, a qual é protegida pelas folhas e outras estruturas vegetais que caem das árvores ao longo do ano. Esse material que serve de alimento a muitos insetos, entra em rápida decomposição na atmosfera úmida. A biomassa rasteira resultante desse processo fornece as condições necessárias para o crescimento de várias espécies de fungos.

Portanto, o Bioma Amazônico representa uma fonte em potencial de fungos celulolíticos devido às suas condições edafoclimáticas peculiares que propiciam a constante degradação da biomassa rasteira da floresta. Além disso, esse bioma tem sido não muito explorado para tal finalidade e poucas pesquisas foram realizadas nesta região. ^[57]

Com o avanço dos estudos na área biotecnológica, os organismos fúngicos do ambiente amazônico tornaram-se de grande interesse e vêm contribuindo com processos de importância industrial já estabelecidos e em processos ainda em desenvolvimento. ^[58]

De acordo com estudos recentes, as espécies fúngicas capazes de produzir celulases incluem aquelas isoladas do ambiente amazônico, que é uma enorme reserva de biodiversidade no mundo e possui muitos micro-ecossistemas e condições climáticas ideais para o crescimento de fungos. Uma das espécies fúngicas do ambiente amazônico que tem sido relatada como produtor de celulase é *Trichoderma harzianum*, com duas linhagens desta espécie relatadas em diferentes trabalhos que atestam essa capacidade. ^[59]

O primeiro trabalho, reportado por Delabona et al. (2012), mostrou que as celulases produzidas pela linhagem *T. harzianum* P49P11 possuem uma grande atividade frente ao bagaço de cana-de-açúcar tratado com explosão a vapor. O outro trabalho foi realizado por Souza et al. (2018), no qual usou a linhagem *T. harzianum* 422 obtendo-se também uma boa atividade das celulases frente ao bagaço de cana-de-açúcar, este tratado com moinho de bolas e tratamento hidrotérmico. ^{[60] [61]}

Também tem sido relatado que espécies de fungos do gênero *Aspergillus* são isoladas do ambiente amazônico e com capacidade de produzir celulases com boas atividades enzimáticas. Estes são o *A. niger* P47C3 e o *A. niger. fumigatus* P40M2, que produziram celulases usando diferentes substratos para cultivo (farelo de soja, farelo de trigo e farelo de trigo misturado com bagaço de cana-de-açúcar, demonstrando que diversos materiais podem ser usados como substratos indutores da produção de celulases. ^[62]

O potencial de produção de micróbios de celulase no ambiente amazônico é enorme, mas poucas pesquisas têm sido feitas. Um exemplo é o trabalho descrito por Toyama et al. (2018) que descreve a descoberta de uma β -glicosidase, uma das enzimas do complexo celulásico, através de uma análise metagenômica da água do lago Poraquê. ^[63]

A descoberta do gene de uma celulase presente em microrganismos de ambiente aquático mostra que ainda há muito a se conhecer acerca da microbiota amazônica e seu potencial biotecnológico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes

Os reagentes usados para o desenvolvimento deste trabalho foram comprados de diversos fabricantes e estão listados na Tabela 2 por ordem alfabética.

Tabela 2. Lista de Reagentes Utilizados no Trabalho

Nome	Fórmula	Fabricante
Acetato de Sódio	$\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Synth
Ácido 3,5 Dinitrosalicílico	$\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$	Sigma
Ácido acético glacial	(CH_3COOH)	Chemco
Ácido Cítrico anidro	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	Neon
Ágar	-	Kasvi
Citrato de Sódio	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	Synth
Cloreto de Cálcio Diidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Synth
Cloreto de Cobalto	$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	Spectrum
Cloreto de Sódio	NaCl	Synth
D – Glicose Anidra (Dextrose)	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	Synth
Extrato de Malte	-	Acumedia
Farelo de Trigo	-	Mercado Local
Fosfato de potássio monobásico	KH_2PO_4	Synth
Hidróxido de Sódio em Micro	NaOH	Neon
Peptona	-	Acumedia
Sulfato de Amônia	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Synth
Sulfato de Ferro (II)	$\text{FeSO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Synth
Sulfato de Magnésio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Synth
Sulfato de Zinco	ZnSO_4	Synth
Tartarato duplo de sódio e	$(\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O})$	Neon
Ureia	$\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$	Synth
Antibiótico		

4.2. Equipamentos e Materiais de Laboratório

Diversos equipamentos e materiais de laboratório foram utilizados durante os experimentos, os quais foram todos realizados nos laboratórios de química da Faculdade de Química da Unifesspa. São equipamentos e materiais de uso coletivo por todos os usuários e são listados a seguir.

4.2.1. Equipamentos

- Autoclave (PRISMATEC CS)
- Balança analítica
- Bomba a vácuo
- Capela de Fluxo Laminar
- Chapa de Aquecedora
- Erlenmeyer
- Espectrofotômetro
- Geladeira
- Incubadora (B.O.D)
- Microscópio
- PHmetro (QUIMIS Q400AS)
- Soluções para calibração do PHmetro (6, 86; 4,91; 9,18)
- Vortex (BIOMIXER QL 901)

4.2.2. Materiais de Laboratório

- Água destilada
- Alça de repique
- Algodão
- Barbante
- Béquer
- Bico de Bunsen
- Conta gotas
- Erlenmeyer
- Espátula
- Funil a vácuo
- Funil analítico
- Garrafa de vidro
- Gazes
- Jornal
- Kitassato
- Luvas
- Papel alumínio
- Parafilme
- Pipeta volumétrica de 100 Pico litro, 10 mL e 1 mL
- Placa de petri
- Proveta
- Shampoo neutro
- Suporte para tubos
- Tubos Falcon
- Tubos de ensaio
- Tubos para espectrofotômetro

4.3. Coleta das Amostras de Solo e Isolamento dos Microrganismos

As coletas foram realizadas em diferentes pontos da UNIFESSPA campus II, a amostra I foi coletada em área em decomposição, já a amostra II foi coletada em solo com um pouco de folhas em decomposição formando uma camada muito fina sobre o solo. As amostras foram armazenadas em frascos estéreis, posteriormente fez-se o isolamento das colônias.

O isolamento e quantificação dos fungos foram realizados através do método de diluição seriada. Esta consiste da diluição progressiva de uma solução de: para as amostras do grupo I foram duplicadas, enquanto as amostras do grupo II foram triplicadas cada amostra de solo coletada.

Foram utilizados 9 gramas de solo suspensos em 90 mL de solução salina a 9% (9 g de NaCl em 1 L de água destilada e esterilizada). A solução obtida foi agitada no Vortex (BIOMIXER) por 5 min, e diluída em água esterilizada, dispoendo posteriormente alíquotas de 1 mL da diluição em placas de Petri esterilizadas, preparadas com meio de cultura ágar (2%) – malte (2%) autoclavado e acrescido de um antibiótico (Tetramed), para impedir o crescimento de bactérias. As placas foram levadas a estufa do tipo BOD por 7 dias. Após o período de crescimento, foi realizada a identificação dos fungos em cada colônia formada, em seguida foram isolados e transferidos para outras placas de Petri..

4.4. Cultivo dos Fungos Isolados

4.4.1. Meio de Cultura contendo Extrato de Malte

Para o crescimento e obtenção das colônias puras dos fungos foi utilizado o meio de cultura extrato de malte. Esse meio sólido foi preparado utilizando-se extrato de malte 2% e ágar 2% em 750 mL de água destilada.

O pH do meio foi ajustado para 4 como auxílio de um PHmetro (QUIMIS modelo Q400AS) previamente calibrado, em seguida a solução foi esterilizada em autoclave em pressão de 120 atm durante 20 min. Logo após a retirada da autoclave os meios foram vertidos na capela de fluxo laminar.

Em seguida os fungos foram inoculados nos meios de cultura de extrato de malte e as placas foram vedadas com parafilme e incubados na estufa a temperatura de 29 °C.

4.4.2. Preparo da Solução de Esporos para Inóculo das Linhagens Fúngicas

A partir da inoculação de 10 fungos foram preparados 50 tubos de ensaio contendo uma solução de extrato de malte, na qual os mesmos foram colocados inclinados e adicionados os fungos em repique e foram incubados e colocados na BOD para crescimento pelo período de 4 dias. Após isso foram adicionados 2 mL de água destilada e agitou-se a solução que logo em seguida foi filtrada e adicionou – se shampoo neutro na solução final (esporos + água destilada).

4.5. Fermentação em Estado Sólido

O meio sólido foi preparado pela adição de farelo de trigo (5,0 g) e 10 mL de uma solução aquosa contendo úreia (0,30 g.L⁻¹), peptona (0,75 g.L⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (1,40 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (2 g.L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (0,30 g.L⁻¹), CaCl₂.2H₂O (0,40 g.L⁻¹), ZnSO₄ (1,40 mg.L⁻¹), FeSO₂.7H₂O (5,00 mg.L⁻¹), CoCl₂.6H₂O (2,00 mg.L⁻¹) e MnSO₄.5H₂O (1,60 mg.L⁻¹) em frascos Erlenmeyer de 125 mL. O pH da solução foi ajustado para 6 antes de cada experimento. Posteriormente o meio foi esterilizado em autoclave durante 20 min.

Em seguida os fungos foram inoculados nos meios de cultura contendo farelo de trigo através de solução de esporos, na concentração de 5.10⁵ esporos/grama de substrato e incubados em estufa por 3 dias a 32 °C.

4.6. Extração do Caldo Enzimático Contendo as Celulases

Após o período de crescimento dos fungos foi realizada a extração das enzimas totais adicionando-se aos frascos Erlenmeyer de 125mL tampão acetato de sódio (CH₃COOH/CH₃COO-Na⁺, 0,05 mol.L⁻¹, pH 4,5) na relação 10 mL de tampão para 1 g de substrato (farelo de trigo). Em seguida o meio foi macerado e triturado e logo após o mesmo foi agitado vigorosamente durante 60 min. Após 60 min a mistura foi filtrada a vácuo para a retirada do material sólido. A solução resultante foi transferida para tubos Falcon de 15 mL e usada posteriormente para avaliação da atividade celulolítica do extrato enzimático. A avaliação da atividade celulolítica foi realizada logo após a obtenção do extrato enzimático.

4.7. Preparação do reagente DNS

Para o preparo do reagente DNS foram pesados 10 g de ácido 3,5- Dinitrosalicílico e 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sal de Rochelle). Para o preparo do reagente foram feitas duas soluções:

- Solução A - Em um béquer dissolve-se 10 g de DNS em 200 mL de NaOH (aq) (2 mol. L⁻¹).
- Solução B - Em outro béquer contendo 500 mL de água destilada será adicionado o Sal de Rochelle. Para a dissolução completa a solução foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente.

Em seguida as soluções A e B foram misturadas e o volume final completado para 1 L. Devido à solução ser fotossensível, esta foi armazenada em um recipiente envolvido por papel alumínio e mantida em refrigeração à temperatura de 4 °C por um período de até 60 dias.

4.7.1. Determinação da Atividade de Enzimas Celulolíticas

A fórmula geral (Equação 1) a ser utilizada para a determinação das atividades (*FPase*, *CMCase* e *Celobiase*) foi adaptada de Ghose (1987).^[64]

Equação 1. Determinação das atividades celulolíticas.

$$\text{Atividade} = ART \times \frac{V_t}{0,18 \cdot V_e \cdot t}$$

(Eq.1)

ART: açúcares redutores totais;

V_t: volume total do ensaio;

V_e: volume de extrato enzimático usado;

0,18: massa referente a 1 μmol de glicose;

t: tempo de reação (min).

4.7.2. Determinação da Atividade de Celulases Totais (FPase)

Foi cortada uma tira de papel, em formato espiral, e colocada dentro do tubo de ensaio, ao mesmo foi adicionado 0,33 mL de caldo enzimático, 0,33 mL de água destilada e 1 mL de solução de DNS, os mesmos foram submetidos ao banho maria na temperatura constante de 50 °C durante 5 min. Após isso, os tubos foram resfriados e utilizados para análises futuras. O branco ou controle dos experimentos foi feito sem a presença do papel de filtro, mas usando-se as mesmas condições reacionais. Tal processo está apresentado na Figura 7.

Figura 7. Processo da reação de hidrólise enzimática da celulose.



Fonte do Autor.

4.7.3. Construção da Curva Analítica para a Quantificação dos Açúcares Redutores

Para construção da curva analítica foram utilizadas soluções de glicose com concentrações 0,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0; 90,0 e 100,0 mg. dL⁻¹. Para a obtenção da curva foi adicionado 1 mL de amostra-padrão (de 0 – 100 mg. dL⁻¹ de glicose) a 3 mL do reagente DNS e 1 mL de água destilada. A solução resultante foi submetida ao aquecimento em banho-maria (água em ebulição) por 5 min, e em seguida resfriada à temperatura ambiente para posterior análise em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 575 nm. O branco/controlado das análises consisti de 2 mL de água destilada e 3 mL de DNS.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento e purificação de linhagens fúngicas do solo do Campus II

Foi possível realizar o isolamento de dez fungos do solo da região arborizada do Campus II da Unifesspa, sendo que os mesmos foram codificados e descritos de acordo com os aspectos físicos das hifas por eles produzidas. Foi feita a codificação de acordo com a área em que o solo foi retirado A1 (área) e C2 denomina o campus da universidade, e os numerais que vêm no final do código denominam a numeração atribuída a cada linhagem durante o processo de purificação das mesmas. Conseguiu – se purificar um total de 08 linhagens (Tabela 3).

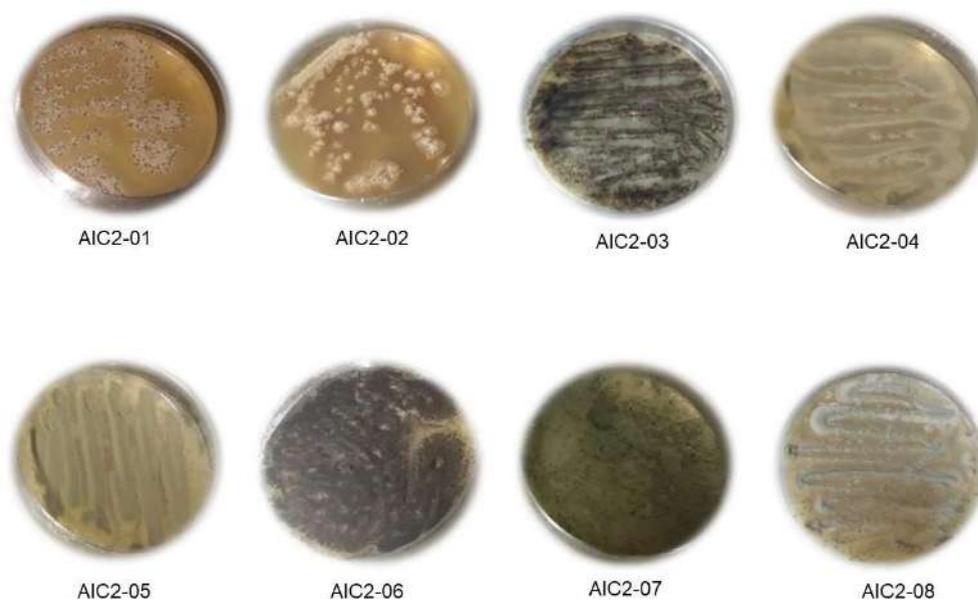
Tabela 3. Linhagens fúngicas isoladas no Campus II da Unifesspa e descrição visual dos mesmos.

Código	Descrição visual da colônia
A1C2-01	Hifas e esporulação amarela com alguns esporos pretos
A1C2-02	Hifas e esporos de coloração semelhante ao marfim
A1C2-03	Hifas pretas com esporos pretos
A1C2-04	Hifas brancas levemente algodinosas e esporos verdes
A1C2-05	Hifas brancas levemente algodinosas e esporos verdes
A1C2-06	Hifas brancas e esporos pretos
A1C2-07	Hifas verdes com esporos verdes
A1C2-08	Hifas brancas com esporos verdes

Foi possível notar que há uma grande variabilidade de linhagens fúngicas no solo do Campus II da Unifesspa, sobretudo ao observar os aspectos físicos das linhagens isoladas, que apresentam características físicas diferentes, denotando que tratam-se de espécies fúngicas diferentes. Todas estas linhagens fúngicas isoladas apresentaram produção de esporos durante o seu crescimento, favorecendo a sua manipulação nas etapas posteriores do trabalho. No entanto, duas linhagens (A1C2-01 e A1C2-02) não produziram esporos suficientes para a realização da contagem dos mesmos, sendo a contagem realizada para as demais linhagens.

As linhagens isoladas em meio de cultura sólido (extrato de malte + ágar) estão listadas e apresentadas na Figura 8.

Figura 8. Fotos das linhagens fúngicas isoladas do solo do Campus II da Unifesspa.



Fonte do Autor.

5.2. Determinação da Atividade Celulolítica das Linhagens Isoladas

Das 08 linhagens isoladas e purificadas, cinco delas foram avaliadas acerca de sua capacidade em produzir enzimas celulasas. Notou-se que todas as cinco linhagens estudadas apresentaram atividade celulolítica. As atividades obtidas, foram expressas em U.mL^{-1} , considerando-se o extrato enzimático (total de 50 mL de extrato enzimático), e em U.g^{-1} de substrato, considerando a massa de farelo de trigo utilizado (5 g) para o cultivo dos fungos (Tabela 4). Uma unidade enzimática é definida como sendo a quantidade de enzima requerida para a liberação de 1 μmol de glicose por minuto sob as condições experimentais.

Tabela 4. Atividades celulolíticas determinadas para linhagens fúngicas isoladas do solo do Campus II da Unifesspa.

Linhagem	Atividade <i>FPase</i> (U.mL^{-1})	Atividade <i>FPase</i> (U.g^{-1})
A1C2-02	0,02	0,2
A1C2-03	0,05	0,5
A1C2-05	0,06	0,6
A1C2-06	0,06	0,6
A1C2-07	0,01	0,1

Observou-se que as linhagens fúngicas estudadas apresentaram valores de atividade que denotam que as mesmas possuem um bom potencial de estudo para a produção de celulasas. Dentre estas, podemos destacar as linhagens A1C2-03, A1C2-05 e A1C2-06, que apresentaram atividades celulolíticas semelhantes e bem promissoras para a continuação da pesquisa, sobretudo na realização de experimentos para determinar as melhores condições de cultivo e reacionais para a obtenção de uma maior atividade.

Este potencial pode ser confirmado e afirmado devido ao fato de os valores obtidos neste trabalho serem semelhantes aos valores inicialmente obtidos em outros trabalhos da literatura (SANTOS, 2017).^[65]

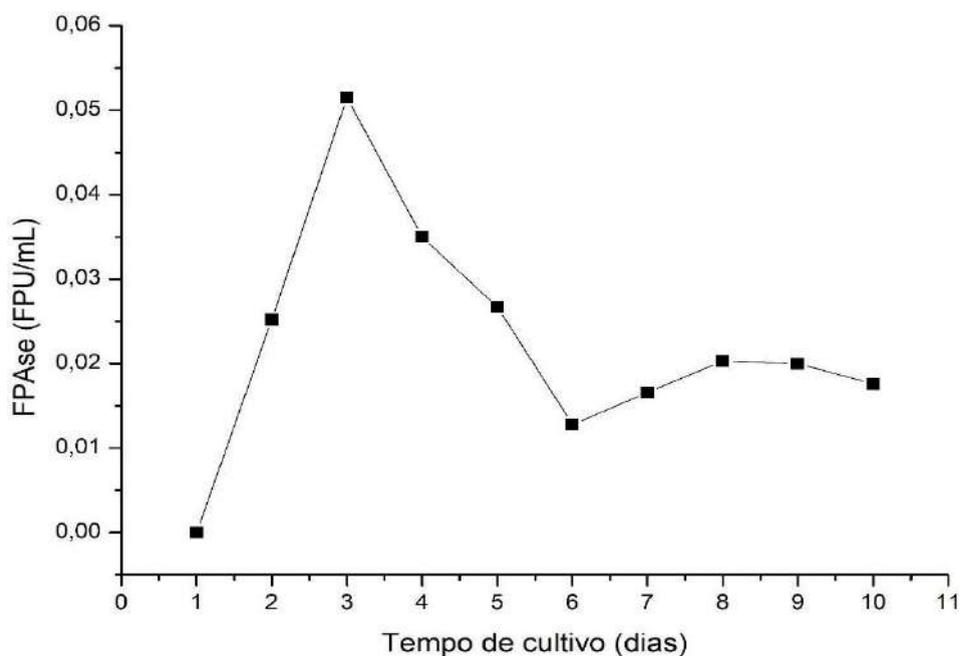
5.3. Estudo do Melhor Período de Cultivo do Fungo A1C2-03 frente à sua Atividade

Devido ao potencial demonstrado para a produção de celulasas, as linhagens A1C2-05 e A1C2-06 foram selecionadas para serem motivo de investigação de um projeto de mestrado, enquanto a primeira, A1C2-03, foi selecionada para a continuação do presente trabalho.

A linhagem A1C2-03 foi então submetida a um estudo de determinação da influência da variação do tempo de cultivo em meio de cultura sólido rico em farelo de trigo sobre a produção de celulasas. O período de crescimento estudado foi de 10 dias visando a obtenção de

uma maior atividade, sendo que seu potencial foi analisado a cada dia, contando a partir do dia posterior ao inóculo. O gráfico abaixo mostra a relação entre o dia de crescimento e a atividade celulolítica.

Gráfico 1: Atividade enzimática celulolítica (U/mL de extrato enzimático) determinada de acordo com o período de cultivo para a linhagem A1C2-03 isolada do solo do Campus II da Unifesspa.



De acordo com o observado no gráfico, o melhor período de cultivo desta linhagem é de apenas 3 dias após seu inóculo, apresentando uma atividade enzimática celulolítica de $0,05 \text{ U.mL}^{-1}$, coincidentemente o mesmo tempo de cultivo utilizado durante a etapa anterior. Se considerada a atividade produzida por grama de substrato utilizado no cultivo, a atividade obtida é de $0,5 \text{ U.g}^{-1}$. É importante ressaltar que neste dia o fungo já havia crescido totalmente no farelo de trigo e apresentava uma grande quantidade de esporos (figura 9).

Figura 9. Fotos da linhagem fúngica A1C2-03 em meio de cultura contendo farelo de trigo.



Fonte do Autor.

Este resultado indica que o fungo atingiu seu potencial máximo de produção de celulases ao 3º dia e após o 4º dia a quantidade de enzimas celulolíticas requeridas para seu crescimento/sobrevivência diminuiu consideravelmente se estabilizando a partir do 6º dia.

5.4. Determinação das Condições Reacionais Ótimas das Celulases Produzidas

Uma vez determinado o melhor período de cultivo da linhagem fúngica A1C2-03 para a produção de celulases, foram iniciados estudos da atividade destas enzimas frente às variações de pH e temperatura, bem como determinar a estabilidade térmica das enzimas. O objetivo principal deste estudo é determinar as melhores condições reacionais para que as enzimas desempenhem sua melhor atividade durante a hidrólise da celulose.

5.4.1 pH do tampão da reação

Os valores de pH avaliados foram mais acídicos, uma vez que é sabido que a maioria das celulases apresentam melhor atividade quando o grupo R ácido dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo estão parcialmente ionizados. Na Figura 10 e tabela 5 estão expressos os valores de pH utilizados e os tampões necessários para alcançar tais valores.

Tabela 5: Valores de pH dos tampões utilizados no trabalho.

Valor de pH	Tampão Utilizado
pH: 2,8	Ácido cítrico + K_2HPO_4
pH: 3,8	Ácido cítrico + K_2HPO_4
pH: 3,8	Ácido cítrico + Citrato de sódio
pH: 4,8	Ácido cítrico + Citrato de sódio
pH: 5,8	Ácido cítrico + Citrato de sódio
pH: 5,8	KH_2PO_4 + K_2HPO_4
pH: 6,8	KH_2PO_4 + K_2HPO_4
pH: 7,8	KH_2PO_4 + K_2HPO_4

Figura 10. Linhagem fúngica A1C2-03, o valor de pH utilizado e os tampões utilizados.

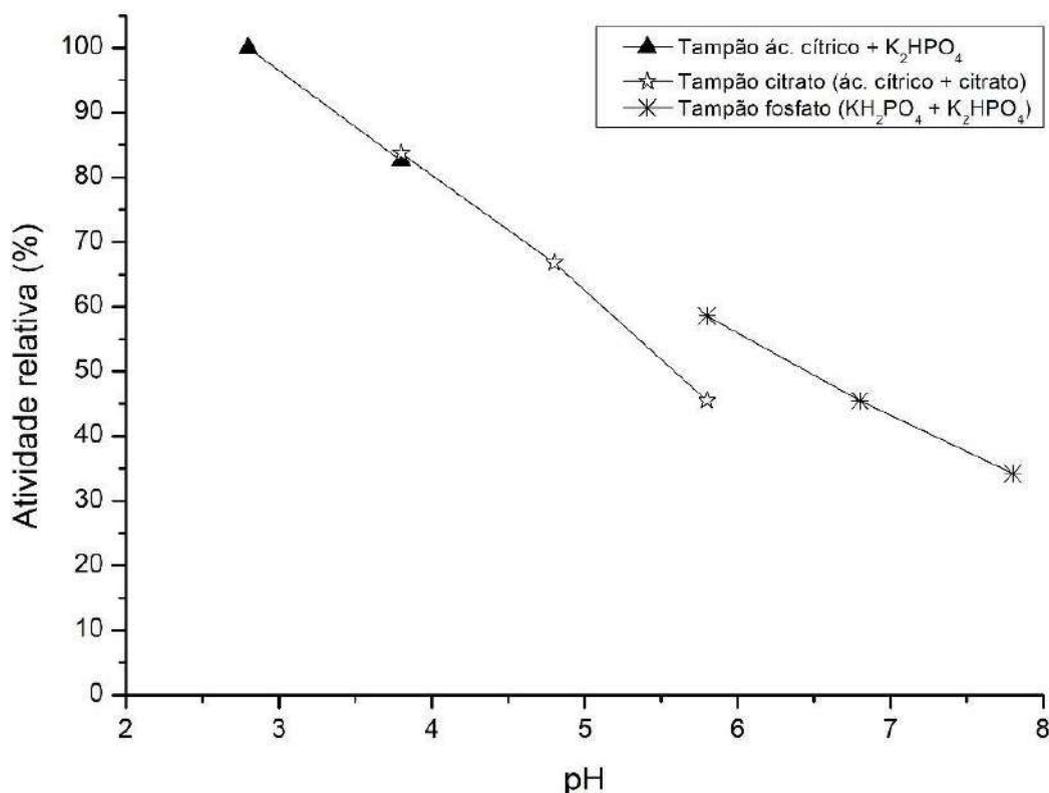


Fonte do Autor.

O gráfico 2 apresenta as atividades obtidas para cada um dos valores de pH testados, bem como a influência da solução tampão utilizada durante a hidrólise da celulose de papel de filtro. As atividades estão descritas em forma de atividade relativa onde a maior atividade obtida durante o experimento é atribuído o valor de 100% e as demais atividades obtidas são calculadas como normalização deste valor (regra de três).

Foi possível observar que o valor de pH mais ácido testado foi o mais favorável à atividade das celulasas e com o aumento do pH a atividade foi diminuindo, sendo que em um valor de pH levemente básico (pH 7,8) a atividade remanescente foi de pouco mais de 30%. Além disso, notou-se que não há diferença significativa na atividade quando são usados como solução tampão as soluções ác. cítrico + K_2HPO_4 e ác. cítrico + citrato de sódio. Estas duas soluções tampão foram utilizadas para obter-se o pH 3,8. Para o pH 5,8 também foram utilizadas duas soluções tampão, ác. cítrico + citrato de sódio e $K_2HPO_4 + KH_2PO_4$, mas foi possível observar uma maior atividade quando utilizou-se o tampão $K_2HPO_4 + KH_2PO_4$, indicando que em algumas situações a solução tampão escolhida pode influenciar a atividade das celulasas.

Gráfico 2: pH ótimo para a realização da hidrólise enzimática da celulose usando celulasas da linhagem A1C2-03.

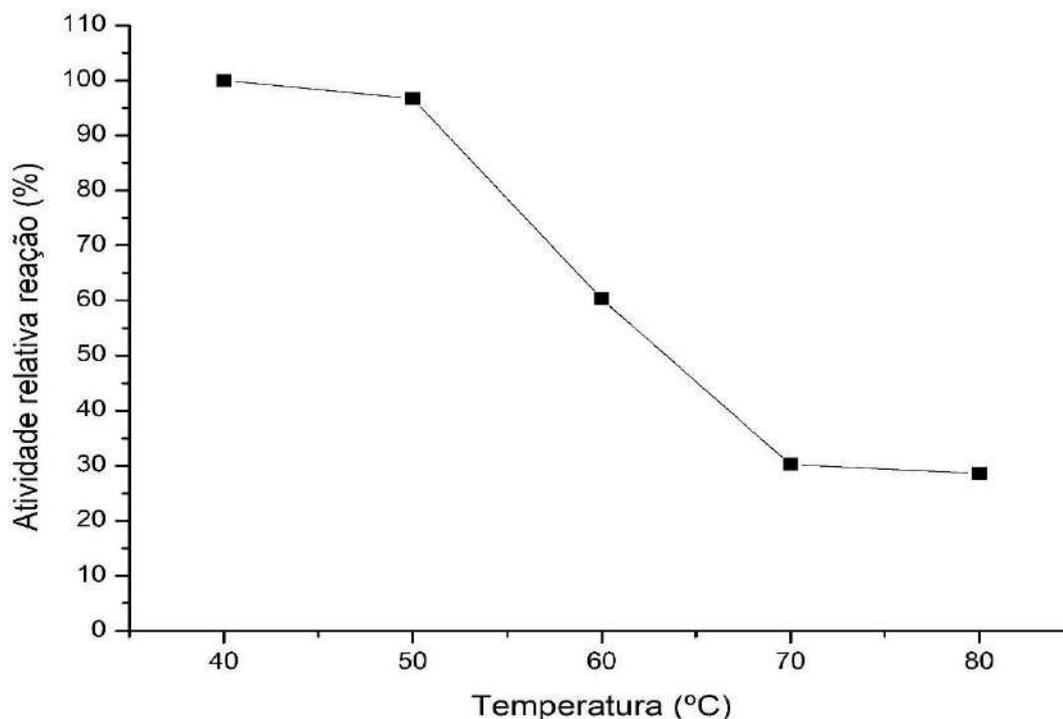


5.4.2 Temperatura reacional

O gráfico 3 apresenta as atividades obtidas para cada uma das temperaturas testadas, foi realizada a execução do experimento em duplicata, na faixa de temperatura compreendida entre 40, 50, 60, 70 e 80 °C, num intervalo de 10 °C.

A temperatura influencia diretamente na atividade enzimática e o ponto ótimo representa o máximo de atividade, a temperatura ótima para a hidrólise da celulose do papel filtro obtida foi de 40 °C, com destaque também para a temperatura de 50 °C, com uma atividade remanescente pouco mais de 96,69%. Analisando os valores de atividade enzimática quando ocorre a variação de temperatura, pode-se notar que nas temperaturas mais baixas dentre as testadas, as celulasas apresentaram seu maior potencial. Portanto, as condições boas/ótimas são aquelas em que o valor da temperatura se mantém até 50° C, e quando se aumenta a temperatura (60, 70 e 80 °C) ocorre uma diminuição significativa na concentração de açúcares redutores liberados pelas celulasas presentes no extrato enzimático e a atividade cai bruscamente.

Gráfico 3: Temperatura ótima para a realização da hidrólise enzimática da celulose usando celulasas da linhagem A1C2-03.



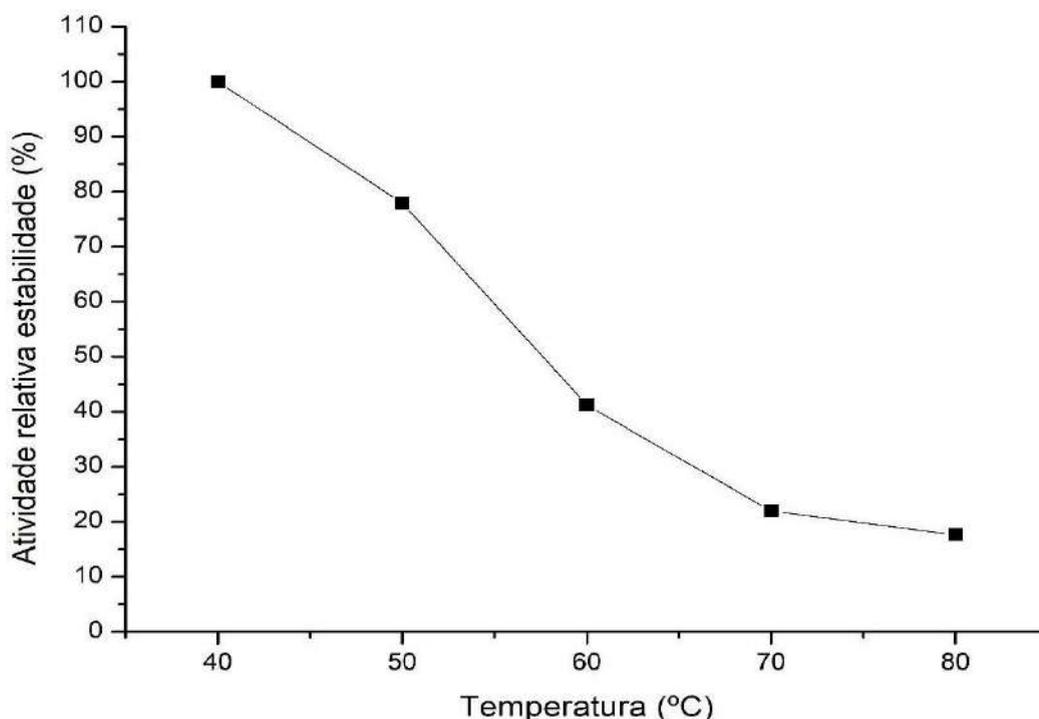
5.4.3 Estabilidade Térmica das Celulases

Para avaliar a estabilidade térmica das celulases produzidas pela linhagem fúngica A1C2-03, 10 mL do caldo enzimático foram aquecidos por 30 minutos a 40 °C. Foi retirado uma alíquota de 1 mL para a determinação da atividade a 40° C por 60 minutos. Este processo de aquecimento anterior à determinação da atividade foi realizado para as temperaturas de 50-80 °C, com acréscimo progressivo de 10 °C.

Analisando os valores de atividade relativa foi possível observar uma diminuição significativa a partir de 50 °C, a qual apresentou uma atividade remanescente de 77,94% em relação à temperatura padrão de 40 °C. quanto maior o valor da temperatura à qual o caldo enzimático foi submetido, menor o valor da atividade enzimática, culminando na obtenção de valores de atividade relativa inferiores a 30% quando a temperatura estudada foi de 80 °C, conforme visto no gráfico.

Esta diminuição da atividade com o aumento da temperatura a que o caldo enzimático é submetido explica o porquê da temperatura ótima determinada na seção 5.4.2 foi de 40 °C, e o teste de atividade sob temperaturas acima da temperatura ótima é diretamente afetado pela menor estabilidade das celulases quando submetidas a temperaturas acima de 50 °C.

Gráfico 4: Estabilidade térmica ótima para a realização da hidrólise enzimática da celulose usando celulases da linhagem A1C2-03.



Foi possível observar, então, que as melhores condições para utilizar as celulasas produzidas pela linhagem fúngica A1C2-03 são pH 2,8 e temperatura de 40 °C, e que o processo no qual as celulasas serão aplicadas não pode submetê-las a temperaturas acima de 50 °C, pois culminaria numa perda significativa de atividade.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível observar que linhagens fúngicas de solo de ambiente amazônico apresentam bom potencial na produção de celulases, mesmo que as linhagens apresentem características morfológicas muito diferentes entre si. O curto período ótimo de cultivo (3 dias) para a linhagem fúngica A1C2-03 favorece a aplicação desta linhagem para a produção de celulases.

Na determinação do pH reacional ótimo, foi possível verificar um melhor ajuste das celulases produzidas a valores de pH mais ácidos (pH 2,8) e o aumento do pH significou uma redução significativa da atividade. Desta forma, as celulases produzidas pela linhagem fúngica A1C2-03 são mais indicadas para uso em processos industriais que ocorram em pH ácido, sendo esta uma excelente característica, pois celulases que resistam a valores de pH abaixo de 3 são pouco relatadas.

Na variação da temperatura do meio reacional, as temperaturas de 40-50 °C foram as que mais favoreceram a hidrólise da celulose sendo igual ou bem próxima do valor definido pela IUPAC – 50° C. Em temperaturas acima de 50 °C, há uma diminuição significativa na concentração de açúcares redutores liberados pelas celulases presentes no extrato enzimático. Essa perda de atividade catalítica, ocorre devido a provável desnaturação térmica sofrida pelas celulases, uma vez que as mesmas não apresentam uma boa estabilidade térmica sob temperaturas acima de 50 °C.

Assim, a linhagem A1C2-03 mostrou-se promissora e novos estudos de aplicação da mesma em reações de reaproveitamento de material lignocelulósico para a obtenção de açúcares serão realizados, a fim de gerar conhecimento sobre a linhagem e resultar em uma publicação qualificada.

Por fim, analisando a linhagem A1C2 -03 com os parâmetros analisados foi possível determinar os melhores meios reacionais para a determinada linhagem, notou-se também que os valores de estabilidade térmica e temperatura são inversamente proporcionais, pois com o aumento da temperatura perde – se bastante a capacidade de estabilidade térmica das celulases.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MOHAMMADI, M.; NAJAFPOUR, G.D.; YOUNESI, H.; LAHIJANI, P.; UZIR, M.H.; MOHAMED, A.R. Bioconversion of synthesis gas to second generation biofuels: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 4255-4273, 2011.
2. SOUSA, K. A.; FAHEINA JUNIOR, G. S.; AZEVEDO, D. C. S.; PINTO, G. A. S. Optimization of Cellulase Production by Trichoderma Strains Using Crude Glycerol as a Primary Carbon Source with a 24 Full Factorial Design. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, p. 357-367, 2018.
3. DELABONA, P. S.; PIROTA, R. D. P. B.; CODIMA, C. A.; TREMACOLDI, C. R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass & Bioenergy**, v. 37, p. 243-250, 2012b.
4. SOUZA, M. F.; SILVA, A. S.; BON, E. P. S. A novel Trichoderma harzianum strain from the Amazon Forest with high cellulolytic capacity. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 183-188, 2018.
5. DELABONA, P. S.; PIROTA, R. D. P. B.; CODIMA, C. A.; TREMACOLDI, C. R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest Aspergillus strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. **Industrial Crops and Products (Print)**, v. 42, p. 236-242, 2013c.
6. TOYAMA, D.; MORAIS, M.A.B.; RAMOS, F.C.; ZANPHORLIN, L.M.; TONOLI, C.C.C.; BALULA, A.F.; MIRANDA, F.P.; ALMEIDA, V.M.; MARANA, S.R.; RULLER, R.; MURAKAMI, M.T.; HENRIQUE-SILVA, F. A novel β -glucosidase isolated from the microbial metagenome of Lake Poraquê (Amazon, Brazil). **BBA. Proteins and Proteomics**, v. 1866, p. 569-579, 2018.
7. MENEZES, T. J. B. Etanol: o combustível do Brasil. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980.
8. Mota, F. & Viegas, Renan & Lima, A. & Santos, F. & Caselli, Francisco. Pirólise da Biomassa Lignocelulósica: Uma revisão. **Revista Gestão Inovação e Tecnologias** 5. 2511-2525, 2015.
9. NGUYEN, N. A.; UNREAN, P. Optimized fed-batch fermentation of Scheffersomyces stipitis for efficient production of ethanol from hexoses and pentoses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, p. 1895-1909, 2013.
10. SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. Annual Review of Plant Biology, v. 61, p. 263-289, 2010.
11. HOFTE, H.; VOXEUR, A. Plant cell walls. Current Biology, v. 27, p. 865-870, 2017.

12. DELABONA, P. S. **Bioprospecção de fungos produtores de celulases da região amazônica para a produção de etanol celulósico**, 2011. 121 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.
13. HUEBRA, L. DA S. **Avaliação da utilização da casca de café para a produção de um derivado celulósico**. 2016. 52f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) - Departamento de Ciências Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, 2016.
14. SÁNCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5270-95, 2008.
15. SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.
16. 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.
17. BUANAFINA, M. M. O.; COSGROVE, D. J. Cell walls: Structure and biogenesis. In: MOORE, P. H.; BOTHA F. C. (Ed.). *Sugarcane: physiology, biochemistry, and functional biology*. New York: Wiley, 2014, p. 307-329.
18. HARGREAVES, P. I. **Bioprospecção de novas celulases de fungos provenientes da floresta Amazônica e otimização de sua produção sobre celuliginina de bagaço de cana**.2008. 75f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Fderal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
19. ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 2-11, 2010.
20. DONINI, Í. A. N.; SALVI, D. T. B.; FUKUMOTO, F. K.; LUSTRI, W. R.; BARUD, H. S.; MARCHETTO, R.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, v. 35, p 1-2, 2010.
21. CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010.
22. MENEZES, B. D. S. **Produção de xilooligossacarídeos a partir de resíduos lignocelulósicos e fungos filamentosos**. 2018. 121f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação de Ciência e Tecnologia em Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.
23. DOS SANTOS, P. S.; SOLIDADE, L. S.; SOUZA, J. G. B.; LIMA, G. S.; BRAGA Jr, A. C. R.; ASSIS, F.G.V.; LEAL, P. L. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 04, n. 02, p. 181–188, 2018.
24. AMORIM, C. C. **Xilanases por cultivo submerso de *Aspergillus niger***. 2017. 137f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

25. CASTRO, A. M.; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
26. BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 355-83, 2000.
27. COELHO, M.Z.; LEITE, S.G.F.; ROSA, M.F.; FURTADO, A.A.L.. “Aproveitamento de resíduos agroindustriais: Produção de enzimas a partir da casca de coco verde”. *CEPP*, v.19, n.1, p.33-42, 2001.
28. PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T.. “Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse”. **Bioresource Technology**, Northern Ireland. v.74, p.69-80, 2000.
29. BÉLGUIN, P.. “Molecular biology of cellulase degradation”. **Annual Review of Microbiology**, v.44, p.219-248, 1990.
30. BINOD, P.; JANU, K. U.; SINDHU, R.; PANDEY, A. Hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. In: PANDEY, A.; LARROCHE, C.; RICKE, S.C.; DUSSAP, C. G.; GNANSOUNOU, E. (Ed.). **Biofuels. Burlington: Academic Press**, 2011, p. 229-250.
31. DAVIES, G. J.; WILSON, K. S.; HENRISSAT, B. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases, **Biochemical Journal**, London, v. 321, n. 2, p. 557-559, Apr. 1997.
32. GILKES, N. R. et al. Domains in microbial β -1, 4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. **FEMS Microbiology Review**, Haren, v. 55, n. 2 p. 303-315, Apr. 1991.
33. OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, v. 33, p. 1549-1558, 2010.
34. KHAN, M. H.; ALI, S.; FAKHRU’L-RAZI, A.; ALAM, Z. Use of fungi for the bioconversion of rice straw into cellulase enzyme - Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 42, p. 381-386, 2007.
35. Maurício P. de Paula, Talita M. Lacerda, Márcia D. Zambon, Elisabete Frollin. HIDRÓLISE ÁCIDA DE CELULOSE DE SISAL: ESTUDOS VISANDO OBTENÇÃO DE NANOFIBRAS E DE BIOETANOL. Congresso Brasileiro de Polímeros. Foz do Iguaçu, Paraná. 2009
36. CHUNDAWAT, S. P. S.; DONOHUE, B. S.; SOUSA, L. D.; ELDER, T.; AGARWAL, U. P.; LU, F. C.; RALPH, J.; HIMMEL, M. E.; BALAN, V.; DALE, B. E. Multi-scale visualization and characterization of lignocellulosic plant cell wall deconstruction during thermochemical pretreatment. **Energy Environ. Sci.**, v. 4, p. 973–984, 2011.

37. BAYER, E.A. & LAMED, R.. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? *Review Biodegradation*, 3(2-3): 171-88, 1992
38. FONSECA, M. M.; TEIXEIRA, J. A. **Reatores biológicos: fundamentos e aplicações**. Lisboa: Lidel. 2007. 483 p.
39. PINTO, G. A. S. **Produção de tanase por *Aspergillus niger***. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.
40. PANDEY, A. Solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 81-84, 2003.
41. NARAHARA, H.; KOYAMA, Y.; YOSHIDA, T.; PICHANGKURA, S.; UEDA, R.; TAGUCHI, H. Growth and enzyme production in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. ***Journal Fermentation Technology***, v. 60, p. 311-319, 1982.
42. MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. New developments in solid state fermentation. II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. ***Process Biochemistry***, v. 35, p. 1211-1225, 2000.
43. RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. ***Biochemical Engineering Journal***, v. 13, p. 127-135. 2003.
44. EL-BAKRY, M.; ABRAHAM, J.; CERDA, A.; BARRENA, R.; PONSÁ, S.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. From wastes to high value added products: novel aspects of SSF in the production of enzymes. ***Critical Reviews in Environmental Science and Technology***, v. 45, p. 1999-2042, 2015.
45. 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. 46, p. 541-549, 2010.
46. BELLON-MAUREL, V.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. ***Process Biochemistry***, v. 38, p. 881-896, 2003.
47. DE VRIES, R.P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. ***Microbiology and Molecular Biology Reviews***. v. 65, p. 497-522, 2001.
48. TAO, Y. M.; ZHU, X. Z.; HUANG, J. Z.; MA, S. J.; WU, X. B.; LONG, M. N.; CHEN, Q. X. Purification and Properties of Endoglucanase from a SugarCane Bagasse Hydrolyzing Strain, *Aspergillus glaucus* XC9. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 58, p. 6126-6130, 2010.
49. GUTIERREZ-CORREA, M.; TENDERDY, R. P. Production of cellulase on sugar cane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. ***Biotechnology Letters***, v. 19, p. 665-667,

- 1997.
50. DESHPANDE, S. K.; BHOTMANGE, M. G.; CHAKRABARTI, T.; SHASTRI, P. N. Production of cellulase and xylanase by *Trichoderma reesei* (QM 9414 mutant), *Aspergillus niger* and mixed culture by SSF of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). **Indian Journal of Chemical Technology**, v. 15, p. 449-456, 2008.
 51. SOCCOL, C. R.; MARIN, B.; RAIMBAULT, M.; LEBEAULT, J. M. Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid state fermentation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 41, p. 330-336, 1994.
 52. GUNNY, A. A. N.; ARBAIN, D.; JAMAL, P.; GUMBA, R. E. Improvement of halophilic cellulase production from locally isolated fungal strain. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, p. 476-483, 2015.
 53. SAJITH, S.; SREEDEVI, S.; PRIJI, P.; UNNI, K. N.; BENJAMIN, S. Production and partial purification of cellulase from a novel fungus, *Aspergillus flavus* BS1. **Annals of Microbiology**, v. 64, p. 763-771, 2014.
 54. FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, Renewable biological systems for alternative sustainable energy production. Series title: **FAO Agricultural Services Bulletins**. p. 128, 1997.
 55. RAGHUWANSHI, S.; DESWAL, D.; KARP, M.; KUHAD, R.C. Bioprocessing of enhanced cellulase production from a mutant of *Trichoderma asperellum* RCK2011 and its application in hydrolysis of cellulose. **Fuel**, v. 124, p. 183-189, 2014.
 56. De OLIVEIRA, S. L. R.; MACIEL, T. C.; SANCHO, S. O.; RODRIGUES, S. Solidstate production of cellulase by *Melanoporia* sp. CCT 7736: a new strain isolated from coconut shell (*Cocos nucifera* L.). **Bioresources and Bioprocesses**, v. 3, p. 1- 11, 2016.
 57. ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.
 58. AZEVEDO, J. L. **Fungos: Genética e Melhoramento de Fungos na Biotecnologia**. Biotecnologia, Ciência, Desenvolvimento, v. 1, p. 12-15, 1997.
 59. MOHAMMADI, M.; NAJAFPOUR, G.D.; YOUNESI, H.; LAHIJANI, P.; UZIR, M.H.; MOHAMED, A.R. Bioconversion of synthesis gas to second generation biofuels: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 4255-4273, 2011.
 60. DELABONA, P. S.; PIROTA, R. D. P. B.; CODIMA, C. A.; TREMACOLDI, C. R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass & Bioenergy**, v. 37, p. 243-250, 2012b.

61. SOUZA, M. F.; SILVA, A. S.; BON, E. P. S. A novel *Thichoderma harzianum* strain from the Amazon Forest with high cellulolytic capacity. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 183-188, 2018.
62. DELABONA, P. S.; PIROTA, R. D. P. B.; CODIMA, C. A.; TREMACOLDI, C. R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. **Industrial Crops and Products (Print)**, v. 42, p. 236-242, 2013c.
63. TOYAMA, D.; MORAIS, M.A.B.; RAMOS, F.C.; ZANPHORLIN, L.M.; TONOLI, C.C.C.; BALULA, A.F.; MIRANDA, F.P.; ALMEIDA, V.M.; MARANA, S.R.; RULLER, R.; MURAKAMI, M.T.; HENRIQUE-SILVA, F. A novel β -glucosidase isolated from the microbial metagenome of Lake Poraquê (Amazon, Brazil). **BBA. Proteins and Proteomics**, v. 1866, p. 569-579, 2018.
64. GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, v. 59, p. 257-268, 1987.
65. SANTOS, D. A.; OLIVEIRA, M. M.; CURVELO, A. A. S.; FONSECA, L. P.; PORTO, A. L. M. Hydrolysis of cellulose from sugarcane bagasse by cellulases from marinederived fungi strains. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 121, p. 66-78, 2017.