



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CECA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO PROFISSIONAL EM ENERGIA DA BIOMASSA



IVO DA SILVA

PROSPECÇÃO DE CELULASES DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS *Scytalidium* SP.,
Colletotrichum SP. e *Fusarium* SP. DA PALMA FORRAGEIRA EM DIFERENTES MEIOS DE
CULTURA

RIO LARGO, AL

2016

IVO DA SILVA

PROSPECÇÃO DE CELULASES DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS *Scytalidium* SP., *Colletotrichum*
SP. e *Fusarium* SP. DA PALMA FORRAGEIRA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Profissional em Energia da Biomassa, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Energia da Biomassa.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Maria Rosas Garcia Almeida

Rio Largo, AL
outubro de 2016

“A Deus pela sua infinita misericórdia.. Deus é amor!”

AGRADECIMENTOS

LISTA DE FIGURAS

SUMÁRIO

- 1 INTRODUÇÃO Erro! Indicador não definido.
- 2 OBJETIVOS Erro! Indicador não definido.
 - 2.1 Objetivo geralErro! Indicador não definido.
 - 2.2 Objetivos específicosErro! Indicador não definido.
- 3 REVISÃO DE LITERATURA Erro! Indicador não definido.
 - 3.1 Resíduos da agroindústria de CitrusErro! Indicador não definido.
 - 3.2 Resíduos da suinoculturaErro! Indicador não definido.
 - 3.3 Digestão anaeróbiaErro! Indicador não definido.
 - 3.4 Produção de BiogásErro! Indicador não definido.
4. Metodologia Erro! Indicador não definido.
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO Erro! Indicador não definido.
6. CONCLUSÕES Erro! Indicador não definido.
7. ANEXOS Erro! Indicador não definido.
8. REFERÊNCIAS Erro! Indicador não definido.

1 INTRODUÇÃO

Várias culturas agrícolas são exploradas como fontes de biomassa lignocelulósicas com a finalidade de obter etanol de 2ª geração, como alternativa de combustível renovável devido à preocupação mundial com a possível escassez do petróleo. A produção do etanol 2G inicia a partir da fragmentação da celulose presente na biomassa em glicose de forma eficaz e de baixo custo. No entanto, algumas das culturas alvos servem também para a produção de alimentos gerando um conflito ético no direcionamento do uso das culturas. A biomassa lignocelulósica, é vista como solução na obtenção de combustível renovável que irá suprir a carência mundial dos derivados do petróleo. (PEREIRA et al., 2015).

O processo de conversão da biomassa lignocelulósicas em açúcares fermentáveis é chamada hidrólise. (VERARDI et al., 2012). A hidrólise ácida e a hidrólise enzimática são atualmente os métodos mais utilizados para degradar a celulose. Existem dois tipos de processos de hidrólise ácida: o processo de ácido diluído, e o outro ocorre com ácido concentrado. O processo com ácido diluído ocorre em altas temperaturas (maior que 100 °C) para que haja a remoção da lignina e das hemiceluloses. Pois, em temperaturas amenas, a taxa de conversão de celulose em glicose é baixa, devido a não promover um intumescimento da região cristalina da celulose, porém em altas temperaturas na hidrólise com ácido diluído irá gerar produtos indesejáveis nos processos industriais, como os compostos fenólicos e furfurais (OGEDA; PETRI, 2010).

Já a hidrólise por ácido concentrado à temperatura menor que 100 °C consegue entumecer e romper a celulose, e ter um elevado rendimento na produção de glicose, no entanto, uma parte da glicose é destruída. Além disso, o processo é lento e de difícil desenvolvimento, além do grande consumo de ácido que torna o processo bastante alto e inviável, pois, causa problemas de corrosão nos equipamentos e elevado consumo de energia para recuperação do ácido (TAHERZADEH; KARIMI, 2007).

Hidrólise enzimática é o processo mais utilizado e o mais pesquisado. Enzimas são altamente específicas; realizam hidrólise em temperaturas brandas e não formam os inibidores de fermentação, portanto é mais eficaz do que os processos de hidrólise ácida (VERARDI et al., 2012). Porém, devido à complexidade e insolubilidade dos polímeros de lignina, hemiceluloses e celulose, dos materiais lignocelulósicos, é necessário um complexo enzimático contendo enzimas intracelulares e extracelulares para a degradação completa desses materiais (BENOIT et al., 2015).

Celulases são enzimas que degradam a celulose liberando glicose (CASTRO;

PEREIRA JUNIOR, 2010). Os fungos *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* são os microrganismos produtores de celulasas mais estudados MAEDA et al., 2011).

Uma cultura lignocelulósica que pode apresentar viabilidade econômica e produtiva na produção de enzimas por não competir diretamente com a produção de alimentos é a cactácea, conhecida como palma forrageira e considerada uma cultura bastante resistente à seca e cultivada e adaptada em vários países, em regiões áridas e semiáridas. (SILVA et al., 2012).

A palma forrageira apresenta grande variedade de fungos endofíticos que podem ser utilizados como fonte para a produção das enzimas pectinases, proteases, xilanase e celulasas, indicando grande potencial para processos industriais (BEZERRA et al., 2012).

Tem-se questionado a viabilidade da produção de enzimas em processos industriais, devido ao alto preço, no entanto, alguns pesquisadores afirmam que podem produzir enzimas a baixo custo, alterando as proporções e aumentando o desempenho das enzimas, através da mudança na codificação dos genes ou adicionando um coquetel enzimático contendo de cinco a dez enzimas de diferentes atividades (SLADE, 2010). Outro meio de reduzir o custo da produção de enzimas é a utilização de resíduos agroindustriais como substrato. Com o avanço da biotecnologia, resíduo agroindustrial são utilizados como fonte de nutrientes por fungos, a fim de obter enzimas celulolíticas a baixo custo. (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

A maior parte das enzimas utilizadas no Brasil é importada, desconhecendo a magnitude e mecanismos na produção de enzimas, pois, o país possui uma imensa diversidade de fungos pouco explorada para produção de enzimas celulolíticas (ORLANDELLI et al., 2012). A produção de celulase utilizando o método de fermentação em estado sólido sem pré-tratamento do substrato pode apresentar grande economia no processo de produção enzimática, devido o método submerso apresentar maior gasto de energia. (ANG et al., 2013). Mesmo assim, o método submerso é o mais utilizado por apresentar maior controle do processo, controle cinético de crescimento, controle da temperatura e melhor mistura homogênea (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012).

A combinação entre a fermentação em estado sólido e a fermentação submersa aumenta a produção de enzimas em até três vezes, apresentando alta viabilidade de produção em processos industriais (CUNHA et al., 2012).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade enzimática das celulasas dos fungos *Scytalidium lignicola*, *Fusarium solani*, e *Colletotrichum gloeosporioides* da palma forrageira, utilizando farinha de palma forrageira, farelo de trigo e carboximetilcelulase, como substrato na fermentação submersa e nos meios de cultivo SNA e BDA.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a produtividade das enzimas celulasas dos fungos fitopatogênicos *Scytalidium lignicola*, *Fusarium solani*, e *Colletotrichum gloeosporioides*, da palma forrageira em diferentes meios de cultivo e substratos.

2.2 Específicos

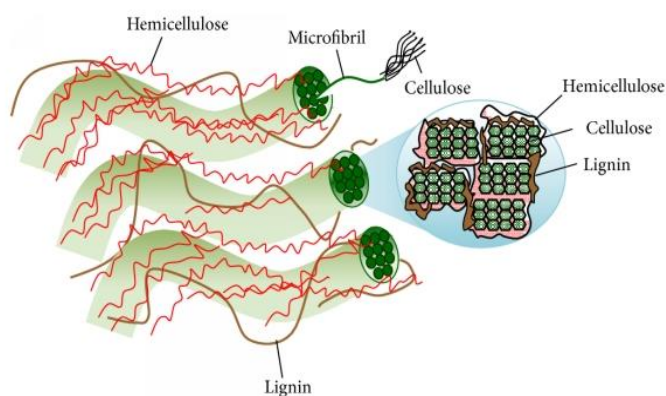
- Identificar o meio de cultura que favoreça a maior produção de celulase dos fungos *Scytalidium lignicola*, *Fusarium solani*, e *Colletotrichum gloeosporioides*;
- Comparar as atividades enzimáticas destes fungos quando cultivados nos meios BDA, SNA pelo método de coloração vermelho congo;
- Quantificar a atividade enzimática em meio líquido nos substratos de farinha de palma, farelo de trigo e de carboximetilcelulase aplicando o método espectrofotométrico.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Estrutura da Parede Celular dos Vegetais

A parede celular dos vegetais é composta basicamente de celulose, hemiceluloses e lignina. A celulose é um polímero composto por monômeros de glicose que formam microfibrilas entrelaçadas que se encontra na parede celular, envolta por moléculas de hemiceluloses e lignina (WANG et al., 2016) conforme Figura 1, por isso há uma grande dificuldade de se obter a celulose.

Figura 1: Estrutura da parede celular da planta e corte transversal de micro fibrilas (cadeias de moléculas de celulose embebida numa matriz de hemiceluloses e lignina).



Fonte: LEE; HAMID; ZAIN, 2014.

Na celulose, as unidades de glicoses estão ligadas entre si por ligações glicosídicas, que é a ligação covalente do oxigênio entre o carbono número 1 de uma glicose e o carbono número 4 da próxima glicose, formando uma estrutura linear e fibrosa (OGEDA; PETRI, 2010). Na hidrólise enzimática essas ligações são quebradas formando mais uma hidroxila para cada molécula isolada de glicose.

A celulose é insolúvel em vários solventes e parcialmente na água, isso porque a celulose cristalina é formada por ligações de hidrogênio que formam uma fibra densa e complexa, bastante resistente à hidrólise. A ligação de pontes de hidrogênio formada nas hidroxilas é responsável pela rigidez das cadeias, formando a fibra vegetal que resultam em duas regiões: uma cristalina e outra amorfa, devido as fortes interações com inúmeras ligações com as moléculas de hidrogênio e a outra com maior flexibilidade nas fibras por apresentar

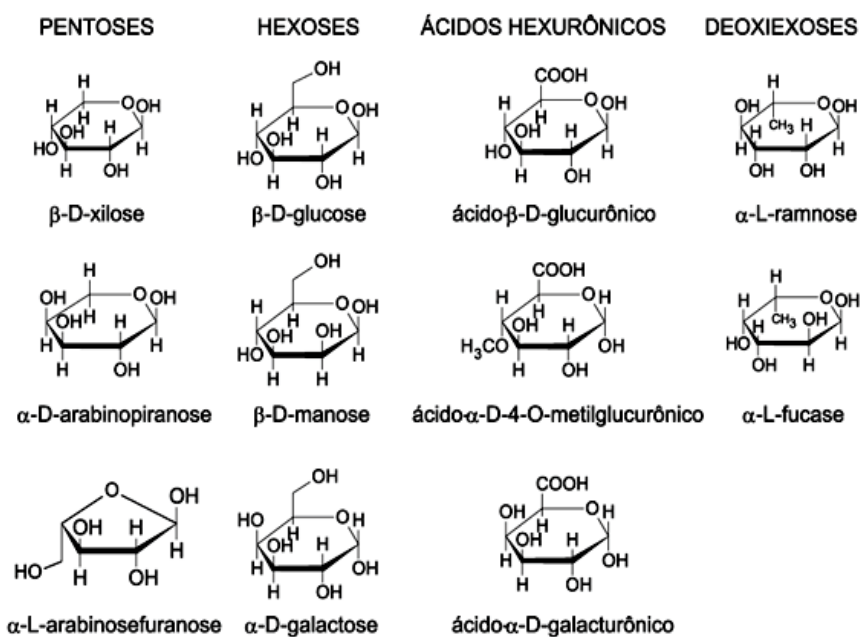
ramificação desordenada (KALIA et al., 2011).

A dissolução da celulose em água só é possível se a molécula de celulose estiver ligada a ésteres como celulose nitrato e celulose acetato ou éteres na forma de metilceluloses e carboximetilceluloses (CLASEN; KULICKE, 2001).

Devido à alta cristalinidade da celulose a qual inibe a digestibilidade da biomassa, a extração de celulose se torna o grande desafio para a biorrefinaria em desconstruir o conteúdo não celulósico da biomassa lignocelulósica, para posterior hidrólise do material nanocelulósico (LEE; HAMID; ZAIN, 2014).

As hemiceluloses, também denominada de polioses, são polissacarídeos formados por vários tipos de monossacarídeo como D-glicose, D-manose, D-galactose, D-xilose, L-arabinose, L-raminose, ácidos carboxílicos, ácido D-glucurônico e ácido D-galacturônico, conforme mostra Figura 2.

Figura 2: Monossacarídeos que formam a estrutura das hemiceluloses.



Fonte: Adaptado de FENGEL e WEGENER, 1989.

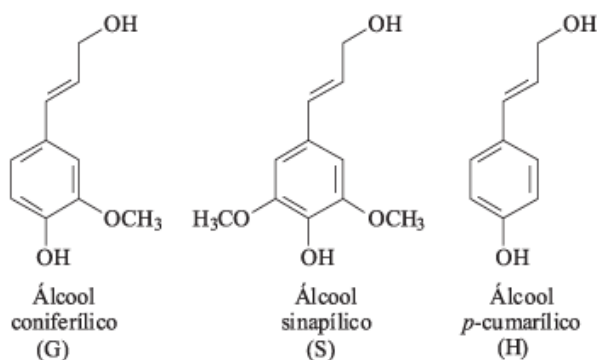
As hemiceluloses apresentam estrutura ramificada variando entre 20% e 30% de matéria seca. Além disso, apresentam configuração irregular devido às ramificações, não apresentando cristalinidade, por isso, absorve água mais facilmente, deixando as fibras mais flexíveis. A combinação entre celulose e hemiceluloses constitui a maior porção de carboidratos da planta, chamada de holoceluloses, que corresponde entre 65-70% do peso

seco da planta. Dois grupos de enzimas correspondem à degradação da xilana, as endo-1,4- β -xilanas e β -D-xilosidades (SILVA et al., 2009).

A lignina é uma macromolécula associada à celulose responsável pela rigidez e resistência mecânica dos vegetais, conferindo resistência à deterioração e protegendo os polissacarídeos da parede celular (VANHOLME et al., 2010).

Devido à grande diversidade de maneiras de tratamento para seu isolamento, A lignina deve ser definida claramente de acordo com o trabalho em questão. São denominadas C₆C₃ ou, simplesmente, unidades C₉, repetidas de forma irregular, formando um polímero que é derivado de unidades de fenilpropanóides. (SALIBA et al., 2001). Os álcoois hidroxicinamil, álcool coniferílico e álcool sinapílico são os principais blocos de construção de lignina (VANHOLME et al., 2010). Conforme mostra a Figura 3.

Figura 3: álcoois que formam as unidades de fenilpropanóides, precursores da lignina.



Fonte: Adaptado de BARBOSA et al., 2008.

A lignina é geralmente encontrada nas paredes primárias e secundárias dos vegetais e também na lamela média que age como um cimento, unindo as células entre si. Encontra-se nos vegetais sob a forma de lignina guaiacil nas gimnospermas e lignina siringil-guaiacil, nas angiospermas e em pequenas quantidades nas gramíneas sob a forma de para-hidroxifenil (SALIBA et al., 2001).

A lignina siringil-guaiacil possui carbono reativo C5 disponível para reação na etapa de polimerização da biossíntese da lignina. Durante a polimerização um grupo metoxílico impede a ligação com outras substâncias. No entanto, na lignina guaiacil, o C5 reage com anéis de fenilpropano formando um polímero de alta densidade. (ACHYUTHAN et al, 2010). A remoção da lignina nos vegetais ocorre com mais frequência com os fungos da podridão

branca (Basidiomicota e Ascomicota). (SKYBA; DOUGLAS; MANSFIELD, 2013).

3.2 Palma Forrageira

O cultivo da palma forrageira se tornou de grande importância para os produtores de gado, devido ao problema da seca no sertão do Nordeste Brasileiro. As características fisiológicas de processo fotossintético típico das plantas CAM¹, resulta em grande economia de água. A cactácea contém grande quantidade de água e serve como fonte de hidratação para os animais no período da seca. Na América do Sul, países como Peru, Chile, Bolívia, Argentina e Brasil cultivam a palma forrageira para diversos fins, principalmente para a alimentação humana e de ruminantes, mas em alguns países também a produção do corante carmim (BOMFIM et al., 2013).

A espécie mais cultivável no Brasil é a *Opuntia ficus-indica* Mill, conhecida como Palma Gigante e Redonda (*Opuntia* sp.). Já em Alagoas, predomina a espécie *Nopalea cochenillifera* Salm Dyck, mais conhecida como palma miúda ou doce. Ela é caracterizada por seus ramos, também chamados de cladódios, conhecidos como palma ou raquetes por possuir formato oval, (Figura 4), bastante resistente à cochonilha que é a principal praga da palma (VASCONCELOS et al., 2009). O cultivo da palma exige um solo argilo-arenoso e que apresente boa drenagem, pois áreas alagadas contribuem com a proliferação de doenças fitopatogênicas.

Figura 4: Palma *Nopalea cochenillifera* Salm Dyck, conhecida como palma miúda ou doce.



¹Plantas adaptadas a ambientes áridos, possuindo metabolismo ácido na fixação do CO₂.

Fonte: O Autor.

Em termos de produtividade de massa verde a palma miúda tem se mostrado inferior às cultivares gigante e redonda. No entanto, quando essa produção é transformada em matéria seca, os últimos resultados se equivalem por ter a palma miúda mais matéria seca que as outras (SANTOS et al., 2006). A palma miúda apresenta maior multiplicação de cladódios por planta, o que implica em maior produtividade que a palma gigante e a redonda.

Os teores de nutrientes são determinados a partir da massa seca, portanto, uma vez que tal genótipo apresenta maiores teores de matéria seca e produtividade de massa seca, consequentemente, detém os maiores teores de nutrientes. Outra importante característica da palma miúda é que ela possui menor teor de lignina que a palma gigante e a palma redonda, e maiores teores de celulose e hemiceluloses. A palma gigante e a palma redonda possuem cladódios maiores, são mais estruturadas, portanto apresentam maior teor de lignina (CAVALCANTE et al., 2014).

Existem poucos estudos sobre a fitopatogenicidade da palma forrageira, pois essa cultura não está isenta de ataques de microrganismos patogênicos, como os fungos que atacam as raquetes ricas em umidade (SOUZA et al., 2010).

3.3 Fungos Fitopatogênicos

O grande problema no cultivo de vegetais são as pragas, representados por insetos, formiga, lagartas e besouros que podem prejudicar e destruir a plantação. Já as doenças são geralmente causadas por fungos e bactérias fitopatogênicas que são micro-organismos causadores de doenças nas plantas e consequentemente, a morte delas. A produção de enzimas extracelulares que degradam a parede celular dos vegetais está vinculada à microrganismos fitopatogênicos (MARTINEZ et al., 2009).

Algumas doenças que ocorrem na cactácea causam bloqueio de transporte de água e nutrientes desde a raiz até os cladódios. Esse tipo de doença ocorre por distúrbios no metabolismo celular, através da absorção dos nutrientes da célula, toxinas ou secreção de enzimas dos fungos fitopatogênicos (BOMFIM et al., 2013).

Alguns agentes fitossanitários na palma forrageira causam podridões nos cladódios, raízes e raquetes, citando as espécies *Lasiodiplodia theobromae*, *Sclerotium rolfsii*, *Scytalidium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia solane* e *Pectobacterium carotovora* (SANTOS et al., 2006), resultado da atividade de enzimas líticas. Outros fitopatógenos causam o aparecimento

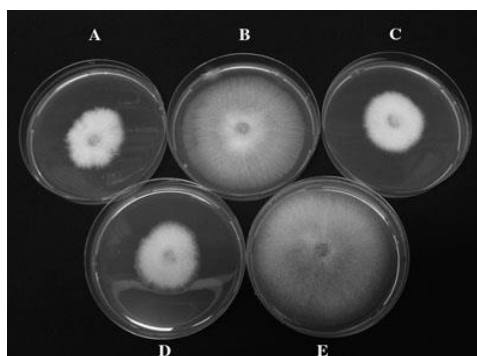
de manchas nos cladódios, umas pretas e outras marrons, provavelmente provocados pelos fungos *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Fusarium lunatum* e *Lasiodiplodia theobromae* (FLORES-FLORES et al., 2013). Fungos e bactérias podem ser utilizados na degradação da lignina, hemicelulases e celulose, principalmente os fungos que apresentam importante capacidade em degradar as moléculas mais complexas através da produção de enzimas específicas (DASHTBAN et al., 2010).

Os fungos que causam podridão branca apresentam eficiência em degradar a lignina, por produzirem uma matriz de enzimas oxidativas extracelulares (WONG, 2009).

3.4 *Fusarium*

Trata-se de um fungo patógeno até para o ser humano que se prolifera facilmente no solo, na água e em partes de plantas, podendo ser identificado pela produção de colônias aveludadas e hialinas (Figura 5).

Figura 5: Crescimento de *Fusarium*, identificado pela produção de colônias aveludadas e hialinas.



Fonte: Adaptado de SORIA; ALONSO; BETTUCCI, 2012.

O gênero possui uma grande variedade de espécies, dentre elas encontra-se, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. chladosporum*, *F. roseum*, *F. equiseti*, *F. semitectum*, *F. anthophilum*, *F. graminearum* e *Fusarium ssp.* Normalmente colonizam partes de plantas aéreas e subterrâneas, quer como invasoras primárias ou secundárias (EL-KAZZAZ et al., 2008).

Doenças causadas por *Fusarium* podem estar associadas aos solos ácidos e densos. A podridão nas raízes é provocada pelo impedimento da circulação da seiva, causando obstrução dos tecidos vasculares, causando infecções na haste junto ao solo (ALVES; SILVA, 2003),

que conseqüentemente causa a murcha de *Fusarium* ou podridão de *Fusarium* Figura 6.

Figura 6: Doença causada pelo fungo *Fusarium* na palma forrageira conhecida como murcha de *Fusarium*.



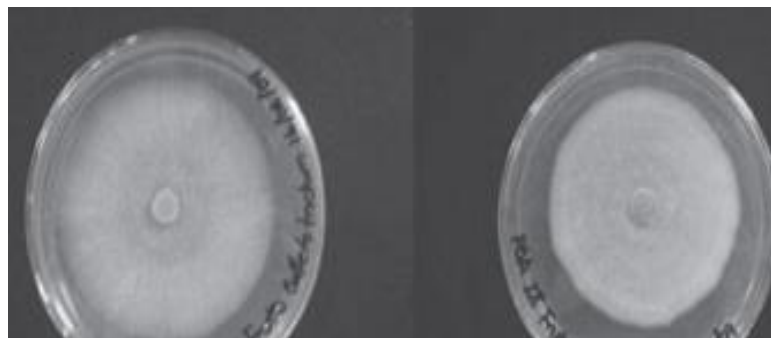
Fonte: SOUZA et al., 2010.

Algumas espécies apresentam grande potencial biotecnológico para atividade enzimática, apresentando alta produção de pectinases, xilanases, β -glicosidase, amilase e celulases (KIKOT; HOURS; ALCONADA, 2010).

3.5 *Colletotrichum*

Os fungos do gênero *Colletotrichum* pertencem ao complexo da classe *Coelomycetes*, da família *Glomerellaceae*, que produzem conídios de conidióforos condensados, formando estrutura de picnídio, acérvulo ou esporodóquio (FIGTREE et al., 2013), conforme mostra Figura 7.

Figura 7: Crescimento de colônias de fungo *Colletotrichum* obtido a partir de plantas. Produção de conídios de conidióforos condensados formam estrutura de picnídio, acérvulo ou esporodóquio.



Fonte: adaptado de GUERRERO et al., 2012.

O fungo habita no interior do vegetal, deixando-o aparentemente saudável. As doenças mais comuns causadas pelos fungos do gênero *Colletotrichum* são a antracnose e a ramulose (MARTINEZ et al., 2009).

Nos vegetais, a mancha preta, comumente conhecida como antracnose, é uma doença causada pelo fungo *Colletotrichum* que se manifesta em folhas, rizomas, meristemas apicais, pêndulos e frutos (ALMEIDA; CAMARGO; PANIZZI, 2009), causando lesões que aparecem, inicialmente, como manchas marrons ou pretas e posterior necrose (Figura 8). As plantas estão sujeitas a essa doença em todas as fases de seu desenvolvimento e, o patógeno pode ser disseminado de uma planta para outra por meio de vários agentes do ambiente aéreo (CARVALHO, 2012), podendo também ser transmitido pelas sementes.

Figura 8: Manchas pretas causadas pelo fungo *Colletotrichum* na palma forrageira, conhecido como antracnose.



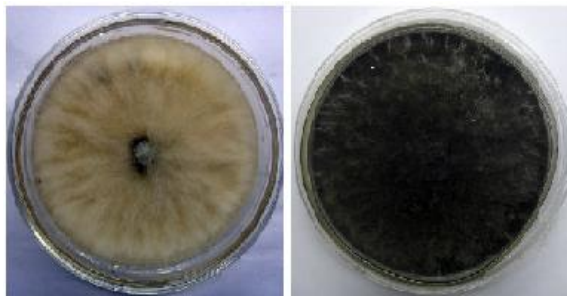
Fonte: Adaptado de SOUZA et al., 2010.

Algumas espécies de *Colletotrichum* apresentam atividades enzimáticas de pectinases e celulasas na podridão de frutos. Outras espécies, no entanto, apresentam atividades de glicosidases, xilosidases e xilanases. Enzimas pectinases geralmente são encontradas em vários fungos patogênicos nas plantas (RAMOS et al., 2010).

3.6 *Scytalidium*

Os fungos do gênero *Scytalidium* são filamentosos apresenta hifas septais e artroconidia de coloração escura (Figura 9). *Scytalidium* é bastante conhecido por causar onicomicose e lesões subcutâneas nos seres humanos (AGUIRRE; VANZINNI-ZAGO; QUIROZ-MERCADO, 2013).

Figura 9: Colônia de Fungos filamentosos *Scytalidium* apresentam hifas de coloração escura.



Fonte: Adaptado de YI et al., 2015.

Na palma forrageira causa manchas onduladas que se assemelham a escamas, partindo da base da raquete até toda região do cladódio, podendo afetar a todos os órgãos da planta. Inicia-se com uma coloração marrom até chegar a uma coloração escura, mais conhecida como podridão negra, (Figura 10). Já em contato com o homem causa infecção nas unhas, devido à proteína queratina, ocorrem principalmente, na região dos pés que fica a maior parte do tempo em ambiente úmido, quente e escuro. (SOUZA et al., 2010).

Figura 10: Manchas onduladas, semelhantes a escamas na palma forrageira causado pelo fungo *Scytalidium* mais conhecido como podridão negra.



Fonte: Adaptado de SOUZA et al, 2010.

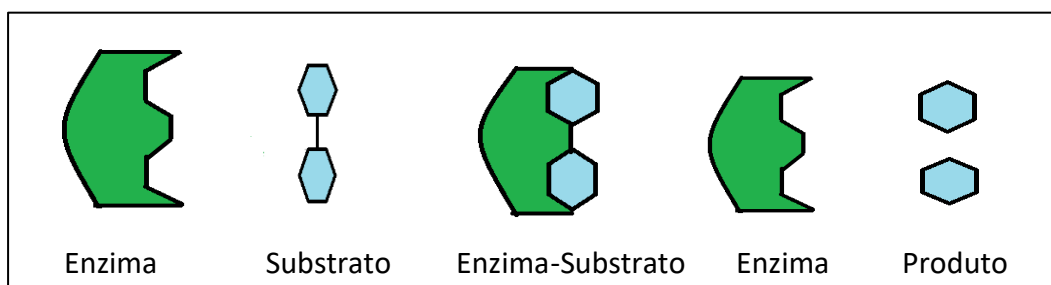
Scytalidium excreta a enzima xilanase, que muitas vezes está misturada com a celulase. (JOSHI; KHARE, 2012). A espécie *Scytalidium thermophilum* produz grande quantidade de enzima protease em meio alcalino junto com endocelulase, que poderá ser utilizada na hidrólise enzimática de material lignocelulósico sem a necessidade de um pré-tratamento.

3.7 Enzimas

Fungos fitopatogênicos produzem enzimas durante o processo de infecção nos vegetais. Essas enzimas podem ser utilizadas em vários segmentos de processos industriais (ORLANDELLI et al., 2012).

Enzimas são moléculas que aceleram as reações químicas de determinado organismo, sem alteração de sua estrutura em todo o processo (Figura 11), e podem ser de origem animal, vegetal ou microbiana.

Figura 11: Enzima participa da quebra da ligação glicosídica entre moléculas de glicose e no final da reação permanece com sua forma inalterada.



Fonte: O Autor.

As enzimas de origem microbiana têm mostrado grande potencial de produção, e têm contribuído com o desenvolvimento de bioprocessos industriais, como catalisadores

metabólicos (ADRIO; DEMAIN, 2014).

As enzimas são capazes de catalisar reações de isomerização, desidratação, oxirredução, transferências de grupos funcionais e hidrólise (NOMALDI; CALIK; ULUDAG, 2006), por isso, a produção enzimática têm se tornado um negócio bastante importante e lucrativo na biotecnologia.

A produção de enzimas é feita utilizando meio de cultura sólido ou líquido, conhecido por fermentação sólida ou submersa. Em meio sólido ou Fermentação semissólida (FSS), se desenvolve na superfície de materiais sólidos que tenha capacidade de absorver ou reter água, contendo ou não nutrientes, utilizando principalmente resíduos agroindustriais, por isso tem crescido a produção de enzimas por esse método, devido maior gasto de energia e de água no método submerso (JAIN; MORLOK; HENSON, 2013). No entanto, pesquisas relatam que a fermentação submersa apresenta maior potencial de produção de enzimas do que em meio fermentativo semissólido (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012).

Quanto às origens, as mais produzidas são as de origem microbiana, principalmente fungos filamentosos, pois apresentam rápido crescimento em meio de cultura, e sua produção não depende de flutuações sazonais, além de serem de fácil manipulação, apresentam grande variedade de atividade catalítica e ótimo rendimento (GURUNG et al, 2013).

As enzimas originárias de plantas e de animais apresentam menor estabilidade e menor atividade enzimática em relação às enzimas de origem microbiana, pois, as de origem microbiana, podem ter grande produtividade de enzimas, num curto espaço de tempo, por fermentação e também por apresentar grande diversidade bioquímica e facilidade em manipulação genética (ANBU et al., 2013).

A produção de enzimas é avaliada pelo índice de atividade enzimática dos microrganismos em meio sólido, que é indicada pelo diâmetro do halo de degradação. Em meio líquido a atividade enzimática é indicada pela liberação de 1 μmol de glicose que equivale a 1 unidade de atividade enzima - UAE (GHOSE, 1987).

A metodologia de superfície de resposta (RSM) pode ser utilizada para melhorar a produção de enzimas através da otimização dos parâmetros do processo. O RSM além de ser uma ferramenta estatística, envolve planejamento composto central, design Box-Behnken², e tem-se aplicado com sucesso para aumentar a hidrólise enzimática (SAINI et al., 2015).

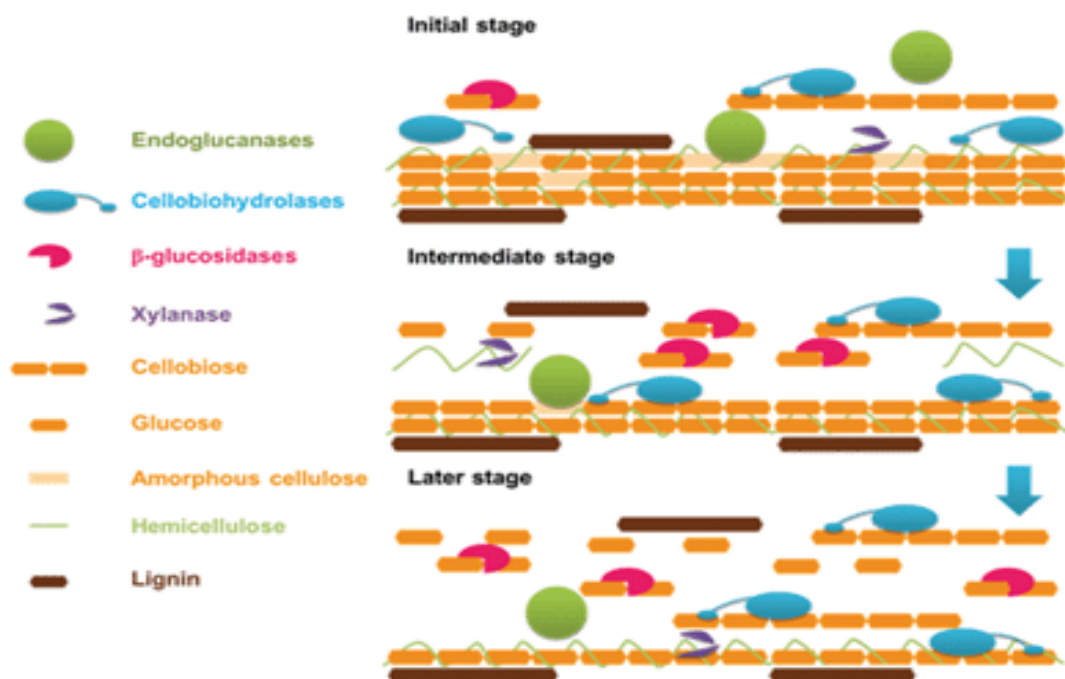
² Método experimental de superfície de resposta que analisa os pontos inferiores, superiores e seus pontos médios.

O que encarece a produção de enzima é a matéria prima, por isso é importante pesquisar fontes de produção que viabilizem a produção em escala industrial. Para utilizar enzimas em processo industrial é preciso entender a natureza das enzimas, aplicando condições adequadas nos processos de operação, caracterizando-as de acordo com a sua utilização. (PHITSUWAN; RATANA, 2015).

3.8 Celulase

Celulase é a enzima que degrada a celulose em açúcar de baixo peso molecular, chamado de glicose. É composta por um conjunto de enzimas conhecidas como exoglucanases, endoglucanases e β -glicosidases. As exoglucanases degradam a fibra da celulose nas extremidades, produzindo a celobiose que é um dissacarídeo formado por duas moléculas de glicose. Já as endoglucanases degradam a fibra da celulose internamente, e produz oligossacarídeos que são os açúcares formados de duas a dez moléculas de glicose. Enquanto as beta-glicosidases ocorrem à quebra a ligação glicosídica formando o monômero de glicose (Figura 12) (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010). A celulase é aplicada em diversos seguimentos industriais como nas indústrias de alimentos, química e de biocombustíveis.

Figure 12: modelo esquemático que representa um mecanismo de multicomponentes adequados para a hidrólise de lenhocelulose pelo complexo de celulase.



Fonte: DU et al., 2013.

Com a possibilidade de escassez do petróleo, pesquisadores no mundo inteiro têm buscado uma alternativa para a produção de combustíveis renováveis, entre elas está a hidrólise da biomassa lignocelulósica, que transforma a celulose em açúcares fermentescíveis através do complexo multienzimático da celulase para produzir etanol de segunda geração (SAINI et al., 2015). Porém, no processo de biorrefinaria da biomassa há um grande consumo de celulase no processo de sacarificação, tornando-se um grande obstáculo devido ao alto custo da enzima celulase (ZHANG; ZHANG, 2013).

No sentido de promover a expressão gênica, os açúcares resultantes da hidrólise atuam como indutores naturais de celulases. Um complexo é formado entre o açúcar final da hidrólise e a proteína celular que reprime a síntese da enzima, causando a repressão catabólica (GUNSALUS; BERTLAND; JACOBSON, 1967).

A densidade e a complexidade do material lignocelulósico o faz muito resistente a hidrólise, por isso precisa-se de pré-tratamentos químicos ou mecânicos e um posterior pós-tratamento a fim de evitar os inibidores de fermentação (MAURYA; SINGLA; NEGI, 2015). Os tratamentos químicos e o físico em altas temperaturas tornam-se inviáveis por causarem problemas de corrosão e por poder decompor os açúcares fermentescíveis, além de formar inibidores da fermentação. Por isso, a degradação enzimática por meio da celulase, apresenta-se como um meio eficaz de degradar a celulose em açúcares fermentescíveis, pois além de

evitar a formação de inibidores e corrosão, apresenta especificidade enzimática, que proporciona produtos com propriedades melhor definidas (SEVERO; MORAIS; RUIZ, 2010), como temperaturas e pH brandos, reduzindo a quantidade de subprodutos indesejáveis durante o processo (FERREIRA et al., 2013).

Pelo acima exposto, têm-se buscado microrganismos com alta atividade excretora de celulasas e que apresente melhor método de produção e baixo custo para escala industrial. Alguns pesquisadores têm proposto a integração da produção da celulase, fazendo o processo de hidrólise enzimática junto com o processo de fermentação com o objetivo de diminuir o consumo da celulase e aumentar a produtividade (LYND et al., 2008). Pesquisas de engenharia de microrganismos crescem a cada ano em busca de enzimas de alta eficiência catalítica e grande estabilidade térmica a fim de viabilizar o uso das enzimas em biorrefinaria (ZHANG; ZHANG, 2013).

Outra maneira que pode contribuir com a redução dos custos da produção de enzimas é a utilização de resíduos agroindustriais como substrato. Diversas pesquisas têm utilizado resíduo agroindustrial como substrato na produção de celulase, como casca de banana, casca de arroz, palha de sorgo, palha de milho, casca da manga (ESCAMILLA, et al., 2005; IYE; BILSBORROW, 2013; KUMAR et al., 2012). E outras diferentes fontes.

A hidrólise da celulose através da enzima celulase pode ser realizada por dois sistemas: o complexado e o não complexado. Para degradar a parede celular vegetal no meio enzimático é preciso utilizar um complexo enzimático chamado de celulosoma. Esse complexo é formado de uma proteína multimodular chamada cipA, que possui um módulo não catalítico chamado de coesina e módulos complementares chamados de doquerina. Esse complexo coh-doc têm superfícies que se ligam ao substrato e apresentam capacidade de clivar as cadeias de polissacáridos cristalinos, utilizando um mecanismo oxidativo que depende da presença de íons metálicos divalentes e um doador de elétrons. (KOLSTAD et al, 2010).

As celulasas podem ser endoativas, como endoglucanase, também conhecida como Cel7B ou exoativas, conhecidas como Celobiohidrolase I (Cel7A) e Celobiohidrolase II (Cel6A) (GAO, et.al. 2013).

Atualmente, as celulasas disponíveis comercialmente são oriundas de fontes fúngicas devido ao maior potencial de produção em relação às produzidas por bactérias e também por sua natureza extracelular o que torna mais fácil a sua extração (SAINÉ et al., 2015). A celulase produzida por fungos desenvolve-se melhor em condições de temperatura moderada,

apresentando inviabilidade de sua utilização nos processos de produção a altas temperaturas. A viabilidade da produção de celulase depende da relação complexa de fatores como tamanho do inoculo, pH, temperatura, presença de indutores, arejamentos e tempo de crescimento. (SETHI et al., 2013).

Enzimas podem ter sua estrutura alterada com a mudança brusca de pH, no entanto mudanças muito brandas de pH podem induzir a uma dissociação da enzima, podendo chegar à completa inativação (NELSON; COX, 2011). O tempo, temperatura de incubação e o tipo de unidade de atividade enzimática variam os resultados da produção de enzima.

O processo de fermentação submersa é o principal método de produção de enzimas, envolvendo concentrações de oxigênio equilibradas e o crescimento dos microrganismos num meio apropriado. (WANDERLEY; NEVES; ANDRADE, 2011).

Existe uma grande variedade de microrganismos na natureza que produzem celulases, dentre os principais estão os fungos filamentosos, e dentre estes estão os dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* como os maiores percussores (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do experimento e descrição do sistema

A pesquisa foi realizada em duas etapas, sendo a primeira realizada no Centro de Ciências Agrárias, no Laboratório de Microscopia e Genética de Microrganismos, da Universidade Federal de Alagoas, estabelecendo cultivo dos fungos fitopatogênicos da palma forrageira, *Scytalidium lignicola*, *Fusarium solani*, e *Colletotrichum gloeosporioides* e posterior determinação da atividade enzimática das celulasas em meio sólido, proposto por Benuhold (1922). A segunda etapa foi realizada no Centro de Tecnologia, no Laboratório de Tecnologia de Bebidas e Alimentos, da Universidade Federal de Alagoas, determinando atividade enzimática em meio líquido, proposto por Miller (1959), utilizando diferentes fontes de carbono. Os ensaios foram realizados em quadruplicata para cada fungo.

Nesta pesquisa foi realizada a metodologia de detecção por produtos da reação enzimática.

4.2 Cultivo dos Fungos

Os isolados de *Scytalidium lignicola*, *Fusarium solani*, e *Colletotrichum gloeosporioides*, foram cedidos pelo Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas. Os fungos foram repicados em quadruplicata em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e incubados em estufa de cultura a 28°C, por 48 horas, e também em meio SNA(Nutrientes Sintéticos-Ágar) por 144 horas à mesma temperatura.

4.3 Determinação da atividade enzimática em meio BDA

A atividade enzimática foi realizada através do método de coloração de vermelho congo (BENUHOLD, 1922), em meio contendo celulose, como fonte de carbono e solução de sais, composto por: KH_2PO_4 (0,73mol/L); ZnSO_4 (0,00027mol/L); FeCl_3 (0,00029mol/L); MnCl_2 (0,00028mol/L) e MgSO_4 (0,0083mol/L). Misturou-se 100mL a solução de sais com 1 μ L de solução traço e completou-se com 1L de água. Em seguida utilizou-se uma proveta e repartiu-se esta solução para 4 erlenmeyers. Adicionou-se em cada erlenmeyer 5,25g de Ágar e 0,5% de carboximetilcelulose. Esterilizou-se os meios em autoclave a 121°C por 15 minutos. Utilizou-se um furador de rolha, e fez-se vários discos de 6 mm de diâmetro na extremidade da colônia do fungo crescido em meio BDA. Com o auxílio de uma pinça metálica, transferiu-se um disco para cada placa contendo o substrato. Isolaram-se as placas

com papel filme e identificaram-se as placas de acordo com os respectivos fungos, em seguida colocou-se na estufa de cultura a 28°C, durante 48 horas.

Após o período do término de incubação, mediu-se o crescimento das colônias dos fungos utilizando um paquímetro. Em seguida, adicionou-se solução vermelho congo e deixou-se em repouso por 30 minutos. Depois, lavaram-se as placas para retirar o corante com uma solução de cloreto de sódio 1M.

A atividade da celulose foi observada através da presença de zonas claras, indicando halos de hidrólise no centro da colônia dos fungos. O índice enzimático (i.e.) foi calculado dividindo os valores das medidas do halo de hidrólise com o diâmetro da colônia.

4.4 Determinação da atividade enzimática em meio SNA

Foi utilizado o mesmo método do item 4.3, mudando-se apenas alguns sais e adicionando açúcares com a seguinte concentração: KH_2PO_4 (0,0073mol/L); KNO_3 (0,0098mol/L) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,0020mol/L); KCl (0,0027mol/L); Glicose (0,0011mol/L) e Sacarose (0,00058mol/L).

4.5 Determinação da atividade enzimática em meio líquido com diferentes substratos

4.5.1 Obtenção dos substratos

Para obtenção da farinha de palma, foram coletados dez cladódios da palma forrageira da espécie *Nopalea cochenillifera*, no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas. Após a colheita, os cladódios foram submersos em solução de 2,5% de cloro ativo durante 5 minutos. Em seguida, lavou-se com água corrente e secou-se em estufa à 60°C por 72 horas. Com o auxílio de uma faca, fatiou-se os cladódios e bateu no liquidificador por aproximadamente 2 minutos. Transferiu-se a farinha obtida para um frasco limpo e seco. Etiquetou-se e guardou-se até posterior análise.

O Farelo de trigo utilizado foi da marca All Bran, foi triturado e colocado num frasco limpo e etiquetado. Carboximetilcelulase P.A. utilizado nesta pesquisa foi da marca Dinâmica.

4.5.2 Cultivo dos fungos para análise em meio líquido

Os fungos testados foram previamente cultivados em meio BDA (batata dextrose ágar) por 5 dias, e posteriormente as regiões do meio sólido contendo hifas dos fungos foram transferidos para meio de sais descrito no item 4.3, e suplementados com 0,5% de diferentes fontes de celulose, adicionando farinha de palma, farelo de trigo e carboximetilcelulose.

Os cultivos foram mantidos em estufa com demanda biológica de oxigênio por 14 dias na estufa de cultura a 28°C. Os ensaios foram realizados em quadruplicata.

4.5.3 Determinação da Atividade Enzimática

Depois do período de incubação do meio líquido, as amostras foram colocadas em tubo falcon e centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos. Após esse tempo, a atividade enzimática foi determinada pela quantificação dos açúcares redutores que foi realizado pelo método espectrofotométrico, proposto por MILLER (1959), que utiliza a solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e leitura à 540 nm. Para isto, foi necessário o preparo de uma curva padrão de glicose nas concentrações de 0,5 a 4,0 g L⁻¹. A unidade de atividade enzimática (UEA) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcares redutores por minuto. A absorbância foi medida no espectrofotômetro a 540 nm.

Para análise de dados da produção de enzimas em meio sólido, foram analisadas duas variáveis independentes à atividade enzimática, com quatro repetições amostrais. Para determinar o efeito dessas variáveis sobre a produção de enzimas, foi conduzido um experimento em esquema fatorial 3 X 2, no qual três níveis de isolados (*Scytalidium lignicola*, *Fusarium solani*, e *Colletotrichum gloeosporioides*) e dois níveis para o meios de cultura (BDA e SNA).

Já para o meio líquido, foram analisadas três variáveis, com quatro repetições, conduzindo um esquema fatorial de 3 X 3 X 5, no qual três níveis de isolados (*Scytalidium lignicola*, *Fusarium solani*, e *Colletotrichum gloeosporioides*), três níveis para meios de cultura (Farelo de trigo, Farinha de Palma e Carboximetilcelulase) e cinco níveis para tempo (2, 4, 6, 8, e 10 minutos).

A análise de variância (ANOVA) para os modelos foi realizada e a importância do modelo foi examinada pelo teste estatístico de Fisher (teste F) através do teste de diferenças

significativas entre as fontes de variação nos resultados experimentais. O efeito constante no processo foi elaborado sobre o modelo de regressão linear ajustado sobre os dados experimentais encontrados. O software estatístico utilizado foi o SISVAR, versão 5.3 (Build 77).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividades enzimáticas em meio BDA e SNA

Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação das médias.

De acordo com a tabela 1, houve diferença significativa entre os isolados dentro de cada meio de cultura em relação ao índice enzimático. O coeficiente de variação (CV) foi de 9,32%, indicando uma ótima precisão experimental (FERREIRA, 2000).

Tabela 1 – Resumo da análise de variância e coeficiente de variação do efeito dos isolados dentro de cada meio de cultura em relação ao índice enzimático.

Causa da Variação	GL	QM
Meios de Cultura	1	-
Isolados dentro de BDA	2	696408**
Isolados dentro de SNA	2	0,162508**
Resíduo	18	0,0011590
Total	23	-
CV(%)	9,32	

** : Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

De acordo com a tabela 2, os isolados *Colletotrichum gloeosporioides* e *Scytalidium lignicola* não diferiram estatisticamente em relação ao índice enzimático (Média = 0,72), e superaram o isolado *Fusarium solani*, que não apresentou atividade enzimática dentro do meio de cultura BDA. Por outro lado dentro do meio de cultura SNA, o isolado *Fusarium solani*, teve o maior índice enzimático (0,60) e superou os demais isolados, enquanto que o isolado *Scytalidium lignicola*, apresentou menor índice enzimático (0,21). Já o isolado *Colletotrichum gloeosporioides*, teve o índice enzimático intermediário entre *Fusarium solani* e *Scytalidium lignicola*.

Tabela 2 – Efeito de isolados dentro de cada meio de cultura em relação ao índice enzimático.

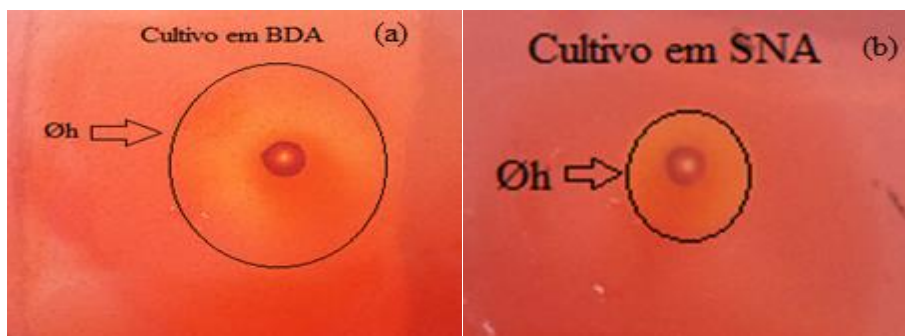
Isolados	Meios de Cultura ^{//}	
	BDA	SNA
<i>Fusarium solani</i>	0,00 a	0,60 c
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	0,71 b	0,31 b
<i>Scytalidium lignicola</i>	0,73 b	0,21 a
$\Delta 5\%$	0,07	0,07

//: As médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Compararam-se os resultados entre a interação dos isolados com os meios e observou-se que houve um crescimento acentuado de celulase excretado do isolado *Fusarium solani* quando cultivado em meio SNA, enquanto que nos isolados de *Scytalidium lignicola* e *Colletotrichum*

gloeosporioides, houve uma redução do halo de degradação em relação ao cultivo em meio BDA, conforme mostra a Figura 14, que mostra o halo de degradação do isolado de *Scytalidium lignicola* reduzido quando cultivado em meio SNA.

Figura 13: Øh = halo de hidrólise do isolado *Scytalidium lignicola*, sofreu redução quando cultivado em meio SNA, após 2 dias (a), e após 6 dias (b).



Fonte: O Autor.

Constatou-se também que o tempo de incubação dos isolados quando cultivados em meio SNA foi maior do que quando incubado em BDA. Enquanto que o tempo de incubação dos isolados em BDA foi de 2 dias, no meio SNA foi de 6 dias.

Avaliando o isolado *Fusarium* em outros trabalhos, nota-se que a falta de atividade da celulase no meio BDA, pode estar relacionada com o meio de cultivo de crescimento do fungo, pH, temperatura ou com a origem do fungo, pois de acordo Yuan et al., (2012), que avaliaram a produção de celulase por *Fusarium Oxysporum* cultivado em meio BDA, relataram que variaram a temperatura de incubação entre 25°C e 85°C, obtendo índice enzimático igual a 100 à 60°C, com pH igual a 4,8. Porém alterando o pH entre 2,8 à 10,3, com temperatura constante à 50°C, obtiveram melhor resultado com pH 5,3, relatando um alto rendimento de celulase.

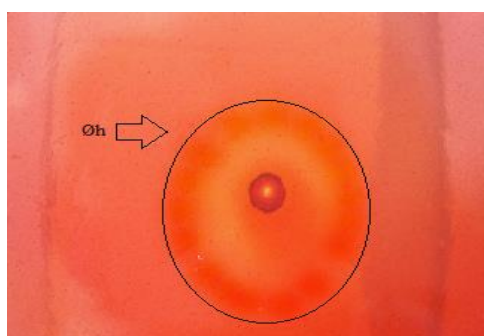
Por outro lado, Jahangeer et al., (2005), avaliaram a atividade enzimática de celulases do isolado *Fusarium* sp., da planta de trigo, cultivado em meio SDA (Sabouraud-dextrose-ágar) e obteve Índice Enzimático igual a 4,35. No entanto, esse resultado foi inferior em relação a outras estipes de fungos comparado pelos autores, por apresentar resultados próximo do índice enzimático recomendado, por isso, definiram a estirpe *Fusarium* sp., como baixo produtor de celulase.

O isolado de *Fusarium solani*, não apresentou halo de degradação quando cultivado em meio BDA, provavelmente, produziu somente a quantidade de enzima para o crescimento

da colônia. Já em meio SNA apresentou atividade enzimática (I.E. = 0,60), porém abaixo do índice recomendado pela literatura (I.E. ≥ 2).

Quando a atividade enzimática é maior que dois, uma zona clara fica em torno da colônia de crescimento, já quando menor que dois, fica no interior da colônia. Essa zona clara (Figura 13) é vista porque a solução de NaCl dilui o corante onde a celulose foi degradada em açúcar simples pela ação da enzima celulase (PONNAMBALAM; DEEPHI; GHOSH, et al., 2011).

Figura 14 – Observação da zona clara que indica o halo de atividade enzimática



Fonte: O Autor.

O isolado de *Colletotrichum gloeosporioides*, teve melhor desempenho na produção de celulases, em relação ao *Fusarium*, porém, o índice enzimático ficou abaixo do recomendado. No entanto, outros estudos mostram discrepância nos resultados, todavia, observa-se que tais diferenças de resultados podem estar na origem fúngica como também em diferentes meios de cultivo. Tozze Júnior et al., (2016), em sua pesquisa com *Colletotrichum* do abacate, cultivado em meio BDA, obtiveram resultados de alta atividade catalítica para celulose, onde a variação do halo de degradação foi entre 8 a 14 cm².

Acosta-Rodríguez et al., (2005), avaliaram *Colletotrichum lindermuthianum* e afirmaram que houve produção de enzimas celulolíticas quando celulose foi usado como fonte de carbono, atingindo máxima produção aos 13 dias de incubação.

Santoshkumar; Sujatha; Shivakrishna (2016), afirmaram que *Scytalidium thermophilum* SKESMBKU02, possui elevada atividade celulolítica a 45 ° C e pH entre 5,0 - 6,0. E que as atividades de celulose foram mais elevadas em meios contendo glucose como fonte de carbono seguido de xilose.

Jatinder; Chadha; Saini, (2006), relataram que palha de arroz induziu níveis máximos de celulase. Também afirmaram que a adição de etanol (1%, v/v) aumentou a produção de

endoglucanase em até oito vezes em *Scytalidium thermophilum*.

O isolado *Scytalidium lignicola*, apresentou rápido crescimento em meio BDA, e mesmo seu índice enzimático ter apresentando melhor resultado em relação aos outros isolados, observou-se que o índice enzimático ficou abaixo do recomendado pela literatura. No entanto, alguns trabalhos, mostram que fungos *Scytalidium* apresentam potencial para a produção de celulasas (SILVA et al., 2013). Muitas pesquisas utilizam *Scytalidium* para produzir xilanases, utilizando principalmente resíduos agroindustriais que apresenta boa produção dessas enzimas (JOSHI; KHARE, 2012).

A redução dos halos de degradações apresentados nos isolados de *Scytalidium lignicola* e *Colletotrichum gloeosporioides* no meio SNA, mostram que alguns microrganismos sofrem inibição de crescimento em meio de cultura contendo açúcares redutores e não redutores e nitrogênio, enquanto que, o isolado *Fusarium solani*, mostrou-se favorável para o crescimento de enzimas celulolíticas.

Joshi; Khare (2012) avaliaram que xilanase e celulase produzidas por *Scytalidium* têm suas atividades enzimáticas reprimidas na presença de glicose e frutose e também na presença de Sorbitol, manitol, glicerol e etanol quando colocados como suplementos no meio. Porém, utilizando-se de sacarose e celobiose, obtiveram um aumento de 22% a 35% na atividade de xilanase, e de 18% a 41% na produção de celulase. O meio BDA contém glicose e amido da batata como fonte de energia, enquanto que o meio SNA contém glicose e sacarose.

Os índices enzimáticos dos isolados cultivados em meio BDA e SNA ficaram abaixo de 2. Em meio BDA o maior índice foi o do isolado *Scytalidium lignicola*, apresentado IE = 0,73. No meio SNA o maior índice enzimático foi do isolado *Fusarium solani*, com IE = 0,60.

Esses resultados indicam que a batata como fonte de nutriente e a glicose como fonte de açúcar simples não foram suficientes para o isolado *Fusarium solani* produzir enzima celulase, mas suficientes para os isolados *Colletotrichum gloeosporioides* e *Scytalidium lignicola*.

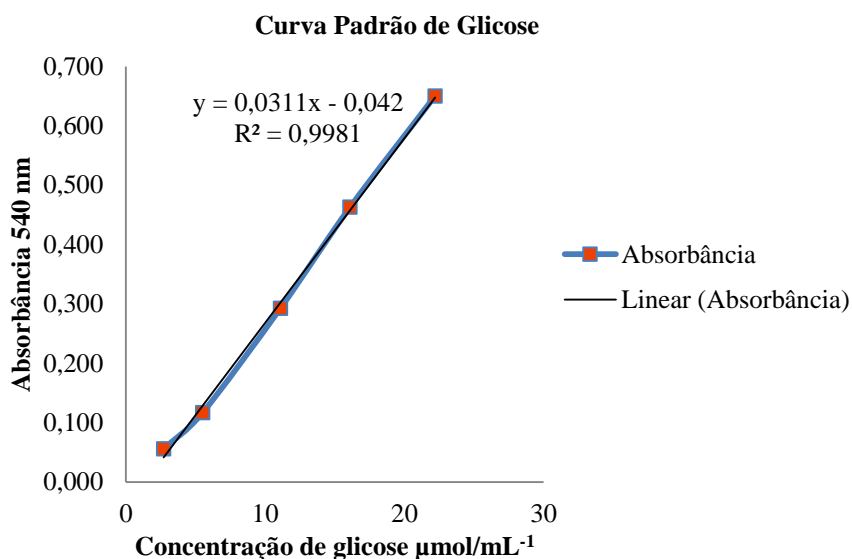
5.2 Atividades Celulolíticas em meio líquido

5.2.1 Curva padrão de glicose

Foi realizada curva padrão de glicose (Figura 15) para a determinação da atividade enzimática em meio líquido, utilizando o método DNS em espectrofotômetro, proposto por

Miller (1959).

Figura 15: Curva padrão de glicose proposta por Miller (1959), utilizada para quantificar atividade enzimática.



Fonte: O Autor.

A atividade enzimática foi determinada comparando as concentrações conhecida da solução de glicose da solução padrão com a solução de concentração desconhecida formada (ROCHA; TEIXEIRA, 2004).

A equação foi formulada por regressão da absorbância pela concentração, formando uma equação linear, devido o gráfico mostrar uma relação diretamente proporcional entre a concentração e a absorbância e a curva ficar próximo de uma reta, como explica a lei de Lambert-Beer. R^2 indica o valor de erros de medida experimental, que no caso da equação linear da reta o limite aceitável é 0,95. O valor de R^2 vai até 1. Quanto mais próximo de 1, mais reta será a curva (MARK; WORKMAN-JUNIOR, 2003).

A concentração de glicose excretada pelas enzimas dada pela absorbância a 540nm, foi convertida em $\mu\text{mol/mL}^{-1}$ para quantificar a atividade enzimática.

5.2.2 Determinação das atividades celulolíticas em meio líquido com diferentes substratos

Na avaliação do potencial celulolítico dos isolados, empregaram-se as três diferentes fontes de carbono e cinco variações de tempo, observou-se na análise de variância que houve diferença significativa de 1% de probabilidade entre os isolados e entre os substratos em relação a UEA.

Segundo a tabela 3, houve diferença significativa a 1% de probabilidade para as regressões linear, quadrática e de quarto grau em relação a UEA, indicando que a equação de quarto grau explica a UEA em função dos tempos de avaliação. Observou-se também a diferença significativa a 1% de probabilidade entre as interações Isolado x Substrato (I X S), Isolado x Tempo de Avaliação (I X TA), Substrato x Tempo de Avaliação (S X TA) e Isolados x Substratos x Tempo de Avaliação (I X S X TA), em relação a UEA, indicando que existe dependência entre os três grupos de tratamentos avaliados.

Tabela 3 – Resumo da análise de variância e coeficiente de variação do efeito de isolados em diferentes substratos avaliados em diferentes tempos em relação a UEA.

Causa da Variação	GL	QM
Isolados (I)	2	16,889887**
Substratos (S)	2	6,268962**
Tempos de Avaliação (TA)	(4)	-
Regressão Linear	1	118,622840**
Regressão Quadrática	1	1,552224**
Regressão Cúbica	1	0,117361 ^{ns}
Regressão de 4º Grau	1	1,212650**
Interação I X S	4	12,137473**
Interação I X TA	8	0,410594**
Interação S X TA	8	0,578521**
Interação I X S X TA	16	0,351883**
Resíduo	135	0,101258
Total	179	-
CV (%)		9,43

** : Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

ns: Não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

A Tabela 4 e as figuras 16, 17 e 18, mostram que dentro do substrato carboximetilcelulase o isolado *Colletotrichum gloeosporioides* teve maior UEA e deferiu dos demais isolados, enquanto que o isolado *Fusarium solani* teve menor UEA. Por outro lado, o isolado *Scytalidium lignicola* teve o valor de UEA intermediário entre os outros dois isolados.

Tabela 4 – Efeito dos isolados dentro do substrato carboximetilcelulase em relação a UEA.

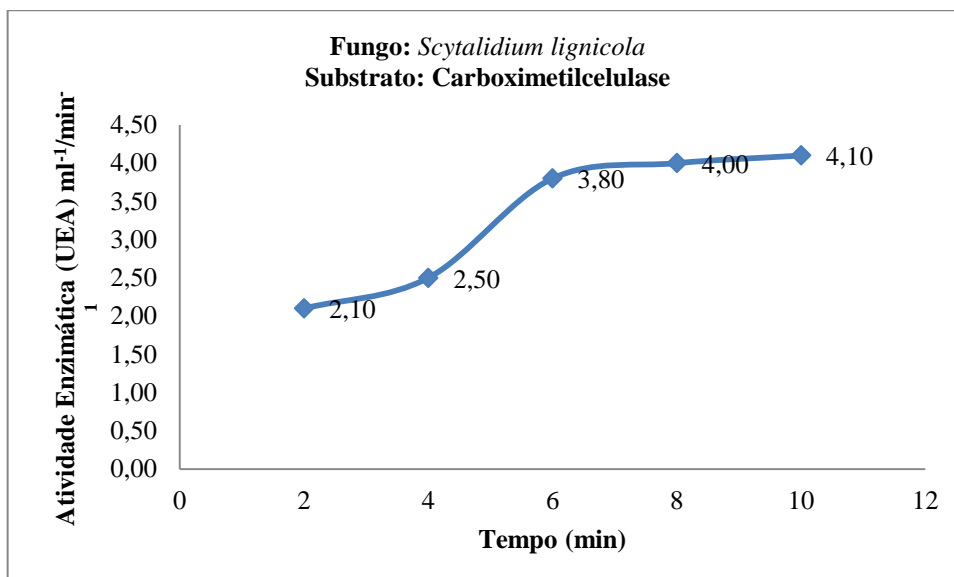
Isolados	Substrato
	CMC*
<i>Fusarium solani</i>	3,03a
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	4,80c
<i>Scytalidium lignicola</i>	3,30b
Δ5%	0,24

*: CMC - Carboximetilcelulase.

Utilizando carboximetilcelulase como substrato, observa-se que a menor atividade Enzimática para *Scytalidium lignicola* foi de 2,10 e a maior foi de 4,10 UEA. Para

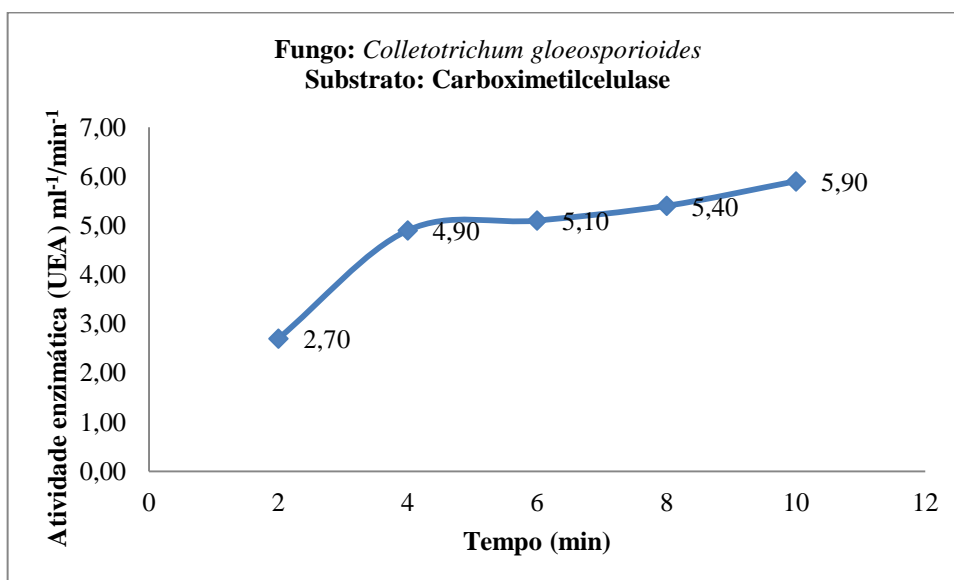
Colletotrichum gloeosporioides a menor atividade enzimática foi de 2,70 e a maior foi de 5,9 UEA. Já para o isolado *Fusarium solani* a menor atividade foi de 1,40 e a maior foi de 4,30 UEA.

Figura 16: Atividade enzimática do isolado *Scytalidium lignicola*. em meio de cultura líquido, suplementado com 0,5% de carboximetilcelulase.



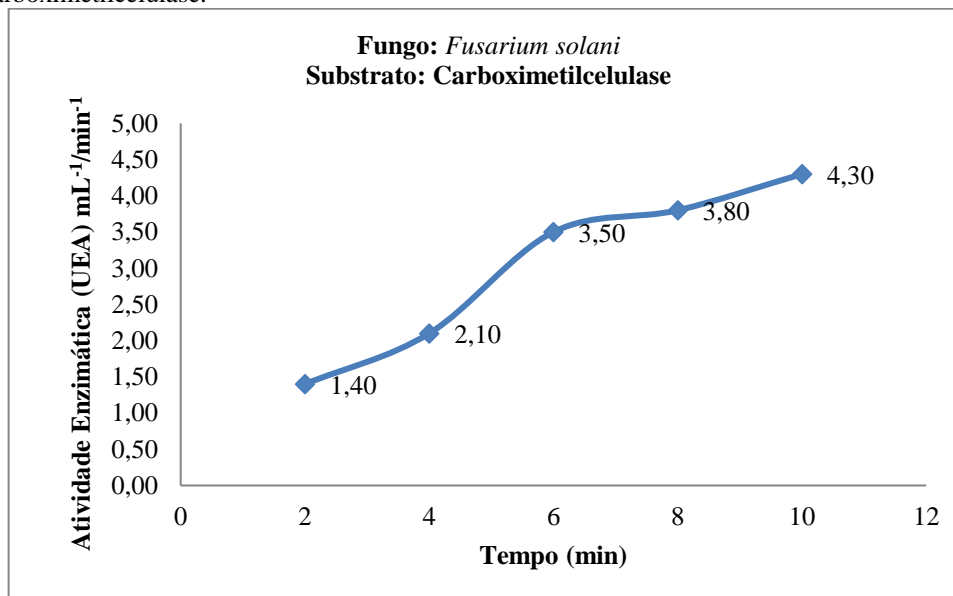
Fonte: O Autor.

Figura 17: Atividade enzimática do isolado *Colletotrichum gloeosporioides* em meio de cultura líquido, suplementado com 0,5% de carboximetilcelulase.



Fonte: O Autor.

Figura 18: Atividade enzimática do isolado *Fusarium solani* em meio de cultura líquido, suplementado com 0,5% de carboximetilcelulase.



Fonte: O Autor.

Para o substrato farinha de palma, a tabela 5 e as figuras 19, 20 e 21 mostram que o isolado *Scytalidium lignicola* teve a maior UEA e deferiu dos demais isolados, enquanto que o isolado *Fusarium solani* apresentou menor valor de UEA. Por outro lado, o isolado *Colletotrichum gloeosporioides* teve valor de UEA intermediário entre os outros dois isolados.

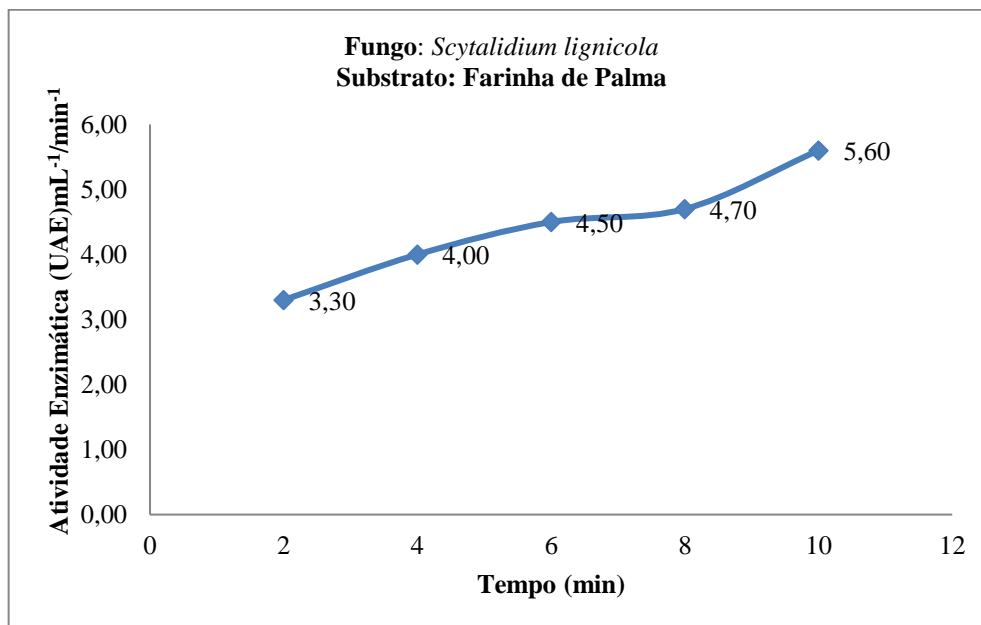
Tabela 5 – Efeito dos isolados dentro do substrato farinha de palma em relação a UEA.

Isolados	Substrato //
	FP*
<i>Fusarium solani</i>	2,50a
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	3,15b
<i>Scytalidium lignicola</i>	4,42c
Δ5%	0,24

*FP: Farinha de Palma Forrageira.

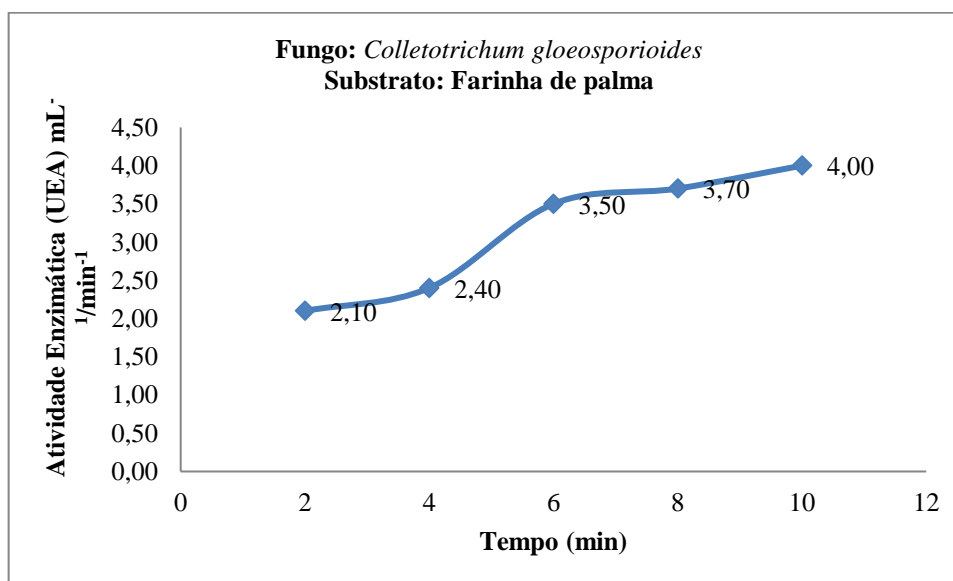
Utilizando farinha de palma como substrato, observa-se que a menor atividade Enzimática para *Scytalidium lignicola* foi de 3,30 e a maior foi de 5,60 UEA. Para *Colletotrichum gloeosporioides* a menor atividade enzimática foi de 2,10 e a maior foi de 4,00 UEA. Já para o isolado *Fusarium solani* a menor atividade foi de 1,60 e a maior foi de 3,30 UEA.

Figura 19: Atividade enzimática do isolado *Scytalidium lignicola* em meio de cultura líquido, suplementado com 0,5% de farinha de palma forrageira.



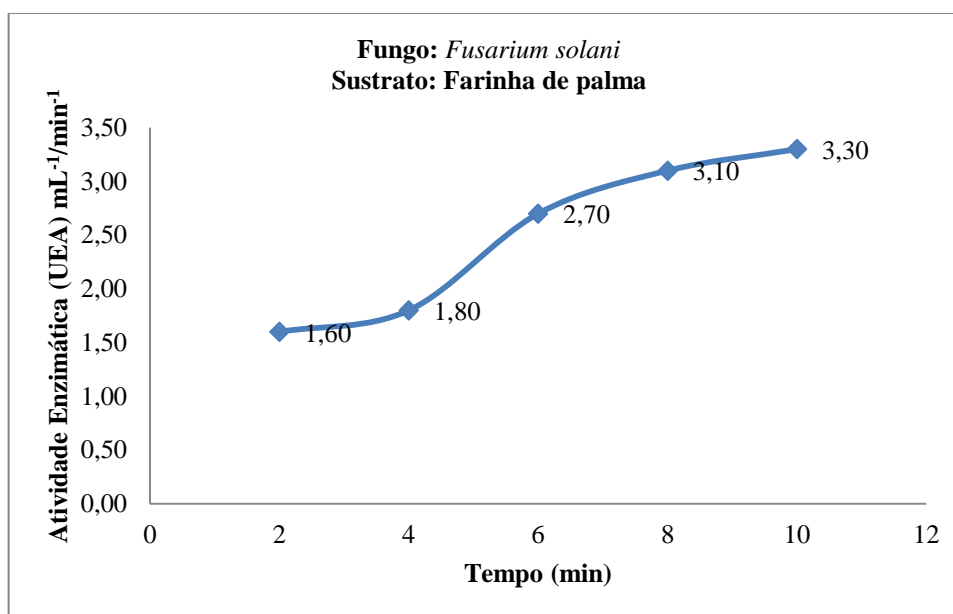
Fonte: O Autor.

Figura 20: Atividade enzimática do isolado *Colletotrichum gloeosporioides* em meio de cultura líquido, suplementado com 0,5% de Farinha de palma forrageira.



Fonte: O Autor.

Figura 21: Atividade enzimática do isolado *Fusarium solani* em meio de cultura líquido, suplementado com 0,5% de Farinha de palma forrageira.



Fonte: O Autor.

Para o substrato farelo de trigo, a tabela 6 e as figuras 22, 23 e 24 mostram que o isolado *Scytalidium lignicola* apresentou maior valor de UEA e deferiu-se dos demais substratos. Os outros dois isolados não deferiram entre si, apresentando os menores valores de UEA.

Tabela 6 – Efeito dos isolados dentro do substrato farelo de trigo em relação a UEA.

Isolados	Substrato //
	FT*
<i>Fusarium solani</i>	2,79a
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	2,83a
<i>Scytalidium lignicola</i>	3,58b
$\Delta 5\%$	0,24

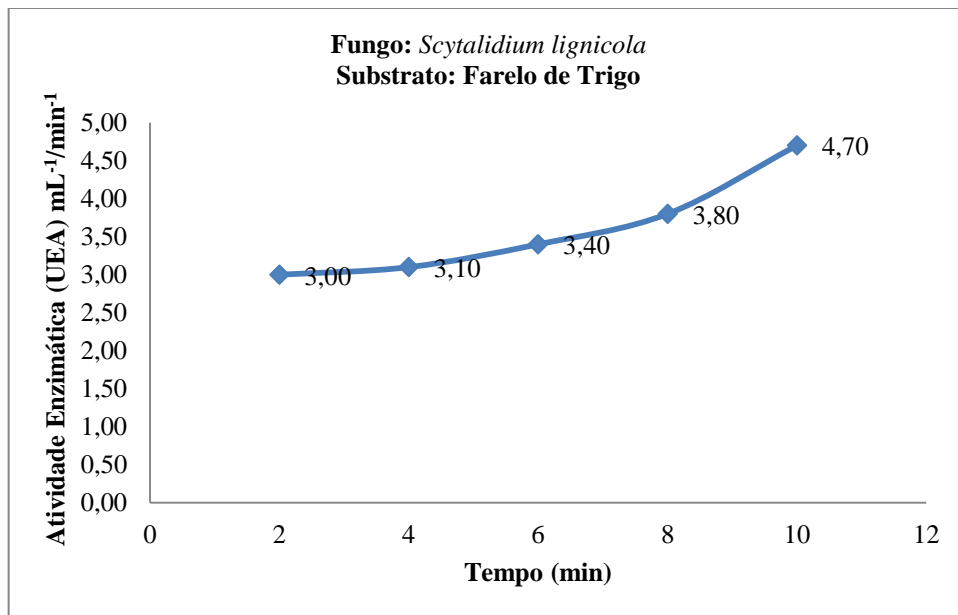
//: As médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Turkey a 5% de probabilidade.

*FT: Farelo de Trigo.

Já utilizando farinha de palma como substrato, observa-se que a menor atividade Enzimática para *Scytalidium lignicola* foi de 3,00 e a maior foi de 4,70 UEA. Para *Colletotrichum gloeosporioides* a menor atividade enzimática foi de 1,70 e a maior foi de 3,90

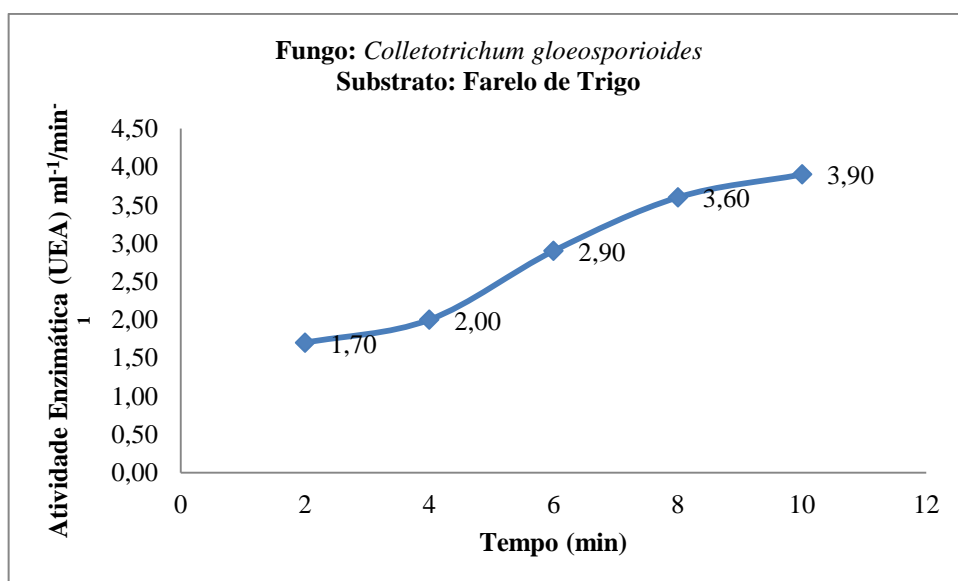
UEA. Já para o isolado *Fusarium solani* a menor atividade foi de 1,50 e a maior foi de 3,90 UEA.

Figura 22: Atividade enzimática do isolado *Scytalidium lignicola* em meio de cultura líquido, suplementado com 0,5% de farinha de farelo de trigo.



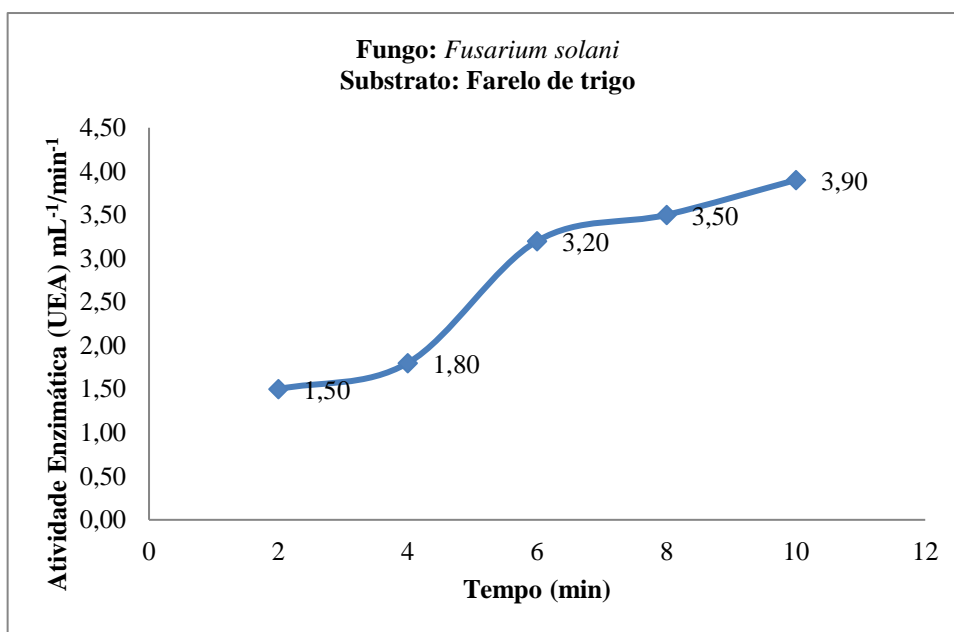
Fonte: O Autor.

Figura 23: Atividade enzimática do isolado *Colletotrichum gloeosporioides* em meio de cultura líquido, suplementado com 0,5% de farelo de trigo.



Fonte: O Autor.

Figura 24: Atividade enzimática do isolado *Fusarium solani* em meio de cultura líquido, suplementado com 0,5% de farelo de trigo.



Fonte: O Autor.

Já os resultados em relação ao tempo de incubação (Tabela 5), mostraram que no tempo de 2 minutos o isolado *Scytalidium lignicola* apresentou o maior valor de UEA deferindo-se dos demais isolados, enquanto que o isolado de *Fusarium solani* apresentou o menor valor de UEA. Por outro lado, o isolado *Colletotrichum gloeosporioides* apresentou valor intermediário entre os outros dois isolados, deferindo-se estatisticamente destes.

Tabela 7 – Efeitos de isolados dentro de cada tempo de avaliação em relação a UEA.

Isolados	Tempos de Avaliação (min.)				
	2	4	6	8	10
<i>Fusarium solani</i>	1,50a	1,91a	3,14a	3,47a	3,84a
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	2,17b	3,11b	3,84b	4,23b	4,61b
<i>Scytalidium lignicola</i>	2,80c	3,18b	3,88b	4,16b	4,80b
$\Delta 5\%$	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31

//: Nas colunas, as médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Turkey a 5% de probabilidade.

Nos tempos de 4, 6, 8, e 10 minutos, os isolados *Coletotrichum gloeosporioides* e *Scytalidium lignicola* não diferiram estatisticamente entre si, e apresentaram os maiores valores de UEA. No entanto, o isolado *Fusarium solani* diferiu estatisticamente destes, apresentando menor valor de UEA.

Todos os isolados apresentaram potencial de produção de enzimas em meio líquido que segundo a literatura é acima de 1 μmol de glicose por $\text{mL}^{-1}\text{min}^{-1}$. Sendo que, o de maior destaque foi o isolado de *Scytalidium lignicola*, apresentando maior produção em menor tempo de resposta.

Os isolados *Scytalidium lignicola* e *Coletotrichum gloeosporioides*, apresentaram melhor desempenho que o isolado *Fusarium solani*. A variação do substrato mostra o quanto específico um substrato é para cada tipo de fungo utilizado para a produção de enzimas.

Como todos os isolados, apresentaram crescente atividade enzimática, é necessário fazer uma análise do tempo de incubação para verificar uma ótima produção de celulases e o seu tempo de decaimento.

Os substratos de farinha de palma, farelo de trigo e carboximetilcelulose apresentaram bons resultados na produção de enzimas para os isolados de *Coletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani* e *Scytalidium lignicola*. Porém, é necessário substituir os reagentes utilizados como macro e micronutrientes por resíduos agroindustriais que apresente desempenho parecido com os produtos químicos, a fim de reduzir os custos nos processos de produção de enzimas (CUNHA et al., 2016).

A maioria das pesquisas com *Scytalidium* para produção de celulases utilizam *Scytalidium* termofílico. Santoshkumar et al., (2016) utilizaram a estirpe *Scytalidium thermophilum SKESMBKU02* de esterco de gado. Em meio contendo glicose como fonte de carbono e peptona como fonte de nitrogênio obtiveram alta atividade enzimática a 45°C e pH entre 5,0 e 6,0. Também relataram que celulases produzidas pela estirpe *Scytalidium thermophilum skesmbku02* foi altamente estável em pH 8,0 e temperatura de 75°C, mostrando-se mais estável em altas temperaturas e pH alcalino.

Bhavsar et al. (2015), cultivaram a estirpe *Aspergillus niger* em meio BDA e relataram que variaram o pH entre 4,0 e 6,5 e obtiveram melhor produtividade de celulases com pH igual a 4,8. Também variou a temperatura entre 28°C e 30°C, obtendo maior produção de celulases à 28°C. Por isso, neste trabalho, utilizou-se temperatura de incubação a 28 °C, por se tratar de microrganismos mesofílicos, e pH 4,8.

Jatinder et al. (2006), avaliaram a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulases

do fungo *Scytalidium thermophilum* de compostagem do solo, utilizando palha de arroz e farelo de trigo como substrato obtendo altos valores de celulases e xilanases. A produção de celulases da estirpe *Scytalidium lignicola* avaliada neste trabalho é inferior aos resultados relatados por Santoshkumar; Sujatha; Shivakrishna (2016), e Jatinder et al. (2006).

Ramanathan; Banupriyaand; Abirami (2010), relataram que *Fusarium oxysporum* da planta de tomate apresentou melhor da atividade enzimática de celulase com pH igual a 6 alcançando 0,6 UI/mL, enquanto que com pH igual a 5 a atividade de celulase foi apenas de 0,2 UI/mL. Relataram ainda, que a temperatura de incubação que apresentou melhor atividade enzimática foi 50 °C. Avaliando glicose, celulose, sacarose e lactose como fonte de carbono, obtiveram melhor resultado com lactose. Também avaliaram que os cátions sódio, magnésio e sal EDTA agem como inibidores na produção de celulase. Quanto ao tempo de fermentação no estado líquido, relataram um aumento gradativo até o oitavo dia, e que depois disso, houve redução da atividade enzimática.

Entretanto YUAN et al., (2012), em sua pesquisa, relataram que a estirpe *Fusarium oxysporum* H57-1, da planta de linho, teve melhor atividade celulolítica à 60 °C com pH igual a 4,8.

Morais et al., (2016), avaliaram a produção de enzimas celulase, utilizando várias estipes de *Fusarium* e *Colletotrichum* da mandioca, utilizando carboximetilcelulase a 1% como fonte de carbono e pH igual a 5, relataram valores máximo de 23,13 U/mL de FPAse e para CMCase 1,20 U/mL, para a estipe de *Colletotrichum gloeosporioides* URM 7124 e apenas 5,89 U/mL de FPAse para *Fusarium oxysporum* URM 7082. Esses resultados, assim como os resultados apresentados neste trabalho, mostra que a estirpe *Fusarium* apresenta menor atividade enzimática para celulases que as outras estirpes de fungos.

A produção de celulases da estirpe *Scytalidium lignicola* avaliada neste trabalho, é inferior aos resultados relatados por Santoshkumar; Sujatha; Shivakrishna (2016), e Jatinder et al.. (2006). Já o resultado de celulases por *Colletotrichum gloeosporioides*, também foi inferior ao que foi relatado por Morais et al., (2014). Somente a atividade enzimática de celulases por *Fusarium solani*, mostrou-se compatível com os resultados de Morais et al., (2016).

Esta pesquisa mostrou a eficiência de resíduos agroindustriais, farinha de palma forrageira e farelo de trigo utilizado como substrato na produção da enzima celulase, que podem reduzir o custo dos processos industriais, viabilizando a produção em escala industrial.

Utilizou-se farinha de palma como substrato, porque os fungos utilizados neste

trabalho foram da palma forrageira. Já o uso de farelo de trigo foi utilizado devido a relatos de alta produtividade de celulases utilizando esse substrato. (SILVA et al., 2005; COURI et al., 2000).

6 CONCLUSÕES

A avaliação da atividade enzimática pelo método de vermelho congo apresentou resultados divergentes dos isolados quando cultivados em meio BDA e SNA. No meio BDA, a atividade enzimática é mais propícia para *Scytalidium lignicola* e *Coletotrichum gloeosporioides* que não deferiram estatisticamente na produção de celulases, enquanto que para *Fusarium solani* não é recomendado, por não ter apresentado atividade enzimática. Porém, deve-se testar outros valores de pH e temperatura para *Scytalidium lignicola* e *Coletotrichum gloeosporioides*, pois poderá ser possível melhorar os resultados, conforme constatado em outras literaturas.

O meio SNA pode ser indicado para a produção de celulases por *Fusarium solani*, porém, deve-se avaliar melhor desempenho alterando pH, temperaturas e tempo de incubação. Enquanto que *Scytalidium lignicola* e *Coletotrichum gloeosporioides*, não é indicado para este tipo de meio, por ter apresentado redução da atividade enzimática.

A produção de enzimas pelo método de fermentação submersa apresentou melhores resultados para os três isolados. No entanto o isolado *Fusarium solani*, demonstrou menor produção de enzimas do que *Scytalidium lignicola* e *Coletotrichum gloeosporioides*, nos substratos carboximetilcelulase e farinha de palma e intermediário com farelo de trigo, por não deferir do isolado *Coletotrichum gloeosporioides*, porém não sobressaiu ao isolado *Scytalidium lignicola*.

O isolado *Scytalidium lignicola* apresentou melhor produção enzimática em relação aos demais isolados; nos substratos farelo de trigo e farinha de palma, enquanto que *Coletotrichum gloeosporioides* se sobressaiu em carboximetilcelulase.

Os resultados evidenciam grande potencial dos substratos farelo de trigo e farinha de palma na produção de celulases e que podem ser melhorados alterando valores de pH, temperatura e tempo de incubação.

Os fungos fitopatogênicos da palma forrageira apresentam-se como grande potencial

na produção de enzimas celulasas, na produção em meio líquido que podem ser empregado em diversos segmentos industriais.

7 PESPECTIVAS

- 1 – Realizar a purificação da enzima celulase;
- 2 – Determinar a contagem de células viáveis;
- 3 – Determinar o número de endósporos;
- 4 – Caracterizar o extrato bruto da enzima celulase;
- 5 – Determinar a massa molecular da celulase;
- 6 – Determinar a concentração de proteína;
- 7 - Realizar análise de DNA;
- 8 – Avaliar diferentes temperaturas e pH no meio de indução de enzimas;
- 9 – Avaliar outros meios de cultura para indução de celulasas.
- 10 – Avaliar e comparar produção de celulase em fermentação sólida e submersa.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHYUTHAN, K.E.; ACHYUTHAN, A.M.; ADAMS, P.D.; DIRK, S.M.; HARPER, J.C.; SIMMONS, B.A.; SINGH, A.K. Supramolecular Self-Assembled Chaos: Polyphenolic Lignin's Barrier to Cost-Effective Lignocellulosic Biofuels. **Molecules**. 15. 8641-8688. 2010.

ACOSTA-RODRÍGUEZ, I.; PIÑÓN-ESCOBEDO, C.; ZAVALA-PÁRAMO, M.G.; LÓPEZ-ROMERO, E.; CANO-CAMACHO, H. Degradation of cellulose by the bean-pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. Production of extracellular cellulolytic enzymes by cellulose induction. **Antonie Van Leeuwenhoek**. 87(4). 301-10. 2005.

ADRIO, J.L.; DEMAIN, A.L. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. **Biomolecules**. 4(1): 117–139. 2014.

AGUIRRE, G.G.; VANZINNI-ZAGO, V.; QUIROZ-MERCADO, H. Growth of *Scybalidium* sp. in a counterfeit bevacizumab bottle. **Indian J Ophthalmol**. 61(9): 523–525. 2013.

ALMEIDA, T. F.; CAMARGO, M.; PANIZZI, R. C. Efeito de extratos de plantas medicinais no controle de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da flor preta do morangueiro. **Summa phytopathol**. vol.35, n.3. Botucatu. 2009.

ALVES, A.A.C., SILVA, A.F. Cultivo da Mandioca para a Região Semiárida. **Embrapa**. 2003.

Disponível:<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_semiarido/doencas.htm>. Acesso em: mar. 2016.

ANBU, P.; GOPINATH, S.C.B.; CIRAN, A.C.; CHAULAGAIN, B.P. Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine. **BioMed Research International**. v. 2013. p.2. 2013.

ANG, S.K.; SHAZA, E.M.; ADIBAH, Y.; SURAINI, A.A.; MADIHAH, M.S. Production of

cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. **Process Biochemistry**. V. 48, p. 1293–1302. 2013.

BARBOSA, L.C.A.; MALTHA, C.R.A.; SILVA, V.L.; COLODETTE, J.L. Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (PI - CG/EM). **Quím. Nova**. vol.31. no.8. São Paulo. 2008.

BENOIT, I.; CULLETON, H.; Zhou, M.; DiFalco, M.; Aguilar-Osorio, G.; Battaglia, E.; Bouzid, O.; Brouwer, C.P.J.M.; El-Bushari, H.B.O.; Coutinho, P.M.; Gruben, B.S.; HILDÉN, K.S.; Houbraken, J.; Barboza, L.A.J.; Lévassieur, A.; Majoor, E.; Mäkelä, M.R.; NARANG, H.M.; TREJO-AGUILAR, B.; BRINK, J.V.D.; VANKUYK, P.A.; WIEBENGA, A.; MCKIE, V.; MCCLERY, B.; TSANG, A.; HENRISSAT.; B.; VRIES, R.P. Closely related fungi employ diverse enzymatic strategies to degrade plant biomass. **Biotechnology for Biofuels**. 8:107. 2015.

BENUHOLD, H. Eine spezifische mit-amilóide farbung Kongorot. **Munchem Med Wschuschr**. 69. 1537-1538. 1922.

BEZERRA, J.D.; SANTOS, M.G.; SVEDESE, V.M.; LIMA, D.M.; FERNANDES, M.J.; PAIVA, L.M.; SOUZA-MOTTA, C.M. Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. **World J Microbiol Biotechnol**. 28(5):1989-95. 2012.

BHAVSAR, N.H.; RAOL, B.V.; AMIN, S.S.; RAOL, G.G. Production, Optimization and Characterization of Fungal Cellulase for Enzymatic Saccharification of Lignocelulosic Agro-waste. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. Volume 4. Number 3. pp. 30-46. 2015.

BOMFIM, A.G.J.; ALBUQUERQUE, G.M.R.; BEZERRA, J.D.P.; SILVA, D.C.V.; SVEDESE, V.M.; PAIVA, L.M.; SOUZA-MOTTA, C.M. Phytopathogenic fungi from *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. cultivated in area of tropical dry forest in Brazil. **Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas**. . Santiago. V. 10, n 2. p.27. 2013.

CARVALHO, N.L. RESISTÊNCIA GENÉTICA INDUZIDA EM PLANTAS CULTIVADAS. **REGET**. v(7). nº 7. p. 1379-1390. Passo Fundo. 2012.

CASTRO, A.M.; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n.1, p.181-188, 2010.

CAVALCANTE, L.A.D.; SANTOS, G.R.A.; SILVA, L.M.; FAGUNDES, J.L.; SILVA, M.A. Respostas de genótipos de palma forrageira a diferentes densidades de cultivo. **Pesq. Agropec. Trop.**, Goiânia, v. 44, n. 4, p. 424-433. 2014. Disponível em: <www.agro.ufg.br/pat>. Acesso em: 24/04/2016.

CLASEN, C.; KULICKE, W.M. Determination of viscoelastic and rheo-optical material functions of water-soluble cellulose derivatives. *Prog. Polym. Sci.* 26. 1839-1919. Hamburg. 2001.

COURI, S.; TERZI, S. da C.; PINTO, G. A. S.; FREITAS, S. P.; da COSTA, A. C. A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**. v.36, p.255-261. 2000.

CUNHA, F.M.; ESPERANÇA, M.N.; ZANGIROLAMI, T.C.; BADINO, A.C.; FARINAS, C.S. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulose. **Bioresource Technology**. p. 270-274. 2012.

CUNHA, F.M.; VASCONCELLOS, V.M.; FLORENCIO, C.; BADINO, A.C.; FARINAS, C.S. On-Site Production of Enzymatic Cocktails Using a Non-conventional Fermentation Method with Agro-Industrial Residues as Renewable Feedstocks. **Waste and Biomass Valorization**. v.7. p. 1-10. 2016.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; SYED, T.A.; QIN, W. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. **Int. J. Biochem. Mol. Biol.** 1(1): 36–50. 2010.

DU, R.; HUANG, R.; SU, R.; ZHANG, M.; WANG, M.; YANG, J.; QI, W.; HE, Z. Enzymatic hydrolysis of lignocellulose: SEC-MALLS analysis and reaction mechanism. **RSC Advances**. v. 3, p.1871-1877. 2013.

EL-KAZZAZ, M.K.; EL-FADLY, G.B.; HASSAN, M.A.A.; EL-KOT, G.A.N. Identification of some *Fusarium* spp. using molecular biology techniques. **J. Phytopathol.**, v.36. n.1-2. p. 57–69. 2008.

ESCAMILLA, G.C; SANTOS-HERNÁNDEZ, J.M; ANDRADE-CANTO, S; GÓMEZ-CRUZ, R. Obtención de Celulosa a Partir de los Desechos Agrícolas del Banano. **Información Tecnológica**. Vol. 16 N°1. p.83-88. La Serena. 2005.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613 p.

FERREIRA, S.M.; CALIARI, M.; SOARES JÚNIOR, M.S.; BELEIA, A.D.P. PRODUÇÃO

DE AÇUCARES REDUTORES POR HIDRÓLISE ÁCIDA E ENZIMÁTICA DE FARINHA DE ARROZ. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.15, n.4, p.383-390, 2013

FIGTREE, M.; WEEKS, K.; CHAN, L.; LEYTON, A.; BOWES, A.; GIUFFRE, B.; SULLIVAN, M.; HUDSON, B.J. *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* causing deep soft tissue mycosis following a penetrating injury. **US National Library of Medicine National Institutes of Health**. v. 2. p. 40-3. 2013.

FLORES-FLORES, R.; VALLE, M.G.V.; LEÓN-RODRIGUEZ, R.; FLORES-MOCTEZUMA, H.E.; HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.N. Identification of fungal species associated with cladode spot of prickly pear and their sensitivity to chitosan. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v.161. p. 544-552. 2013.

GAO, D.; CHUNDAWAT, S.P.S.; SETHI, A.; BALAN, V.; GNANAKARAN, S.; DALE, B.E. Increased enzyme binding to substrate is not necessary for more efficient cellulose hydrolysis. **PNAS**. vol. 110. no. 27. 2013.

GHOSE, T.K. MEASUREMENT OF CELLULASE ACTIVITIES. **Pure & Appl. Chem.**, Vol. 59, No. 2, p. 257—268, 1987.

GUERRERO, I.; MOHALI-CASTILLO, S.R.; MARÍN-MONTOYA, M.A.; PINO-MENESINI, H.B. Caracterización y variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* en plantaciones de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) en Venezuela. **Tropical Plant Pathology**. Brasília vol.37 no.2 2012.

GUNSALUS, I.C.; BERTLAND, A.U.; JACOBSON, L.A. Enzyme induction and repression in anabolic and catabolic pathways. *Archiv für Mikrobiologie*. Vol. 59. p. 113–122. 1967.

GURUNG, N.; RAY, S.; BOSE, S.; RAI, V. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. **BioMed Research International**. v.2013. p.18. 2013.

IYE, E.L.; BILSBORROW, P.E. Cellulosic ethanol production from agricultural residues in Nigeria. **Energy Policy**. 63:207–214. 2013.

JAHANGEER, S.; KHAN, N.; JAHANGEER, S.; SOHAIL, M.; SHAHZAD, S.; AQEEL AHMAD, A.; SHAKEEL AHMED KHAN, S.A. SCREENING AND CHARACTERIZATION OF FUNGAL CELLULASES ISOLATED FROM THE NATIVE ENVIRONMENTAL SOURCE. **Pakistan Journal of Botany**. 37(3):739-748. 2005.

JAIN, A.; MORLOK, C.K.; HENSON, J.M. Comparison of solid-state and submerged-state fermentation for the bioprocessing of switchgrass to ethanol and acetate by *Clostridium phytofermentans*. **Appl. Microbiol Biotechnol.** 97(2):905-17. 2013.

JATINDER, K.; CHADHA, B.S. SAINI, H.S. Regulation of cellulase production in two thermophilic fungi *Melanocarpus* sp. MTCC 3922 and *Scytalidium thermophilum* MTCC 4520. **Enzyme and Microbial Technology.** Volume 38. Issue 7. Pages 931–936. 2006.

JOSHI, C.; KHARE, S. Induction of xylanase in thermophilic fungi *Scytalidium thermophilum* and *Sporotrichum thermophile*. **Brazilian Archives of Biology and Technology.** Curitiba vol.55 no.1 2012.

KALIA, S.; DUFRESNE, A.; CHERIAN, B.M.; KAITH, B.S.; AVÉROUS, L.; NJUGUNA, J.; NASSIOPOULOS, E. Cellulose-Based Bio- and Nanocomposites: A Review. **International Journal of Polymer Science.** V.2011. p.35. 2011.

KIKOT, G.; HOURS, R.; ALCONADA, T. Extracellular enzymes of *Fusarium graminearum* isolates. **Brazilian Archives of Biology and Technology.** Curitiba vol.53 no.4. 2010.

KOLSTAD, G.V.; WESTERENG, B.; HORN, S.J.; LIU, Z.; ZHAI, H.; SORLIE, M.; EIJSINK, V.G.H. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. **Science.** Vol.330. p.219-222. 2010. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/330/6001/219>>. Acesso em: 22/05/2016.

KUMAR, D; YADAV, K.K.; SINGH, M.; GARG, N. BIOCHEMICAL UTILIZATION OF AGRO-INDUSTRIAL LIGNOCELLULOSES RICH WASTE FOR CELLULASE PRODUCTION. **Research Journal of Agricultural Science**, 44 (2), Lucknow. 2012.

LEE, H. V.; HAMID, S. B. A.; ZAIN, S. K. Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process. **The Scientific World Journal.** Volume (2014), p.20. 2014.

LYND, L.R. LASER, M.S. BRANSBY, D. DALE, B.E. DAVISON, B. HAMILTON R , HIMMEL M , KELLER M , MCMILLAN JD , SHEEHAN J , WYMAN CE (2008). How biotech can transform biofuels . **Nat. Biotechnol.** 26:169 – 172. 2008.

MAEDA, R. N.; SERPA, V.I.; ROCHA, V.A.L.; MESQUITA, R.A.A.; ANNA, L.M.M.S.; CASTRO, A.M.; DRIEMEIER, C.E.; PEREIRA JUNIOR, N.; POLIKARPOV, I. Enzymatic

hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, v. 46. n. 5. p.1196-1201. 2011.

MARK, H.; WORKMAN-JUNIOR, J. **Statistics in Spectroscopy**. 2.ed. Califórnia. Elsevier Academic press. p.342. 2003.

MARTINEZ, G.C.; GIESE, E.C.; PEREIRA, J.O.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M. Seleção de isolados de *Colletotrichum* da biodiversidade da Amazônia como produtores de lacases utilizando uma metodologia simplificada. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v. 30, n. 2, p. 397-406, 2009.

MAURYA, D.P.; SINGLA, A.; NEGI, S. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. **3 Biotech**. 5(5): 597–609. 2015.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MORAIS, M.S.; OLIVEIRA, N.T.; HERCULANO, P.N.; MOREIRA, K.A. Complexo celulolítico produzido por duas espécies de fungos fitopatogênicos isolados de mandioca. **Summa phytopathol**. vol.42 no.3 Botucatu. 2016.

NELSON, D.L., COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5. ed. Nova York. Artmed. 1273p. 2011.

NOMALDI, A., CALIK, P., ULUDAG, Y. Effects os spray Drying Temperature and Aditives on the Stabillity of Serine Alkaline Protease Powders. **Drying Technology**. V.24. n.11. p. 1495 – 1500. 2006.

OGEDA, T.L. PETRI, D.F.S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Quím. Nova**. vol.33. no.7. São Paulo. 2010.

ORLANDELLI, R.C.; SPECIAN, V.; FELBER, A.C.; PAMPFILE, J.A. ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL: PRODUÇÃO POR FUNGOS E APLICAÇÕES. **Revista de Saúde e Biologia**. v.7.n.3. 2012.

PEREIRA, S.C., MAEHARA, L.; MACHADO, C.M.M.; FARINAS, C.S. 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. **Biotechnol Biofuels**. V. 8.p. 44. 2015.

PHITSUWAN, P. RATANA, K. The recovery and bioproperties of a xylanolytic multi-

enzyme complex from *Tepidimicrobium xylanilyticum* BT14. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. V. 120, Pages 28–37. 2015.

PONNAMBALAM, A.S.; DEEPTHI, R.S.; GHOSH, A.R. Qualitative Display and Measurement of Enzyme Activity of Isolated Cellulolytic Bacteria. **Biotechnol. Bioinf. Bioeng.** 1(1):33-37. Tamil Nadu. 2011.

RAMANATHAN, G.; BANUPRIYA, S.; ABIRAMI, D. Production and optimization of cellulose from *Fusarium oxysporum* by submerged fermentation. **Journal of Scientific & Industrial Research**. v.69. p.454-459. Virudhunagar. 2010.

RAMOS, A.; GALLY, M.; GARCÍA, M.C.; LEVIN, L. Pectinolytic enzyme production by *Colletotrichum truncatum*, causal agent of soybean anthracnose. **Revista Iberoamericana de Micología**. Vol. 27. Núm. 04. 2010.

ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA, L.S.G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Quím. Nova**. vol.27 no.5 São Paulo. 2004.

SAINI, R.; SAINI, J.K.; ADSUL, M.; PATEL, A.K.; MATHUR, A.; TULI, D.; SINGHANIA, R.R. Enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum* for bio-ethanol application. **Bioresource Technology**. Volume 188, Pages 240–246. 2015.

SALIBA, E.O.S.; RODRIGUEZ, N.M.; MORAIS, S.A.L.; PILÓ-VELOSO, D. LIGNINAS-MÉTODOS DE OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA. **Cienc. Rural** vol.31. no.5. Santa Maria. 2001.

SANTOS, D. C.; FARIAS, I.; LIRA, M.A.; SANTOS, M.V.F.; ARRUDA, G.P.; COELHO, R.S.B.; DIAS, F.M.; MELO, J.N. Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) em Pernambuco. **Empresa Pernambucana de Pesquisas Agropecuária - IPA**. Recife. 48p. 2006.

SANTOSHKUMAR, S.; SUJATHA, E.; SHIVAKRISHNA, P. Production and Optimization of Exo and Endocellulases from Thermophilic Fungi *Scytalidium thermophilum* SKESMBKU02. **Walailak J. Sci & Tech**.13(1): 9-22. Telangana.2016.

SETHI, S.; DATTA, S. GUPTA, B.L.; GUPTA, S. Optimization of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil. **ISRN Biotechnology**. Jaipur. V. 2013. p.7. 2013.

SEVERO, M.G. MORAIS, K. RUIZ, W.A. MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DA FARINHA DE ARROZ VISANDO A PRODUÇÃO DE AMIDO RESISTENTE. **Quim. Nova**, Vol. 33.

No. 2. 345-350. 2010.

SILVA, J.A.; BONOMO, P.; DONATO, S.L.R.; PIRES, A.J.V.; ROSA, R.C.C.; DONATO, P.E.R. Composição mineral em cladódios de palma forrageira sob diferentes espaçamentos e adubações químicas. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, 7: 866-875. 2012.

SILVA, J.C.; GUIMARÃES, L.H.; SALGADO, J.C.; FURRIEL, R.P.; POLIZELI, M.L.; ROSA, J.C.; JORGE, J.A. Purification and biochemical characterization of glucose-cellobiose-tolerant cellulases from *Scytalidium thermophilum*. **Folia Microbiol.** v. 58. 561–568. 2013.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S.K.; MUNIZ, E.C.; RUBIRA, A.F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Quím. Nova**. vol.32. no.3. São Paulo. 2009.

SILVA, R.; LAGO, E.S.; MERHEB, C.W.; MACCHIONE, M.M.; PARK, Y.K.; GOMES, E. Production of xylanase and CMCcase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.235 - 241, 2005.

SKYBA, O.; DOUGLAS, C.J.; MANSFIELD, S.D. Syringyl-Rich Lignin Renders Poplars More Resistant to Degradation by Wood Decay Fungi. **Appl Environ Microbiol.** 79(8). 2560–2571. 2013.

SLADE, R. Low cost enzymes could catalyse a revolution in ethanol production. **Cleantech Magazine**. 2010. Disponível em: <<http://www.cleantechinvestor.com/portal/bioenergy/5164-enzymes.html>>. Acesso: 15/09/2016.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochem. Eng. J.**, v. 13, n. 2-3, p. 205-218, 2003.

SORIA, S.; ALONSO, R. BETTUCCI, L. Endophytic Bacteria from *Pinus taeda* L. as Biocontrol Agents of *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell. **Chilean Journal of Agricultural Research**. Chillán.vol.72 no.2. 2012.

SOUZA, A.E.F.; NASCIMENTO, L.C.; ARAÚJO, E.; LOPES, E.B.; SOUTO, F.M. Ocorrência e identificação dos agentes etiológicos de doenças em palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill.) no semiárido paraibano. **Revista Biotemas**. Campina Grande. 2010.

SUBRAMANIAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **I.J.S.N.** Vellore. v. 3(3): 480-486. 2012.

TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Acid-Based Hydrolysis Processes for Ethanol from Lignocellulosic Materials: A Review. **Bioresources**. 2(3). 472-499. 2007.

TOZZE JÚNIOR, H.J.; FIRMINO, A.C.; IVAN HERMAN FISCHER, I.H.; FURTADO, E.L.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Caracterização da agressividade e atividade enzimática de isolados de *Colletotrichum* spp. associados à antracnose do abacate. **Summa Phytopathol. Botucatu**, v. 42, n. 3, p. 264-267. 2016.

YI, R.; LIN, Q.L.; MO, J.J.; WU, F.F.; CHEN, J. Fruit internal brown rot caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on pitahaya in Guangdong province, China. **Australasian Plant Pathology Society**. 10:13. 2015.

YUAN, L.; WANG, W.; PEI, Y.; LU, F. Screening and Identification of Cellulase-Producing Strain of *Fusarium Oxysporum*. **Procedia Environmental Sciences** 12. 1213 – 1219. 2012.

VASCONCELOS, A.G.V.; LIRA, M.A.; CAVALCANTI, V.L.B.; SANTOS, M.V.F.; WILLADINO, L. Seleção de clones de palma forrageira resistentes à cochonilha-do-carmim (*Dactylopius* sp). **R. Bras. Zootec.** vol.38 no.5 Viçosa. 2009.

VANHOLME, R.; DEMEDTS, B.; MORREEL, K.; RALPH, J.; BOERJAN, W. Lignin Biosynthesis and Structure. **Plant Physiol.** 153(3): 895–905. 2010. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/content/153/3/895>>. Acessado em: mar.2016.

VERARDI, A.; BARI, I.; RICCA, E.; CALABRÒ, V. Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Current Status of Processes and Technologies and Future Perspectives. **Intechopen**. P.290. 2012.

ZHANG, X.Z. ZHANG, Y. H.P. Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers, First Edition. **John Wiley & Sons, Inc.** 2013.

WANDERLEY, M.D.; NEVES, E.; ANDRADE, C.J. ASPECTOS DA PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE ENZIMAS. **Ciência, Tecnologia, Inovação e Oportunidade**. v.1. n. 1. 2011.

WANG, T.; YANG, H.; KUBICKI, J.D.; HONG, M. Cellulose Structural Polymorphism in Plant Primary Cell Walls Investigated by High-Field 2D Solid-State NMR Spectroscopy and Density Functional Theory Calculations. **Biomacromolecules**. 7 (6), pp 2210–2222. 2016.

WONG, D. W. S. Structure and Action Mechanism. of Ligninolytic Enzymes. **Appl Biochem Biotechnol**. Epub. 157(2):174-209. 2009.