



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

Maria Cleudenôra Cássia Mororó

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS
(ASCOMYCETES) ISOLADOS DE SEDIMENTO DE
MANGUE PARA PRODUÇÃO DO COMPLEXO
ENZIMÁTICO CELULOLÍTICO UTILIZANDO RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATOS**

Recife

2017

Maria Cleudenôra Cássia Mororó

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS
(ASCOMYCETES) ISOLADOS DE SEDIMENTO DE
MANGUE PARA PRODUÇÃO DO COMPLEXO
ENZIMÁTICO CELULOLÍTICO UTILIZANDO RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS COM SUBSTRATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Ambientais.

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Galba Maria de Campos Takaki

Recife

2017

M867b Mororo, Maria Cleudenora Cassia
Bioprospecção de fungos filamentosos (*Ascomycetes*)
isolados de sedimento de mangue para produção do complexo
enzimático celulolítico utilizando resíduos agroindustriais com
substratos / Maria Cleudenora Cassia Mororo ; orientador Galba
Maria de Melo Takaki, 2017.
88 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco.
Pró-reitoria Acadêmica. Coordenação Geral de Pós-graduação.
Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2017.

1. Biotecnologia. 2. Enzimas celulolíticas. 3. Bioprospecção.
4. Fungos filamentosos. 5. Resíduos agrícolas. 6. Resíduos
industriais. I. Título.

CDU 574.6

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS (ASCOMYCETES)
ISOLADOS DE SEDIMENTO DE MANGUE PARA PRODUÇÃO DO
COMPLEXO ENZIMÁTICO CELULOLÍTICO UTILIZANDO RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATOS**

MARIA CLEUDENÔRA CÁSSIA MORORÓ

Examinadores:

Prof.^a Dr.^a Galba Maria de Campos Takaki (Orientadora)
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa Lima
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Defendida em: 30/08/2017

Coordenadora: Prof.^a Dr.^a Galba Maria de Campos Takaki

Dedico
as virtudes do meu pai Hélio Mororó (*in memoriam*),
e
ao sorriso de Maria de Fátima Massena de Melo (*in memoriam*),
pessoa esplêndida, com discernimento e sabedoria,
pontuou com leveza a importância do
respeito nas relações humanas...

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença em minha vida, me abençoando e protegendo em todos os momentos.

À minha família, principalmente a minha mãe Rita de Cássia Ferreira de Mendonça e a minha irmã Maria Hélia Cássia Mororó Bolba de Melo Filgueiras, que sempre me incentivaram a seguir em frente em qualquer situação. Aos meus familiares Gilvanice Marques de Lima, que com muita paciência sempre esteve ao meu lado me apoiando e dando forças nos momentos mais difíceis deste percurso, tio Rivaldo Ferreira da Silva, Gercino Marque de Lima e Helena Celina de Lima, pelo aprendizado, apoio, conselhos, paciência e compreensão. A Luan Henrique Pedrosa Monte pela inspiração da vida, a Flávia Galvão de Paiva e Daniel Henrique da Silva Bastos, por transcenderem o significado da palavra amizade e, especialmente a Kesia Santos Gomes da Silva, Carlos Alberto Pinheiro Vieira, Mariana Salazar Pereira da Costa e Rodrigo Samarcos D'albuquerque amigos para todas as horas.

Agradeço à Prof.^a Dr.^a Galba Maria de Campos Takaki pela confiança, por ter acreditado, pela oportunidade concedida e pela orientação, sem ela nada disso teria acontecido. Aos professores do curso de mestrado em Desenvolvimento de processos Ambientais, à Prof.^a Kaoru Okada por todos os conselhos, apoio, força incentivo e carinho, ao Prof. Carlos Alberto Alves da Silva pelo apoio, carinho e paciência, e principalmente à Prof.^a Aline Elesbão do Nascimento pelas orientações, explicações e aprendizado compartilhado em diversos momentos, conselhos e ensinamentos para toda a vida.

Aos colegas e amigos do mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Felipe, Patrícia, Tainã, Paloma, Liliâne, Cleoneide, Alan, Miller, Vicente, Josiane, Carlos, Daniel e todos os outros, que compartilham comigo os prazeres e as angustias desse percurso, vividos com muita garra, determinação e vontade de aprender. Aos colegas e amigos dos Laboratórios do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais – NPCIAMB, principalmente a Keissy Wanderley de Santana que esteve comigo desde o início das atividades laboratoriais, a Layla Carvalho Mahnke, Adriana Ferreira de Souza, Marcos Antônio Cavalcanti Luna, Dayana Montero Rodríguez e

Thayse Alves de Lima e Silva, pelos momentos de reflexão, apoio e ajuda na execução das pesquisas.

À Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP, na pessoa do Reitor Prof. Dr. Pe. Pedro Rubens Ferreira de Oliveira, pelo acolhimento humano e oportunidade, aos funcionários do NPCIAMB, à Coordenação de Pessoal de Ensino Superior – CAPES pela concessão da bolsa para realização do mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS	iv
SUMÁRIO	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I	
1.1 Introdução	14
1.2 Objetivos	17
1.2.1 Objetivo Geral	17
1.2.2 Objetivos Específicos	17
1.3 Revisão da Literatura	18
1.3.1 Celulose	18
1.3.2 Enzimas: conceito e classificação	20
1.3.3 Enzimas celulolíticas	22
1.3.3.1 Endoglucanases	25
1.3.3.2 Exoglucanases	25

1.3.3.3 β -glicosidases	26
1.3.4 Micro-organismos produtores de enzimas celulolíticas	27
1.3.4.1 Fungos filamentosos produtores de enzimas celulolíticas	28
1.3.5 Potencial biotecnológico dos fungos	29
1.3.6 Classe Ascomycetes	30
1.3.6.1 Gênero <i>Trichoderma</i>	31
1.3.6.2 Gênero <i>Aspergillus</i>	32
1.3.6.3 Gênero <i>Penicillium</i>	35
1.3.7 Resíduos agroindustriais	37
1.3.7.1 Resíduo de farelo de milho	39
1.3.7.2 Resíduo de casca de tangerina	40
1.3.7.3 Resíduo de casca e coroa de abacaxi	40
1.3.7.4 Resíduo de farelo de trigo	41
1.3.8 Aplicação das enzimas celulolíticas	42
1.3.9 Mercado de enzimas	44
1.4 Referências Bibliográficas	46
CAPÍTULO II – Artigo científico	65
CAPÍTULO III – Conclusões Gerais	83
ANEXOS	85

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1.	Estrutura básica da molécula de celulose	18
Figura 2.	Estrutura da fibra celulósica: (a) Fibra celulósica; (b) Macrofibrilas; (c) Microfibrilas; (d) Feixes de moléculas de celulose; e (e) Unidades de glicose	19
Figura 3.	Esquema representando a atuação das enzimas celulolíticas endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidase na degradação da estrutura da celulose	24
Figura 4.	Conidióforo característico da espécie <i>Trichoderma viride</i>	32
Figura 5.	Conidióforos característicos de espécies de <i>Aspergillus</i> : (a) uniseriado de <i>Aspergillus equitus</i> ; (b) biseriado de <i>Aspergillus ochraceus</i>	34
Figura 6.	Conidióforos característicos da espécie <i>Penicillium citreonigrum</i> Dierckx	35

CAPÍTULO II

Figura 1.	Atividade CMCase: (A) <i>Penicillium</i> sp. UCP 00279; (B) <i>Aspergillus flavus</i> UCP 01413	75
Figura 2.	Atividade FPase: (A) <i>Penicillium</i> sp. UCP 00279; (B) <i>Aspergillus flavus</i> UCP 01413	76
Figura 3.	Atividade β -Glicosidase: (A) <i>Penicillium</i> sp. UCP 00279; (B) <i>Aspergillus flavus</i> UCP 01413	77

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1.	Classe das enzimas e tipos de reação que realizam	21
	Classificação das enzimas celulolíticas de acordo com Enzyme	
Tabela 2.	Commission e a International Union of Biochemistry and Molecular	23
	Biology – IUBMB	

CAPÍTULO II

Tabela 1.	Atividade celulase das 25 linhagens de fungos filamentosos estudadas	74
-----------	--	----

RESUMO

As celulasas (E.C. 3.2.1.4) são enzimas responsáveis pela degradação da celulose, são moléculas capazes de acelerar reações químicas e realizar a quebra das ligações químicas existentes entre as unidades de glicose. As celulasas correspondem ao complexo constituído por três enzimas endoglucanases, exoglucanases e beta-glicosidases, com diversas aplicações, sendo os processos biotecnológicos microbianos responsáveis por uma grande parcela da economia mundial, contudo os custos de produção ainda são muito elevados. Neste contexto, foi realizada a bioprospecção de 25 linhagens de fungos filamentosos (Ascomycetes) isolados de sedimentos de mangue do município Rio Formoso, PE, Brasil, investigando o potencial de produção das enzimas do complexo celulolítico. Os estudos iniciais foram realizados selecionando os fungos com maior atividade enzimática, através da detecção da atividade celulolítica em meio sintético sólido, tendo como substrato a carboximetilcelulose (CMC). Os resultados indicaram a presença da enzima celulase através da formação do halo em 3 linhagens do gênero *Trichoderma*, 3 linhagens do gênero *Aspergillus* e 1 linhagem do gênero *Penicillium*. Os índices enzimáticos mais representativos foram os de *Penicillium* sp. UCP 0279 com Índice de 2,2, seguido de *Aspergillus flavus* UCP 1413 com índice enzimático de 1,7. Em seguida, foram realizadas fermentações submersas para avaliação da atividade endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase, utilizando resíduos agroindustriais, casca de tangerina, casca de abacaxi, coroa de abacaxi, farelo de trigo e farelo de milho como substrato. Os resultados indicaram uma atividade para CMCcase de 20,2 UI/mL para *Penicillium* sp. UCP 0279, com farelo de trigo como substrato em 72 h de fermentação e com a coroa de abacaxi observou-se uma atividade de 18,3 UI/mL em 24 h. Para o *Aspergillus flavus* UCP 1413, a produção foi de 14,9 UI/mL e 14,5 UI/mL com os resíduos de farelo de milho e de casca de abacaxi respectivamente, e ambos os resultados foram obtidos com 24 h de fermentação. A atividade FPase para *Penicillium* sp. UCP 0279, usando casca de abacaxi como substrato apresentou 45,5 UI/mL e a casca de tangerina 42,8 UI/mL, ambos em fermentação a 48 h. Para *A. flavus* UCP 1413 a coroa de abacaxi apresentou 25,0 UI/mL de atividade enzimática em 24 h e a

casca de abacaxi 14,4 U/mL no mesmo tempo. Na atividade da enzima β -glicosidase o *Penicillium* sp. UCP 0279 apresentou uma produção de 18,2 UI/mL em 24 h, com o resíduo da coroa de abacaxi e com a casca de abacaxi apresentou 9,1 UI/mL em 48 h. O *A. flavus* UCP 1413 apresentou com 96 h de fermentação uma atividade de 16,9 U/mL e 14,5 U/mL, com farelo de trigo e farelo de milho respectivamente.

Palavras-Chave: Enzimas celulolíticas. Fungos filamentosos. Resíduos agroindustriais.

ABSTRACT

Cellulases (E.C. 3.2.1.4) are enzymes responsible for the degradation of cellulose, are molecules capable of accelerating chemical reactions and breaking the chemical bonds between glucose units. Cellulases correspond to the complex consisting of three enzymes endoglucanases, exoglucanases and beta-glucosidases, with diverse applications, being the microbial biotechnological processes responsible for a great part of the world economy, yet the costs of production are still very high. In this context, 25 strains of filamentous fungi (Ascomycetes) isolated from mangrove sediments of Rio Formoso, PE, Brazil, were investigated to investigate the production potential of the enzymes of the cellulolytic complex. The initial studies were carried out by selecting the fungi with the highest enzymatic activity, through the detection of cellulolytic activity in solid synthetic medium, with carboxymethylcellulose (CMC) as the substrate. The results indicated the presence of the cellulase enzyme through the formation of halo in 3 strains of the genus *Trichoderma*, 3 strains of the genus *Aspergillus* and 1 strain of the genus *Penicillium*. The most representative enzymatic indices were those of *Penicillium* sp. UCP 0279 with Index of 2,2, followed by *Aspergillus flavus* UCP 1413 with enzymatic index of 1,7. Submerged fermentations were carried out to evaluate the endoglucanase activity, exoglucanase and β -glycosidase, using agroindustrial residues, tangerine peel, pineapple peel, pineapple crown, wheat bran and corn bran as substrate. The results indicated a CMCase activity of 20.2 IU / mL for *Penicillium* sp. UCP 0279, with wheat bran as substrate in 72 h of fermentation and an activity of 18.3 IU / mL in 24 h with the pineapple crown. For the *Aspergillus flavus* UCP 1413, the yield was 14.9 IU / mL and 14.5 IU / mL with the residues of corn bran and pineapple peel respectively, and both results were obtained with 24 h of fermentation. The FPase activity for *Penicillium* sp. UCP 0279, using pineapple peel as substrate had 45.5 IU / mL and the tangerine peel 42.8 IU / mL, both in fermentation at 48 h. For *A. flavus* UCP 1413 the pineapple crown presented 25.0 IU / mL enzymatic activity in 24 h and the pineapple peel 14.4 U / mL at the same time. In the activity of the enzyme β -glycosidase, *Penicillium* sp. UCP 0279 showed a production of 18.2 IU / mL in 24 h,

with the pineapple crown residue and the pineapple peel had 9.1 IU / mL in 48 h. The *A. flavus* UCP 1413 presented with 96 h of fermentation an activity of 16.9 U / mL and 14.5 U / mL, with wheat bran and corn bran, respectively.

Keywords: Cellulolytic enzymes. Filamentous fungi. Agroindustrial waste.

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

Enzimas são proteínas utilizadas como catalisadores de processos químicos, são essenciais e atuam no sistema metabólico dos organismos vivos, especificamente na aceleração das reações intracelular e extracelular. As enzimas também são altamente especializadas, podem ser reguladas, possuem um alto grau de especificidade e eficiência catalítica (POLSHETTIWART et al., 2011; TORRELO; HANEFELD; HOLLMANN, 2015; ALTARUGIO; PEREIRA, 2016). Além disso, possuem um importante papel na degradação de compostos orgânicos e de alimentos.

O uso de enzimas de origem microbiana acontece de forma frequente e em diferentes setores industriais, constituindo uma importante alternativa para auxiliar e até substituir os processos químicos utilizados pelas indústrias, que podem formar subprodutos contaminantes que causam problemas toxicológicos e danos ao meio ambiente (ARAUJO, 2016; COURI; DAMASO, 2017).

As enzimas microbianas são biocatalizadores que atuam de forma específica, reduzindo o custo energético dos processos industriais e a geração de subprodutos, pois são biodegradáveis. Entre suas inúmeras aplicações, destaca-se o uso em diferentes indústrias, tais como: de produtos de limpeza, de bebidas; de alimentos; de diagnósticos; de medicamentos; de cosméticos; de síntese orgânica; de oleoquímicos; de couro; de polpa e papel; de fibras têxteis; de tratamento de efluentes; e outras. Estas características tornam o uso das enzimas microbianas mais vantajosas quando comparada ao uso dos catalisadores químicos (MACHIELSEN; DIJKHUIZEN; VAN DER OOST, 2007; PANESAR et al., 2016).

A celulose é um polissacarídeo constituído por várias unidades de glicose ligadas quimicamente e no meio ambiente os micro-organismos, fungos e bactérias, são responsáveis por sua degradação, sendo uma importante glicohidrolase envolvida na degradação da biomassa lignocelulósica (SONI, et al., 2010). As celulases são formadas por um complexo de enzimas denominadas endoglucanases, exoglucanase e β -glicosidases. Esse complexo é responsável pela quebra das ligações químicas

existentes na celulose presente em materiais lignocelulósicos e estão entre as principais enzimas utilizadas em aplicações industriais (ARAÚJO, 2015).

Os fungos têm sido utilizados em processos biotecnológicos como uma alternativa muito interessante para a obtenção do complexo celulolítico, uma vez que são produtores naturais de enzimas celulasas, são facilmente cultivados, secretam enzimas no meio sem que haja a necessidade de romper células, aproveitam os resíduos agroindustriais e a biomassa celulósica como substrato para obter nutrientes e produzem também outros componentes de interesse industrial (OLIVEIRA, 2010; BAPTISTA, 2011; FLORENCIO, 2011; SILVA, 2013).

A agricultura brasileira se destaca no cenário mundial, sendo o país um dos que mais crescem a produção de alimentos com a agricultura (MAPA, 2017). A estimativa de produção de grãos para a safra 2016/2017 é de 237,22 milhões de toneladas, um crescimento de 27,1% em relação à safra anterior. Já à previsão de produção de cana-de-açúcar para o mesmo período é de 657,2 milhões de toneladas (CONAB, 2017). Em relação à produção de frutas, o Brasil está em terceiro lugar entre os principais países produtores, sendo a China o primeiro e a Índia o segundo (PARANÁ, 2017). A estimativa de produção de frutas para o ano de 2017 é de 44 milhões de toneladas produzidas (CNABrasil, 2017).

Grande parte de toda produção agrícola brasileira se torna resíduo, ou seja, biomassa lignocelulósica. Todavia, é possível utilizar esse material convertendo-o através de processos biotecnológicos a energia e produtos de alto valor agregado. Esse processo está relacionado à habilidade de produção enzimática dos micro-organismos, que decompõe a biomassa lignocelulósica em glicose, sendo os sistemas enzimáticos um campo promissor da biotecnologia (ROVEDA; HEMKEMEIER; COLLA, 2010).

Apesar da importância devidamente reconhecida, o custo elevado da aplicação de enzimas em processos de conversão da biomassa lignocelulósica ainda é um entrave para muitas empresas e outras instituições da área (DELABONA et al., 2013).

Deste modo, visto a necessidade do desenvolvimento de processos biotecnológicos mais eficientes para a obtenção de enzimas, objetivou-se investigar o potencial de produção de enzimas do complexo celulolítico por fungos filamentosos (ascomycetos) isolados de sedimentos do mangue (uma vez que estes são altamente adaptados a diferentes fatores ambientais, sendo uma característica muito importante e estratégica), utilizando diferentes resíduos lignocelulósicos agroindustriais como substrato, apresentando uma alternativa para redução de custos energéticos na produção de enzimas celulolíticas e de preservação ambiental.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial de produção do complexo celulolítico por fungos filamentosos (ascomycetes), dos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus* isolados de sedimentos do mangue, utilizando substrato convencional e resíduos agroindustriais como meio alternativo.

1.2.2 Objetivos Específicos

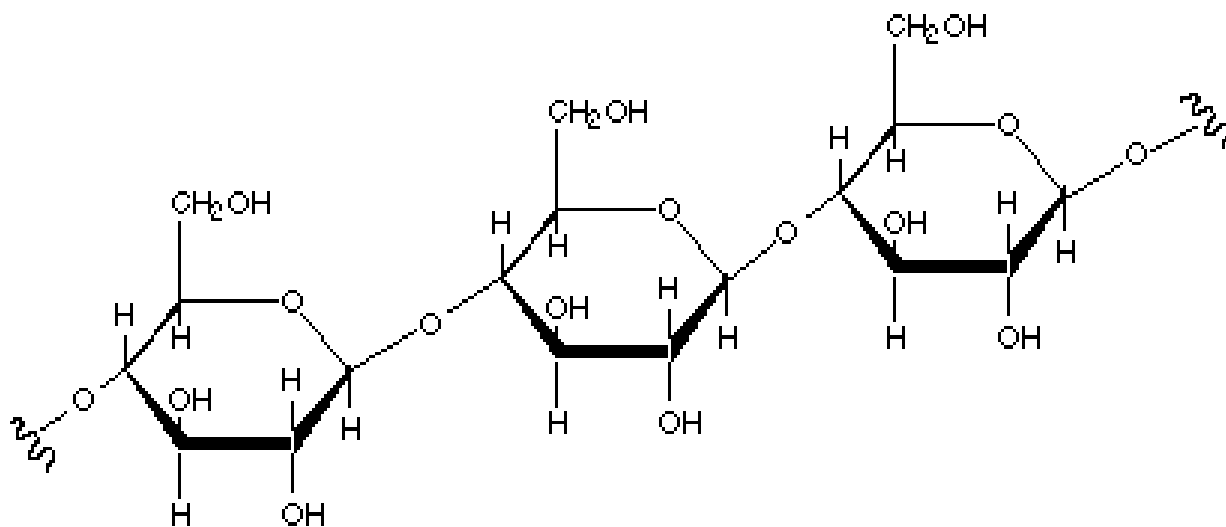
- Selecionar as linhagens com maior atividade celulolítica em meio convencional;
- Avaliar a produção do complexo celulolítico em substrato convencional e em resíduos agroindustriais por fermentação submersa;
- Analisar a influência da temperatura e do pH na produção do complexo celulolítico;
- Validar estatisticamente os resultados obtidos.

1.3 REVISÃO DA LITERATURA

1.3.1 Celulose

A celulose é um polissacarídeo formado por várias unidades de β -D-glicopiranosil unidas entre si através de ligações químicas, estas são constituídas por pontes de hidrogênio que se organizam estruturalmente formando um polímero linear (Figura 1). O comprimento de sua cadeia linear pode variar entre 2 e 10 mil resíduos de glicose, e cada unidade gira 180° em relação a unidade seguinte. Sua região cristalina é impermeável à água e muito resistente a degradação química ou biológica (SANTOS, 2008).

Figura 1. Estrutura básica da molécula de celulose.



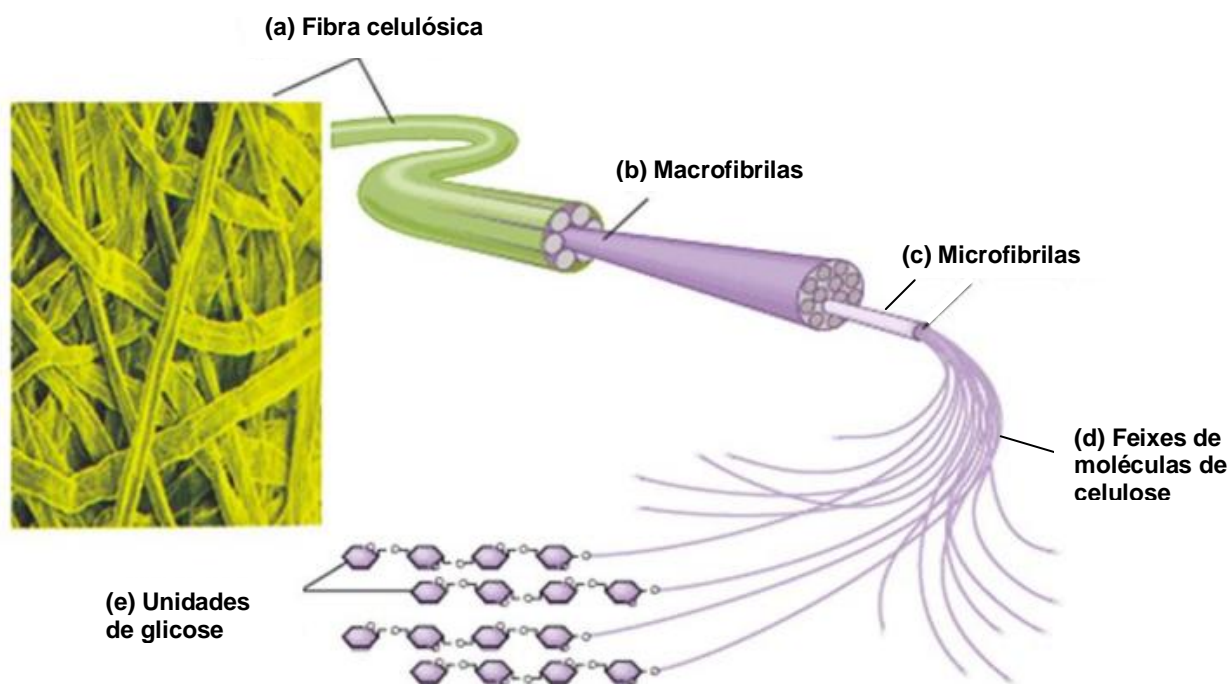
Fonte: http://www.soq.com.br/conteudos/em/macromoleculas/index_clip_image016.gif (2017).

Esse polissacarídeo é o principal componente da parede celular das fibras das plantas, representando cerca de 35 a 50 % do seu peso seco, desempenham uma

função exclusivamente estrutural, de proteção osmótica e de resistência mecânica (BAYER; LAMED, 1992; VILELA, 2013; PEREIRA, 2014). A celulose apresenta duas extremidades, uma redutora que possui um carbono anomérico livre e outra não redutora, que não possui esse carbono (SANDGREN; SAHLBERG; MITCHINSON, 2005).

A celulose possui uma estrutura formada por fibras celulósicas, constituídas por macrofibrilas com cerca de 250 microfibrilas e esta é composta por uma pequena quantidade de feixes de moléculas de celulose (Figura 2). Cada uma dessas moléculas é formada por mais de mil unidades de glicose formando um feixe e são ligadas entre si por pontes de hidrogênio (MENEZES; BARRETO, 2015).

Figura 2. Estrutura da fibra celulósica: (a) Fibra celulósica; (b) Macrofibrilas; (c) Microfibrilas; (d) Feixes de moléculas de celulose; e (e) Unidades de glicose.



Fonte: <http://nutrition.jbpub.com/resources/chemistryreview9.cfm> (2017) - adaptado.

Entre as fibrilas, microfibrilas e moléculas possivelmente se encontram outros componentes da parede celular como a hemicelulose e a lignina. A disposição de suas

moléculas em alguns pontos das fibrilas ocorre de maneira desordenada, formando as micelas de estrutura cristalina tornando mais resistente sua estrutura ao processo de hidrólise (LYND et al., 2002; SAITO, 2005; MENEZES; BARRETO, 2015).

Sua estrutura pode ser disposta em três níveis de organização. No primeiro, a sequência de resíduos β -D-glicopiranosídicos são unidas por ligações covalentes, o que forma um o homopolímero de anidroglicose que possui ligações β -D (1 \rightarrow 4) glicosídicas e fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$. Em seu segundo nível ocorre a acomodação molecular, as unidades que se repetem se organizam espacialmente, havendo uma distância entre as ligações e os ângulos formados por sua estrutura e pelas ligações intramoleculares de hidrogênio. O último nível apresenta as associações das moléculas definidas, formando moléculas agrupadas e com uma estrutura cristalina constituída. Essas características proporcionam resistência à tensão, o que faz com que a celulose seja insolúvel em água e a outros solventes (INÁCIO, 2016).

1.3.2 Enzimas: conceito e classificação

Enzimas são macromoléculas compostas por polímeros de aminoácidos que se conectam por ligações amidas, variando sua massa molecular de kilodalton a megadalton. Essas substâncias biológicas funcionam como biocatalisadores, são produzidas por organismos vivos e especializadas na aceleração das reações químicas e bioquímicas específicas, seja dentro ou fora da célula, e sem elas a sustentabilidade dos sistemas biológicos não ocorreria, a vida se tornaria impossível (GURUNG et al., 2013; SINGH et al, 2016; UNESP, 2017).

A atuação das enzimas pode aumentar a velocidade de uma reação por um fator de até 10^{17} vezes mais, são extremamente eficientes transformando de 100 a 1000 moléculas de substrato em produto por minuto de reação, atuam em concentrações muito baixas, em condições específicas de temperatura e pH, possuem todas as características das proteínas, podem ter sua concentração e atividades reguladas e estão quase sempre em compartimentos no interior da célula (UNESP, 2017).

O local onde ocorre o processo catalítico das moléculas enzimáticas é por muitas vezes escondido no interior de bolsas hidrofóbicas, determinando dessa forma a especificidade do substrato que está inserida e conseqüentemente o composto químico que irá catalisar, definindo assim, a classe da enzima (SINGH et al, 2016).

A classificação das enzimas é dada de acordo com a International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) e a Enzyme Commission (EC) da International Union for Pure and Applied Chemistry (IUPAC), sendo realizada de acordo com os tipos de reações que catalisam e elas podem ser divididas em seis classes, conforme apresentado na Tabela 1 (SINGH et al, 2016).

Tabela 1. Classe das enzimas e tipos de reação que realizam.

Classes	Reação	Enzimas
Oxirredutases	Transferência de hidrogênio ou oxigênio ou elétrons entre moléculas	Desidrogenases, oxidases e oxigenases
Transferases	Transferência de grupos de átomos de uma molécula para outro	Fructosiltransferases, transcetolases, aciltransferases, transaminases
Hidrolases	Clivagem hidrolítica de ligações	Proteases, amilasases, acilases, lipases, fosfatases, cutinases
Liases	Clivagem não hidrolítica por eliminação ou reações de adição	Pectato lyases, hidratases, desidratases, descarboxilases, fumarase, argino-succinase
Isomerases	Transferência de grupo de uma posição para outra dentro de uma molécula	Isomerases, epimerases, racemases
Ligases	Junção covalente de duas moléculas juntamente com a hidrólise de uma ligação rica em energia em ATP ou trifosfatos semelhantes	Sintetases, ligases

Fonte: SINGH et al, 2016 - adaptado.

Esses biocatalisadores também apresentam uma elevada especificidade ao substrato, o que reduz a produção de subprodutos indesejáveis na reação, diminui os custos de separação dos produtos após procedimentos e com os problemas ambientais de tratamento de efluentes (YU; ZHANG, 2003).

Como principais vantagens, as enzimas apresentam a alta estabilidade, alta eficiência catalítica, elevada especificidade, além de permitir a obtenção de produtos com melhor qualidade quando comparado a outros métodos catalíticos (POLSHETTIWART et. al., 2011; TORRELO; HANEFELD; HOLLMANN, 2015; ALTARUGIO; PEREIRA, 2016).

1.3.3 Enzimas celulolíticas

As enzimas celulolíticas apresentam importantes propriedades que as tornam desejáveis no uso como catalisadores. Essas enzimas se caracterizam por serem ativas e versáteis, executando de forma seletiva e rápida uma diversidade de transformações quando em condições brandas de reação. Sua vantagem em relação a outros catalisadores está na ação ampla, não necessita de altas temperaturas ou valores extremos de pH para serem ativadas, podem ser reguladas através da modificação da natureza do meio de reação (como por exemplo, pressão, alteração do pH ou adição de um efetor). Além disso, sua especificidade catalítica permite a transformação molecular sem que haja reações paralelas e indesejáveis, que ocorre no uso de catalisadores químicos, gerando substâncias tóxicas como furfurais e derivados de lignina até a degradação do produto gerado, a glicose (YU; ZHANG, 2003; BORTOLAZZO, 2011; ARAÚJO, 2016).

Essas enzimas, também conhecidas como celulasas, são enzimas que pertencem à classe das hidrolases, são biocatalisadores altamente específicos, capazes de atuar sobre um material celulósico sendo responsável por sua degradação

e esse processo é realizado através da quebra das ligações químicas existentes entre as unidades de glicose que formam a celulose. A classificação de cada uma dessas enzimas é descrita na Tabela 2.

Tabela 2 – Classificação das enzimas celulolíticas.

Classificação	Enzima celulolítica	Enzyme Commission e IUBMB	Reação catalisada
EC 3.2.1.4	Endoglucanase	1,4-β-D-glucana-4-glucano-hidrolase	Endo-hidrólise de ligações β-1,4-D-glicosídicas da celulose e beta-glucanas
EC 3.2.1.91	Exoglucanase	1,4-β-D-glucana-glucano-hidrolase	Hidrólise de ligações β-1,4-D-glicosídicas em celulose e celotetraose, liberando celobiose
EC 3.2.1.21	β-Glicosidase	β-glicosídeo gluco-hidrolase	Hidrólise do terminal, β-1-4-D-glicosídeo com liberação de glicose

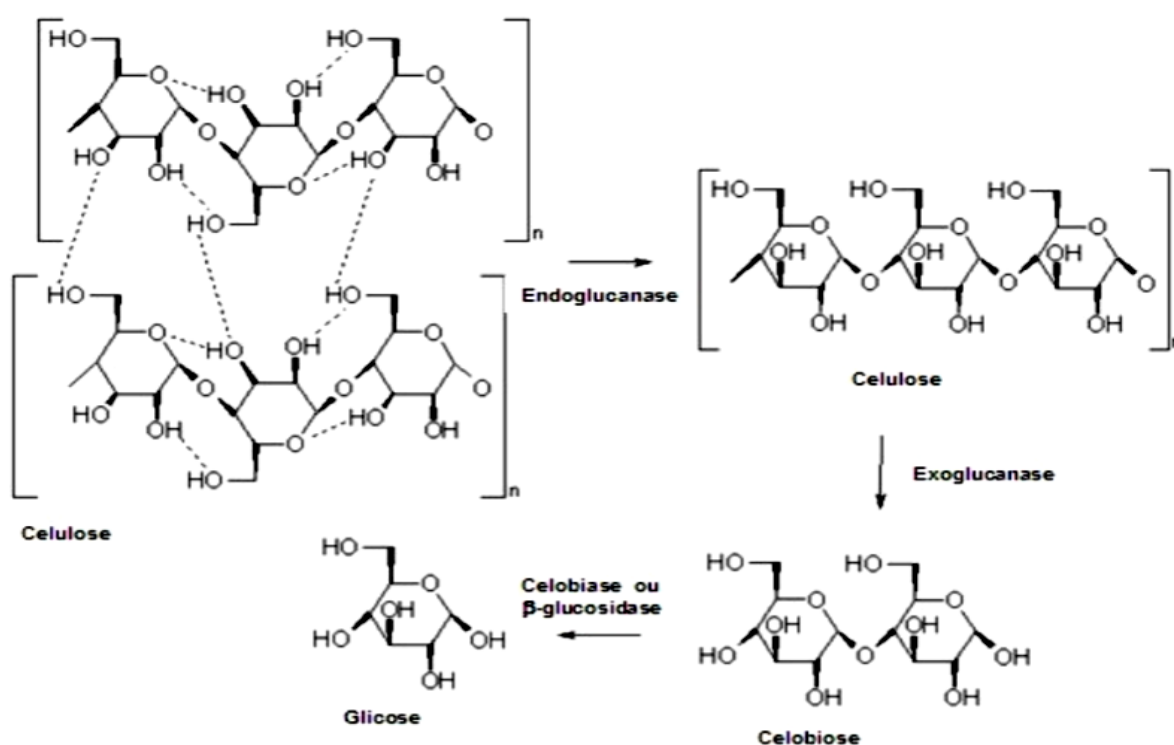
Fonte: NC-IUBMB (2008).

Este conjunto de hidrolases glicosídicas constitui um sistema enzimático formado por três tipos de enzimas, as endoglucanases (EG I, EG II, EG III e EG IV; EC 3.2.1.4), as exoglucanases (CBH I e CBH II; EC3. 2.1.91) e as β-1,4-glicosidase (BG I e BG II; EC 3.2.1.21) (VAN DEN BRINK; VRIES, 2011; LIAO et al., 2015).

O processo de hidrólise enzimática das ligações O-glicosídicas da celulose envolve esses três tipos de enzimas, que atuam em sinergia e de forma complementar umas as outras para liberação de energia (TAIZ; ZEIGER, 2004; ZANCHETTA, 2013; JUTURO; WU, 2014). Ou seja, as endoglucanases clivam as ligações internas existentes na fibra celulósica e agem ao longo da cadeia de forma

randômica, produzindo novos sítios de ataque para as exoglucanases; as exoglucanases atuam na região externa da celulose, nas extremidades da cadeia, liberando como produto principal a celobiose; e as β -glucosidases através da hidrólise da celobiose e de outros oligossacarídeos solúveis em glicose completam o processo conforme a Figura 3 (ZANDONÁ FILHO, 2001; SANTOS, 2015).

Figura 3: Esquema representando a atuação das enzimas celulolíticas endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidase na degradação da estrutura da celulose.



Fonte: FARINAS, 2011.

A hidrólise primária ocorre na superfície dos substratos sólido e liberam os açúcares solúveis que chegam até o grau 6 de polimerização. O fator limitante para esse processo é a etapa de despolimerização realizada pelas endo e exoglucanases. Em seguida, na hidrólise secundária ocorre a hidrólise de celobiose em glicose pelas β -Glicosidases, apesar destas também participarem da hidrólise da celodextrinas (ZHANG; LYND, 2004; FLORENCIO, 2011).

Essas características tornam o uso das enzimas de origem microbiana em processos industriais e ambientais, uma forma simples, de fácil controle e com eficiência energética, tornando o investimento mais barato e com uma equilibrada relação custo-benefício (DZIEZAK, 1991; PATEL, 2002; PIZARRO; PARK, 2003).

1.3.3.1 Endoglucanases

As endoglucanases ou 1,4- β -D-glucana-4-glucano-hidrolase (EC 3.2.1.4) pertencem ao complexo celulolítico responsável pelo início da hidrólise molecular da celulose. Essa endoenzima cliva as ligações β -1,4 internas existente na estrutura amorfa da fibra celulósica, rompendo a cadeia de celulose de forma aleatória e em sua região central, liberando açúcares e oligossacarídeos. Ao realizar esse procedimento a enzima cria novos terminais, sendo um redutor e o outro não redutor, que permitirá a ação das exoenzimas (LYND et al., 2002; FLORENCIO, 2011).

A enzima carboximetilcelulase (CMCase) é a que mais se destaca entre as endoglucanases e sua atividade normalmente é determinada usando derivados celulósicos solúveis como carboximetilcelulose (CMC) devido a baixa cristalinidade e alto grau de polimerização (TOMME et al., 1995; CAO; TAN, 2002; ZHANG et al., 2006; MENEZES; BARRETO, 2015).

1.3.3.2 Exoglucanases

As exoglucanase são constituídas pelas celobiohidrolases (CBHs) ou 1,4- β -D-glucana-celobio-hidrolase (EC 3.2.1.91) e pelas glucanohidrolases (GHs) ou 1,4- β -D-glucana-glucano-hidrolase (EC 3.2.1.74). A enzima Avicelase se destaca como a principal responsável pela produção de celobiose a partir da celulose micristalina. Essas enzimas participam da primeira etapa da hidrólise sendo responsáveis pela

amorfogênese (ruptura física do substrato que ocasiona a desestratificação das fibras e aumento das regiões intersticiais). Sua atuação ocorre na região externa da celulose causando a inversão na configuração do carbono 1 do resíduo liberado, e essas enzimas se ligam as extremidades redutoras e não redutoras da molécula de celulose microcristalina expostas pela endoglucanase, liberando unidades de celobiose (CAO; TAN, 2002; BORTOLAZZO, 2011; SANTOS, 2014; MENEZES; BARRETO, 2015).

Existem dois tipos de celobiohidrolases, as que hidrolisam os terminais redutores (CBHI/Cel7A) e as que hidrolisam os terminais não redutores (CBHII/Cel6A) da fibra de celulose e de oligossacarídeos a celobiose. Todavia, ambas sofrem inibição pela celobiose - seu produto de hidrólise - e necessitam da atuação das outras enzimas do complexo celulolítico, especificamente as β -glicosidases. Já as glucanohidrolases hidrolisam a fibra celulósica e liberam diretamente no meio o polímero (BOM et al., 2008; CASTRO; PEREIRA JR., 2010; SILVA, 2014).

1.3.3.3 β -glicosidases

A enzima β -glicosidase ou β -glicosídeo gluco-hidrolase (EC 3.2.1.21) é responsável por hidrolisar alguns oligossacarídeos solúveis em glicose e principalmente a celobiose, gerando como produto final a glicose (LYND et al., 2002; LYND; ZHANG, 2002; MENEZES; BARRETO, 2015). Essa habilidade hidrolítica reduz a inibição das endoglucanases e exoglucanases pela presença da celobiose e aumenta o rendimento total de açúcares fermentescíveis (PETROVA et al., 2002; WILSON, 2008).

Sua atuação ocorre sobre as moléculas de celobiose e de outras celodextrinas com baixo peso molecular, produzindo a glicose na configuração β , o que permite diferenciar essa enzima de outras exoglucanases. Contudo, essa enzima, assim como a exoglucanase, também possui a característica de sofrer inibição com o produto de sua hidrólise (AWAFO, 1997; CASTRO; PEREIRA JR., 2010; SILVA, 2014).

Uma cooperação sinérgica entre as enzimas celulolíticas tem sido descrita como pré-requisito para uma degradação completa e eficiente da celulose, todavia, os mecanismos moleculares envolvidos neste processo ainda não são completamente compreendidos (QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL, 2013).

1.3.4 Micro-organismos produtores de enzimas celulolíticas

Existem vários micro-organismos produtores de enzimas celulolíticas na natureza. São os fungos, as leveduras e as bactérias, que secretam as enzimas celulolíticas, uma vez que não são capazes de transportar para o interior de suas células materiais insolúveis como a celulose, apenas os açúcares provenientes dessa degradação para serem metabolizados (WILSON, 2008; SILVA, 2014).

As principais razões para utilização de micro-organismos em estudos se devem as vantagens que os mesmos apresentam, das quais se destacam: a necessidade de pouco espaço para seu crescimento e produção de enzimas; versatilidade em degradar diferentes substratos, principalmente resíduos agroindustriais; crescimento rápido quando em condições apropriadas; e facilidade de manipulação genética (BRAVO et al., 2000; SANTOS, 2015).

Entre os principais gêneros de micro-organismos produtores de celulase estão: as bactérias anaeróbias *Clostridium* e *Romnococcus*; as bactérias aeróbias *Cellulomonas* e *Thermobifida*; os actinomicetes *Streptomyces*; os fungos filamentosos *Trichoderma*, *Bulgaria*, *Helotium*, *Poria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Sporotrichum*, *Fusarium* e *Humicola*; as leveduras *Trichosporium* e *Cryptococcus*; as plantas do gênero *Fragaria* e animais como moluscos e insetos (LYND et al., 2002; PALOMER et al., 2004; SINGHANIA et al., 2010; SILVA, 2014; HANSEN et al., 2015; SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016).

Estudos realizados por Ten et al. (2004) utilizando bactérias aeróbias e anaeróbias, actinomicetos e substratos cromogênicos insolúveis, constataram a

capacidade de degradação da celulose e hemicelulose pelos micro-organismos estudados, entre os quais se destacaram *Bacillus*, *Streptomyces*, e *Cellulomonas*. A bactéria *Cellulomonas flavigena* também secreta várias enzimas celulolíticas, sendo capaz de hidrolisar sinergicamente a celulose e hemicelulose, usando diferentes substratos de origem celulósica (RAJOKA et al., 2005).

Os fungos filamentosos também possuem a atividade celulolítica capaz de degradar compostos como a celulose. Um exemplo disso é o gênero *Aspergillus*, que participa da degradação de polissacarídeos da parede celular dos vegetais e as enzimas produzidas por esse gênero são altamente glicosiladas (DE VRIES; VISSER, 2001).

Alguns micro-organismos se destacam por sua elevada capacidade de secretar altas quantidades de enzimas extracelulares, sendo as bactérias e os fungos filamentosos os mais indicados na produção de celulases em grandes quantidades (VAN DEN BRINK; VRIES, 2011). Contudo, em processos industriais, os fungos filamentosos são empregados com maior frequência na produção de enzimas celulolíticas em virtude das propriedades fisiológicas, enzimáticas e bioquímicas, que lhes permitem crescer em uma variedade de substratos convertendo-os para aumentar sua capacidade de hidrólise (SOCCOL et al., 1994).

1.3.4.1. Fungos filamentosos produtores de enzimas celulolíticas

Os fungos filamentosos estão em diferentes ambientes e possuem uma importância significativa para cada um deles. Esses micro-organismos são, entre outros, responsáveis pela ciclagem dos nutrientes, principalmente nos ecossistemas florestais. Seu principal habitat é o solo e nele representa, junto com as leveduras, os maiores constituintes da biomassa microbiana. Os fungos são responsáveis pela decomposição inicial dos compostos orgânicos e participam do grupo de indivíduos organotróficos (HYDE, 1997; MAIA et al., 2017).

Ainda segundo MAIA et al., (2017), esses micro-organismos liberam em diferentes ecossistemas que habitam, elementos como N, P, S e K. Além disso, atuam na estocagem de alimentos e no transporte de elementos como água, sais, minerais e outras substâncias da planta para o sol e vice-versa; participam na alteração da quantidade de água e íons; alteração de compostos tóxicos e recalcitrantes; estimulam a germinação de sementes e outras tantas atividades (WICKLOW; CARROLL, 1981).

Os avanços científicos acontecem em diferentes áreas e com as pesquisas no campo das enzimas não é diferente. Neste sentido, os fungos filamentosos vêm adquirindo espaço nas indústrias graças ao potencial que possuem, especialmente no tocante aos aspectos relacionados à melhoria do produto final (SOARES et al., 2010; SANTOS et al., 2015). Outros fatores como a facilidade de cultivo, a liberação de enzimas diretamente no meio de cultivo sem que haja a necessidade de ruptura das células e a elevada produção enzimática também caracterizam a posição de destaque desses micro-organismos pelas indústrias (STROPARO et al., 2012; SANTOS et al., 2015).

1.3.5 Potencial biotecnológico dos fungos

Fungos são seres vivos eucariotos que podem ser haploides, diploides ou poliploides. Possuem paredes quitinosas rígidas, formadas por polímeros de amino-açúcares, são heterotrófitos, dependem de substâncias orgânicas disponíveis no ambiente, podem se apresentar em duas formas, leveduriforme ou hifal, sendo altamente eficientes na degradação de inúmeros substratos. Muitas de suas substâncias metabólicas são de interesse industrial e comercial, além disso, os fungos são agentes decompositores naturais, principalmente de componentes primários da madeira como a celulose e a lignina (MINAMI, 2003).

Os fungos possuem uma grande diversidade entre si e características específicas que os diferenciam de qualquer outro reino (AZEVEDO, 2001). Uma de suas habilidades mais distinta é a de utilizar diferentes fontes de carbono como

alimento, sendo sua nutrição absorptiva e liberando enzimas no meio em que se encontram. Essa ação provoca a quebra de macromoléculas existentes no meio em moléculas mais solúveis que facilitam sua absorção, podendo ser carboidratos, lipídios ou proteínas e como componente de reserva primária de carboidratos utiliza o glicogênio (ALEXPOULOS et al., 1996). São agrupados em quatro filios: Chytridiomycota; Zygomycota; Ascomycota; e Basidiomycota. Até o presente momento o maior número de espécies já encontradas pertence ao filo Ascomycota, sendo suas nove classes ainda discutidas por especialistas (LOGUERCIO, 2004).

No tocante as aplicações biotecnológicas, esses seres podem ser utilizados em diferentes áreas e sua produção de metabolitos está diretamente ligada a função de interação com o meio ambiente, competição com outros organismos, fatores bióticos e abióticos e aos substratos disponíveis (AZEVEDO et al., 2002; ZHI-LIN et al., 2007).

Entre as principais aplicações estão: (a) o controle biológico - com a ação antagônica e de competição através da produção de compostos químicos, para o controle de pragas e outros agentes; (b) a produção de fármacos - utilizando metabolitos secundários como os antibióticos, os pigmentos e as toxinas (GUIMARÃES, 2006); (c) a produção de enzimas hidrolíticas: amilase; oxidoredutases; protease; lipase; celulase; pectinase; xilanase; e lipase para diferentes setores industriais (NIELSEN; OXENBOLL, 1998); (d) produção de compostos antioxidantes: radicais livres liberados durante o estresse oxidativo que modificam o DNA distribuído no meio intracelular e envolvidos nas inflamações, diabetes, carcinogênese, isquemia cerebral, e outros (OLIVEIRA, 2010).

1.3.6 Classe Ascomycetes

A classe dos ascomycetes é encontrada em diferentes ambientes, seja terrestre ou aquático, apresentam hábito sapróbio, simbiote ou até mesmo de parasitismo. Sendo o maior grupo de fungos, são conhecidas mais de 32.000 espécies e 3.328 gêneros agrupados em 270 famílias (KIRK et al., 2001).

Em relação as suas principais características, a formação de esporos sexuados ou ascósporos em estruturas saculiformes (a qual se denomina ascos) se destaca. Por serem parasitas de planta, animais e de outros fungos, decompositores e formarem ectomicorrizas, os estudos e a aplicação desses fungos é de grande interesse para as indústrias. Além disso, seu uso também tem sido reportado como alimento, no preparo dos mesmos e como produtor de inúmeras substâncias, tais como: antibióticos; vitaminas; proteínas; ácidos e principalmente enzimas; entre outras (ALEXOPOULOS et. al., 1996).

1.3.6.1 Gênero *Trichoderma*

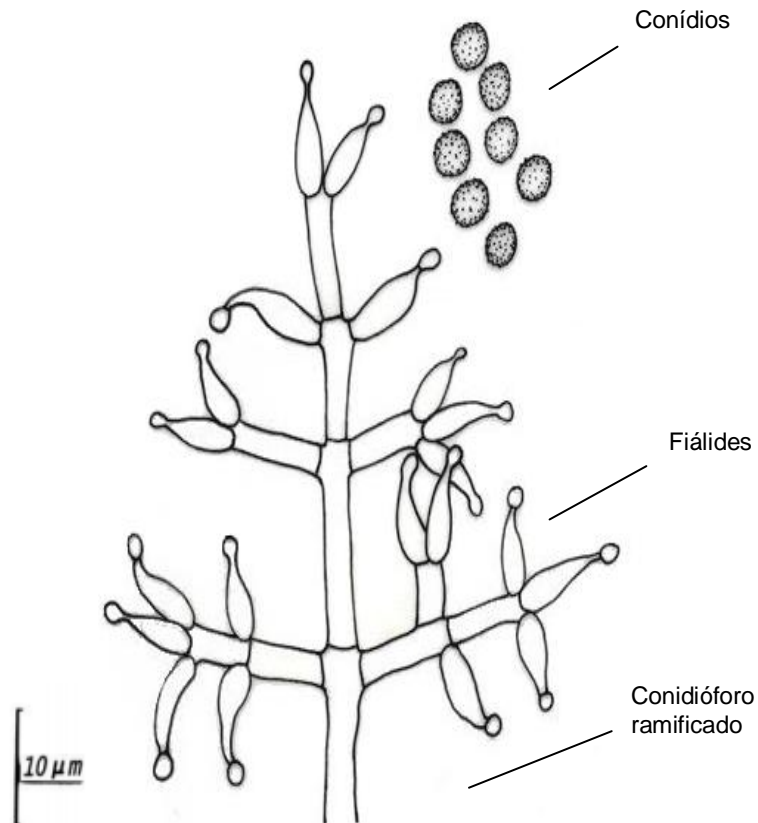
O gênero *Trichoderma* pertence à Família Hypocreaceae, Ordem Hypocreales, Classe Ascomycetes e ao Filo Ascomycota (KIRK, 2012). Inicialmente esse gênero foi proposto por Person (1794) para fungos com características bem definidas, mas que no nível de espécie, possuísse uma morfologia pouco definida.

Entre as principais características para a determinação do gênero consideram-se as seguintes: crescimento rápido em meio de cultura podendo atingir de 2 a 9 cm de diâmetro após quatro dias (ESPOSITO; SILVA, 1998); colônias flocosas, dispersas ou compactadas em tufos; conídios formados nas extremidades das fiálides de hifas diferenciadas (Figura 4), com tamanho e forma variada, assim como a coloração, que pode ser verde a amarelo ou hialino; conidióforos bem definidos (SAMUELS, 1996); e presença esporádica de clamidósporos. Os conídios possuem uma tendência de aglomeração e em algumas espécies para que ocorra a esporulação se faz necessária à presença de luz (TROIAN, 2014).

Espécies desse gênero são de grande interesse biotecnológico, pois se desenvolvem em diferentes substratos e condições ambientais variáveis (ESPOSITO; SILVA, 1998). Contudo, quando utilizado para o biocontrole se faz necessária uma análise ampla dos princípios biológicos de sua ação (MUKHERJEE et al., 2012). Em aplicações industriais, também são conhecidas por produzirem grandes quantidades de

enzimas celulolíticas e hidrolíticas, principalmente a espécie *Trichoderma reesei* e seus mutantes (EVELEIGH, 1985; BÉGUIN, 1990; KUBICEK, 1992; SANTOS, 2008).

Figura 4. Conidióforo característico da espécie *Trichoderma viride*.



Fonte: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/tri.htm> (2017) - adaptado.

1.3.6.2 Gênero *Aspergillus*

Aspergillus é um gênero bastante comum entre os fungos conidiais, estão disponíveis em diferentes lugares e participam da decomposição da matéria orgânica morta. A classificação mais importante sobre os fungos conidiais foi dada no século XIX, na obra *Sylloge Fungorum IV*, escrita por Saccardo (1886). Para esse autor,

haveria uma relação entre os fungos conidiais dada por suas características em comum, como a cor, a forma dos conídios e sua produção em estruturas fechadas, a ausência ou o padrão de associação dos conidióforos, a septação, e outros (CRUZ, 2008).

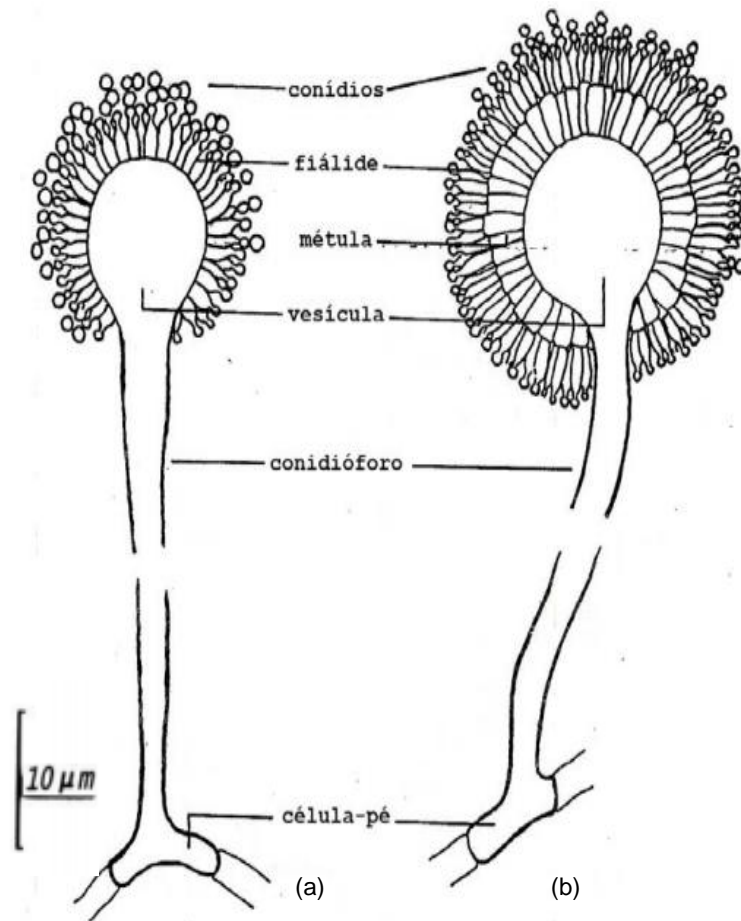
A principal característica dos fungos conidiais é a produção de estruturas reprodutivas, que dão origem aos conídios (esporos assexuados) e sua forma de produção, ontogenia e organização morfológica são os elementos que irão definir a taxonomia do grupo. Esses fungos estão presentes em quase todos os substratos, sendo organismos vivos, mortos ou até materiais industrializados (GUSMÃO, 2007).

O gênero *Aspergillus* é um grupo formado por fungos filamentosos descritos primeiramente por Michelli em 1729. Contudo, somente no século XIX houve um detalhamento de sua descrição e a classificação enquanto gênero foi dada primeiramente por Thom e Church em 1926 (SALES, 2010). Espécies desse gênero são cosmopolitas, sendo considerados fungos filamentosos anemófilos. Em sua fase anamorfa, participam da divisão Eucomycota, subdivisão Deuteromycotina, classe Hyphomycetes, ordem *Moniliales*, família *Moniliaceae*. Esse gênero apresenta mais de cem espécies, sendo identificadas através de características morfológicas e divididas em seis subgêneros (KLICH, 2002; SALES, 2010).

As espécies desse gênero constituem colônias filamentosas com diferentes características e microscopicamente apresentam hifas septadas com aproximadamente 4 mm de diâmetro. Sua estrutura de frutificação típica é formada por célula-pé, conidióforo, vesícula, métula e ou fiálide, esta promove a reprodução do fungo de forma assexuada através da produção de fialoconídios ou conídios como visto na Figura 5 (SALES, 2010).

Em algumas espécies desse gênero é possível ocorrer à forma sexuada (outeleomorfa), sendo verificada a presença de cleistotécio, ascos e ascósporos. Nesta situação, o fungo é classificado como teleomorfo e pertence a um dos oito gêneros existentes: *Emericella*, *Chaetosartorya*, *Neosartorya*, *Eurotium*, *Petromyces*, *Hemicarpenales*, *Fennellia* ou *Sclerocleista* (KLICH, 2002).

Figura 5. Conidióforos característicos de espécies de *Aspergillus*: (a) uniseriado de *Aspergillus equitus*; (b) biseriado de *Aspergillus ochraceus*.



Fonte: Klich e Pitt, 1998 (adaptado).

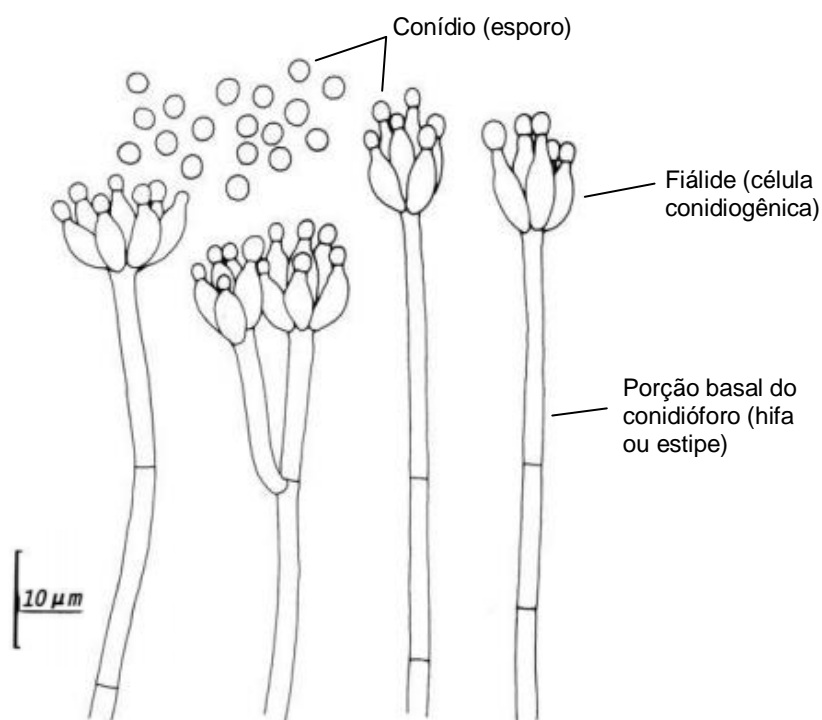
A importância industrial de algumas espécies desse gênero é bastante conhecida, principalmente na produção de vários alimentos que obtidos após o processo de fermentação, como no caso do molho de soja ou shoyu, pasta de soja ou missô e aguardente de arroz (o sake), que utilizam as espécies *A. oryzae*, *A. awamori*, *A. sojae* ou *A. kawachii* nos processos da fabricação. Os temperos do Oriente também utilizam enzimas microbianas proteolíticas e amilolíticas de espécies de *Aspergillus* (GOLDMAN; OSMANI, 2008).

Outras espécies desse gênero também são estudadas para a produção de produtos de interesse biotecnológico. Na produção de enzimas, o gênero é conhecido por sua alta produtividade de enzimas do complexo celulolítico e a enzima xilanase (SCHUSTER et al., 2002; SALES, 2010).

1.3.6.3 Gênero *Penicillium*

O gênero *Penicillium* foi descrito por Link em 1809 e seu nome tem origem no Latim *Penicillius* devido à disposição de seus conidióforos em formato de pincel, como visto na Figura 6 (BIOURGE, 1923). As espécies desse gênero se reproduzem através da produção de conídios, também conhecidos por esporos, que tem origem de estruturas denominadas conidióforos ou esporóforos (SILVIA, 2013).

Figura 6. Conidióforos característicos da espécie *Penicillium citreonigrum* Dierckx.



Fonte: http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp (2017) - adaptado.

Em 1949, Raper e Thom propuseram a existência de 137 espécies desse gênero em sua publicação “Manual of the Penicillia”. Essa identificação se baseou em características macroscópicas, microscópicas e fisiológicas, tais como: a textura e o desenvolvimento das colônias em meios de cultura padrão; temperatura de crescimento e pigmento, respectivamente. Seu crescimento geralmente ocorre com o uso de uma única fonte de carbono, podendo ser diversos monossacarídeos, dissacarídeos, alcoóis e ácidos. Apesar de a peptona ser o a melhor fonte de nitrogênio, algumas espécies conseguem crescer utilizando unicamente o nitrato e não exigem vitaminas complexas para seu crescimento (RAPER; THOM, 1949; SILVIA, 2013).

Para Alexopoulos et al., (1996), esse gênero é constituído somente por espécies anamorfias, que se incluem no Filo Ascomycota, Classe Plectomycetes, Ordem Eurotiales e Família Trichocomaceae. Em 2011, Houbraken e Samson sugeriram, após análises morfológicas e filogenéticas, a divisão da família Trichocomaceae em três: Aspergillaceae, Thermoascaceae e Trichocomaceae. Dessa forma o gênero passou a ser denominado *Penicillium sensu stricto*, apresentar também espécies teleomorfas e foi reclassificado para a família Aspergillaceae.

Entre as principais características do gênero, podemos verificar a formação de colônias por micélio nas colorações: verdes; verde-azuladas; verde-amarelas; verde-acinzentadas; incolores; avermelhadas; salmons; amarelo-arroxeados; brancas; e outras. Algumas espécies podem produzir pigmentos que modificam a tonalidade do meio de cultura e também, produzir gotas de exudato de coloração diversa, principalmente quando crescem em meio de cultura com Agar Extrato de Levedura Czapek – CYA (SILVIA, 2013).

As espécies do gênero *Penicillium* possuem um importante papel na natureza, participam dos ciclos biogeoquímicos e nos processos de decomposição da matéria orgânica. É possível encontrar espécies desse gênero em todos os ecossistemas, apesar de seu habitat natural ser o solo, pois são tolerantes as variações de condições físico-químicas (tais como temperatura, atividade da água e pH), possuem uma

elevada capacidade metabólica e poucas ou nenhuma exigência nutricional específica. Sua capacidade de resistência às condições extremas lhe confere a habilidade de crescer em diferentes ambientes em que exista uma reduzida quantidade de sais minerais até às mais complexas fontes de carbono (ONIONS; BRADY, 1987).

1.3.7 Resíduos agroindustriais

A biomassa lignocelulósica compreende toda matéria orgânica, ela é a fonte de matéria-prima mais abundante e disponível, sendo denominada também de biomassa residual e constituída em sua maioria por: resíduos agroindustriais, oriundos das indústrias de grãos, madeira, papel e outras; resíduos de origem urbana; e outros. A constituição dessa biomassa é praticamente dividida em três frações poliméricas unidas entre si, são elas: a lignina, a celulose e a hemicelulose (SZENGYEL, 2000; GONÇALVES et al., 2014). Outros componentes estruturais ou metabólicos fortemente interligados (por força covalentes ou não covalentes) também constituem a biomassa, tais como proteínas, minerais, ácidos orgânicos e açúcares livres (MENON; RAO, 2012; SANDERS et al., 2012).

Em virtude de o Brasil exercer uma extensiva atividade agrícola, enormes volumes de resíduos são gerados (BASSO; GALLO; BASSO, 2010; DANTAS; AQUINO, 2010). Somente a área de grãos plantada para a safra de 2016/2017 deve chegar a 60,49 milhões de hectares, cerca de 3,7% de crescimento quando comparada a safra anterior (CONAB, 2017). Esses grãos serão processados e armazenados, e todo esse processo gera toneladas de refugos agrícolas que incluem cascas, bagaço, palha, sabugo e outros que em sua maioria são descartados (SALAZAR et al., 2005; ROCHA; ALMEIDA; CRUZ, 2017).

O interesse pelo uso eficiente dos diversos resíduos agroindustriais tem crescido (principalmente quando sua composição é basicamente composta por celulose e hemicelulose) e junto com ele o desenvolvimento de vários bioprocessos, que utilizam estas biomassas como fonte energética e de produção de inúmeras moléculas com alto

valor agregado, como por exemplo, ácidos orgânicos, proteínas microbianas e enzimas (FLORENCIO, 2011).

As principais vantagens de utilização da biomassa de origem agroindustrial se devem ao fato de serem recursos naturais renováveis; sua produção depender de outra atividade produtiva; se apresentarem em uma grande quantidade (o que pode constituir um passivo ambiental); e sendo utilizado como substrato é possível se obter uma especificidade do extrato enzimático, além da hidrólise do próprio resíduo (MACIEL, 2006).

Devido à quantidade de nutrientes e outros compostos, assim como as crescentes preocupações ambientais, os resíduos agroindustriais têm sido estudados com intuito de desenvolver processos biotecnológicos eficientes para sua conversão em produtos com alto valor agregado e não tóxicos ao meio ambiente (NARAIAN et al., 2010).

Os resíduos agroindustriais também representam uma fonte alternativa muito importante na obtenção de enzimas microbianas (SIQUEIRA et al., 2010), servem como fonte de carbono e de outros nutrientes, dando suporte ao crescimento microbiano (PANDEY, 2003). Além disso, esse processo de conversão dos polímeros da parede celular vegetal em açúcar fermentescíveis é fundamental para a produção de alimentos, produtos farmacêuticos e químicos (BASSO, GALLO e BASSO, 2010).

Os fungos filamentosos são os micro-organismos mais promissores na produção de importantes metabólitos utilizando resíduos agroindustriais (DANTAS; AQUINO, 2010; SANTOS et al., 2013). Vários estudos têm sido realizados com diferentes tipos de resíduos agroindustriais sendo utilizada como matéria prima para a produção de celulases em fungos filamentosos (KABEL et al., 2005; LEITE et al., 2008; NIEVES et al., 2009; SINGHANIA et al., 2009).

Os centros de distribuição e armazenamento de alimentos geram grande quantidade de resíduos semelhante aos agroindustriais, uma vez que possuem produtos da mesma origem. Neste sentido, a obtenção dos resíduos utilizados neste estudo se deu por fontes comerciais oriundas do Centro de Abastecimento e Logística

de Pernambuco – CEASA/PE.

1.3.7.1 Resíduo de farelo de milho

O milho (*Zea mays mays* L.) pertence à família *Gramineae*, registros arqueológicos de sua origem datam de 7.500 A. P. na América Central e 4.500 A. P. na América do Sul e na costa do Peru. Essa espécie pode ser cultivada em diferentes ambientes, podendo ser nos hemisférios norte ou sul, em regiões montanhosas ou ao nível do mar, em regiões úmidas ou secas, tudo isso graças à sua grande capacidade adaptativa aos diferentes climas (FREITA, 2002; RITCHIE et al., 2003; MATOS, 2007).

Esse alimento é o cereal mais cultivado no mundo, podendo ser utilizado na alimentação de animais até em indústrias com alta tecnologia. Cerca de 70% de seu consumo ocorre na forma de grãos em todo o mundo e seus derivados participam da alimentação humana constituindo uma importante fonte de alimento (DUARTE; MATTOSO; GARCIA, 2017).

Os Estados Unidos, a China e o Brasil são os maiores produtores de milho, ocupando o primeiro, segundo e terceiro lugar, respectivamente. No Brasil, o milho é o terceiro produto agrícola mais produzido, ficando atrás da cana-de-açúcar e da soja (FAO, 2014). Somente para a primeira safra do período 2016/2017, um total de 5529,3 mil hectares de área plantada gerou 30.397,3 mil toneladas, um aumento de 18% em relação ao mesmo período da safra anterior (CONAB, 2017).

Na indústria do milho, a palha e o sabugo são importantes subprodutos, obtidos muitas vezes durante a colheita. A palha em sua maioria não possui um uso definido e se torna um resíduo, enquanto o sabugo, resíduo gerado após a debulhagem do milho, muitas vezes são utilizados no preparo de ração animal (SANTOS, 2014). Para cada tonelada de milho processado são gerados, aproximadamente, 180 kg de sabugo (TSAI, 2000; TORRE et al., 2008) e 700 kg de palha (HORST, 2013).

1.3.7.2 Resíduo de casca de tangerina

A tangerina (*Citrus reticulata* Blanco) pertence à família Rutaceae e tem origem asiática, da Indochina e do Sul da China. O fruto tem tamanho médio e forma oblata, sua casca é firme, fina, fácil de remover, possui superfície lisa e cor laranja a tons avermelhados. Internamente a polpa é de cor laranja, com segmentos fáceis de separar e poucas sementes. Cerca de 43% de seu peso total corresponde ao suco e essa fruta está entre os citros mais produzidos e consumidos no mundo, sendo utilizada para o consumo em natura ou para industrialização, com a obtenção de produtos processados, tais como óleos essenciais, rações e pectina. (EMBRAPA, 2017).

Em todo o mundo, cerca de 29.864.485 toneladas de tangerina foram produzidas no ano de 2014, sendo a China a maior produtora, seguida pela Espanha, Marrocos e o Brasil, em quarto lugar com uma produção de 965.167 toneladas. A produção dessa fruta para o ano seguinte no Brasil teve um aumento significativo, chegando a 999.686 toneladas (EMBRAPA, 2017).

As cascas de frutas cítricas possuem aplicações pouco reconhecidas, contudo são importantes fontes de nutrientes que necessitam ser explorados. Resíduos como esses são ricos em óleos essenciais, pigmentos naturais, pectina e outros, apresentam altos teores de carboidrato, lipídeos, proteínas, fibras, antioxidantes e flavonoides, que podem ser utilizados em alimentos (KOBORI; NUNES, 2005; FERNANDES et al., 2006; MAURO et al., 2010).

1.3.7.3 Resíduo de casca e coroa de abacaxi

O abacaxi (*Ananas comosus* L. Meril) pertence à família *Bromeliaceae* é uma planta herbácea e perene, possui talo de clava curta e grossa, seu fruto geralmente é grande e possui comprimento superior a 15 cm. A polpa desse fruto pode variar de

coloração, geralmente não apresenta sementes, é succulenta e essa espécie possui origem no continente americano, entre o Brasil e o Paraguai (EMBRAPA, 2017).

O fruto dessa espécie é bastante consumido, além de servir como alimento natural e para produção de produtos industrializados, tais como o álcool de uso farmacêutico, ácido cítrico, vinagre, vinhos e amido comercial, a bromelina, uma enzima presente na espécie, possui ampla utilidade para a indústria de alimentos, farmacêutica e de bebidas (EMBRAPA, 2017).

A produção mundial de abacaxi para o ano de 2014 foi de 25.439.365 toneladas e no Brasil, o segundo maior produtor do fruto em 2015, a produção chegou a 1.801.415 toneladas (EMBRAPA, 2017). Parte dessa produção é destinada ao beneficiamento do abacaxi, que resulta em uma considerável quantidade de resíduo, cerca de 65 a 75% do fruto (LOUSADA JÚNIOR et al., 2006; LEONEL; LEONEL; SAMPAIO, 2014). Contudo, existe uma grande viabilidade de utilização desse resíduo, principalmente da casca onde se encontram as fibras e outros nutrientes importantes, para produção de enzimas como a bromelina (IMANDI et al., 2008).

1.3.7.4 Resíduo de farelo de trigo

O trigo é uma gramínea que pertence ao Reino Plantae, família *Poaceacea* e ao gênero *Triticum*, teve sua origem a partir do cruzamento de outras plantas silvestres que existiam próximas aos rios Tigre e Eufrates, sendo introduzida na Índia, China e Europa desde cinco mil anos a.C. (BRAMMER, 2000; MORAES-FERNANDES et al., 2000).

Entre as principais vantagens do trigo, a que mais se destaca é a propriedade de manter suas características de qualidade, mesmo sendo armazenado por um longo período. Essa propriedade foi muito importante para o desenvolvimento das civilizações e continua sendo um dos principais alimentos dos países desenvolvidos (EMBRAPA, 2017).

O trigo é a segunda maior cultura do mundo, constitui cerca de 30% da produção mundial de cereais. Aproximadamente 65% da produção é destinada para o consumo humano, principalmente pela indústria alimentícia na forma de farinha branca utilizada para produção de massas alimentícias, pães, bolos, biscoitos e como ingrediente na fabricação de outros alimentos. Uma parcela de 20% é destinada para a alimentação animal e os 15% restantes são utilizados como sementes e em usos industriais (MIRANDA, 2006).

A safra brasileira no ano de 2016 foi muito boa e devido a esse fator as áreas de plantio para a safra de 2017 foram reduzidas. Contudo, a semeadura ainda está ocorrendo e nos dois maiores estados produtores, Rio Grande do Sul e Paraná, tem atingido cerca de 57% e 90% da área plantada com o cereal respectivamente e estimada para os estados (CONAB, 2017). Sua projeção para 2020/2021 é de 6,9 milhões de toneladas produzidas e 11,7 milhões de toneladas para consumo, sendo necessário realizar importações para abastecer e suprir a demanda de 4,8 milhões de toneladas (MAPA, 2012).

O Brasil apresenta potencial de expansão na produção de trigo com ótima qualidade, todavia, estima-se que são geradas 1,36 toneladas de palha para cada tonelada de grãos produzidos, sendo necessária uma destinação correta para essa abundante biomassa lignocelulolítica (HORST, 2013).

1.3.8 Aplicação das enzimas celulolíticas

De acordo com Zanchetta (2013), as enzimas celulolíticas são utilizadas em diversas aplicações biotecnológicas e em diferentes áreas e atividades industriais, caracterizando assim sua importância econômica. Na indústria de alimentos pode ser aplicada para melhorar as propriedades sensoriais de massas; extração de óleos de sementes; na de bebidas pode facilitar o processamento, maceração, extração e clarificação de sucos de frutas, rompendo a rede de celulose das células vegetais que mantém o líquido retido. Participam também da produção de cervejas e na produção de

vinhos, que utiliza principalmente a β -glicosidase para extração de pigmentos e substâncias aromáticas presentes na casca da uva, auxiliam na degradação de compostos de sabor desagradável e liberam substâncias flavorizantes que aprimoram o sabor e o aroma do vinho (GHORAI et. al., 2009; ZANCHETTA, 2013).

Na indústria têxtil se aplica em processos de biopolimento (que desfibrila os tecidos feitos de algodão, lã, linho e viscose) e bioestonagem (que permite amaciar e desbotar o brim). Essas enzimas atuam degradando a celulose presente nas fibras da superfície do tecido tornando-os mais lisos, macios e com melhor caimento. Também participam no processo de envelhecimento do jeans, removendo parcialmente o corante índigo, que era realizado com pedra-pomes, causando várias desvantagens tanto para as máquinas de lavar e secadoras que sofriam desgaste, quanto para os próprios tecidos, que diminuía sua qualidade devido à abrasão excessiva (CASTRO; PEREIRA JÚNIOR, 2010; ZANCHETTA, 2013).

Já nas indústrias de polpa e papel, essas enzimas tornam o papel mais branco e liso, atuam modificando de forma controlada as propriedades mecânicas da polpa e liberação de tintas existentes na superfície das fibras a serem recicladas. Também são utilizadas na fabricação de detergentes domésticos e industriais, que além de degradarem menos os tecidos proporcionam maior limpeza; gestão de resíduos e águas residuais; medicina farmacêutica (BHAT, 2000; FLORENCIO, 2011; JUTURO; WU, 2014; SANTOS, 2014; YOON et al., 2014).

Na alimentação animal, a aplicação dessas enzimas se dá como aditivo na produção das rações para ruminantes, suínos e aves com a finalidade de facilitar a digestão de alimentos ricos em fibras de celulose (o que melhora a conversão do alimento e aumentando a produção de carne e leite), e como um componente indutor da silagem (ANNAMALAI et al., 2014).

Nos últimos dez anos houve um aumento na demanda enzimas celulolíticas, graças a sua utilização na área energética, a qual vem sendo aplicada em processos de sacarificação de materiais lignocelulósicos (resíduos vegetais: bagaço e palha de cana; cascas de arroz e de outros grãos; talos, sabugo e palha de milho; restos de madeiras; e outros) para a produção de biocombustíveis (PANDEY et. al., 1999;

FERNANDES, 2009; ZANCHETTA, 2013; ANNAMALAI et al., 2014; GUPTA; VERMA, 2015).

1.3.9 Mercado de enzimas

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria e Comércio de Ingredientes e Aditivos para Alimentos – ABIAM (2015), o mercado global de enzimas industriais movimenta cerca de 4 bilhões de dólares e estima-se que o Brasil participe de 6% desse total, o que representa 240 milhões de dólares. Entre os campos de interesse e aplicação industrial das enzimas estão: detergentes; alimentos e bebidas; nutrição animal; indústrias técnicas; biocombustíveis; e indústria farmacêutica.

O crescimento do mercado mundial de enzimas ocorre diariamente e em campos de aplicações distintos, como por exemplo, nas indústrias químicas, farmacêuticas, de alimentos e de cosmética. A compreensão do comportamento catalítico das enzimas se deu através de pesquisas realizadas em diferentes áreas, como a da engenharia e biologia molecular, conduzindo a novas aplicações e ao uso de várias enzimas, tais como: lípases, proteases, acilases, amilases, oxidases, glicosidases e celulasas (ALTARUGIO; PEREIRA, 2016; VILLENEUVE, 2007).

De acordo com Politzer e Bom (2006), cada vez mais a sustentabilidade tem sido incorporada as atividades produtivas, com o intuito de substituir os processos químicos baseados em insumos não renováveis pelos que se baseiam em processos químicos ou bioquímicos, utilizando insumos renováveis. Outro fator amplamente reconhecido é a necessidade da substituição das inúmeras etapas dos processos químicos por processos mais eficientes como os biotecnológicos, o que favorece dessa forma a utilização de matérias primas renováveis pelas tecnologias de biotransformação e biocatálise. Esses processos já são utilizados pelas indústrias, todavia, existe um grande interesse no desenvolvimento e implementação de novos processos que resultem em produtos de maior qualidade e que tenham sido obtidos por processos que consumam menos energia e causem um menor impacto ambiental.

Ainda segundo Politzer e Bom (2006), em decorrência destas necessidades e tendências relacionadas às atividades produtivas, ocorrerão aumentos significativos do consumo de enzimas no país e no mundo. Esta perspectiva é particularmente importante para o Brasil, uma vez que o país possui ampla potencialidade de desenvolvimento e produção de Tecnologia Enzimática, com a utilização de matéria prima renovável, colaborando para a preservação ambiental. Além disso, o meio ambiente brasileiro representa um ativo de valor incalculável que contribui de maneira decisiva para alavancar a representatividade brasileira do setor enzimático no cenário internacional.

Mussato et al. (2007) e Murugan et al. (2011) mostraram em seus estudos que grande parte da economia mundial tem origem em processos biotecnológicos microbianos, contudo, a pesar de existir um potencial muito interessante, os custos com o desenvolvimento dos processos enzimáticos ainda são muito elevados. Neste sentido, surge o uso de resíduos agroindustriais como substrato para compor uma das alternativas que minimizam este problema e também solucionam outros de cunho ambiental e econômico. As enzimas estão entre as substâncias produzidas por microorganismos que mais se destacam, uma vez que essa produção chega a movimentar aproximadamente 2,34 bilhões de dólares por ano no mercado internacional (MUSSATTO et al., 2007).

No Brasil, o uso das enzimas em processos industriais como catalisadores é de fundamental importância para se obtenção de produtos com alta qualidade e com maior valor agregado, devido ao uso de tecnologias limpas, acompanhando as necessidades tecnológicas, ambientais (que norteiam os processos produtivos internacionais) e de mercado (POLITZER; BOM, 2006).

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus Níger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 57-70, jan./jun., 2000.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. 1996. **Introductory Mycology**. John Wiley & Sons, Inc, New York.

ALTARUGIO, L. M.; PEREIRA, E. B. Imobilização de lipase de *Candida rugosa* em micropartículas de quitosana utilizando diferentes agentes ativadores. **Revista Brasileira de Iniciação Científica**, Itapetininga, v. 3, n. 1, 2016. Disponível em: < <https://itp.ifsp.edu.br/ojs/index.php/IC/article/viewFile/58/390> >. Acesso em: 14 de março de 2017.

ANNAMALAI, N.; RAJESWARI, M. V.; BALASUBRAMANIAN, T. Enzymatic saccharification of pretreated rice straw by cellulase produced from *Bacillus carboniphilus* CAS 3 utilizing lignocellulosic wastes through statistical optimization. **Biomass and Bioenergy**, v. 68, p. 151 -160, 2014.

ARAÚJO, C. K. C. **Avaliação da influência de surfactantes químico e biológico na hidrólise enzimática da casca do coco verde após pré-tratamento ácido/alcalino e com peróxido de hidrogênio alcalino**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Natal, 2016.

ARAÚJO, M. A. M. **Isolamento e seleção de leveduras para produção de enzimas de interesse industrial a partir de frutos do cerrado**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2015.

AWAFO, V. A.; Tese de Doutorado, McGill University, Canadá, 1997.

BAPTISTA, N. M. Q. **Produção das enzimas lignina peroxidase e lacase por fungos filamentosos**. Especialização em Micologia (Monografia). Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, 2011.

BASSO, T. P. **Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e serrapilheira em comparação com cepas de *Trichoderma reesei***. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2010.

BASSO, T. P. ; GALLO, C. R. ; BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, n.11, p.1282-1289, nov. 2010.

BAYER, E. A. & LAMED, R. The cellulase paradox: pollutant par excellence and a reclaimable natural resource. **Review Biodegradation**, 3 (2-3), 171-88.

BÉGUIN, P. Molecular biology of cellulose degradation. **Annual Review of Microbiology**, v.44, p.219-248, 1990.

BHAT, M. K. Cellulase and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, p. 355-383, 2000.

BIOURGE, P. Les moisissures du groupe *Penicillium* Link. **Cellule** 33: 7–331, 1923.

BIRSAN, C. et al. Mechanisms of cellulases and xylanases. **Biochem. Soc. Trans.** v.26 p.156–160, 1998.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. In: Enzimas em Biotecnologia: Produções, Aplicações e Mercado. 1ª ed. Rio de Janeiro. Bon, E.P.S. et al.(eds). **Interciência Brasil**. p. 241-271, 2008.

BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. Dissertação de Mestrado, 76 p., 2011.

BRAMMER, S. P. **Mapeamento de genes de resistência parcial à ferrugem da folha em**

cultivares brasileiras de trigo (*Triticum aestivum* L. em Thell). 105p. Tese (Doutorado) UFRGS, Porto Alegre – RS, 2000.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Projeções do Agronegócio: Brasil 2011/2012 a 2021/2022 / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Assessoria de Gestão Estratégica – Brasília : Mapa/ACS, 2012. 76 p. ISBN 978-85-7991-068-5 <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/projecoes-do-agronegocio-brasil-2011-2012-a-2021-2022.pdf/view>>

BRAVO, C. E. C.; CARVALHO, E. P.; SCHWAN, R. F.; GÓMEZ, R. J. H. C.; PILON, L. Determinação de condições ideais para a produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência Agrotecnológica**, v.24(edição especial), p.137-152, 2000.

BRODA, P. Biotechnology in the degradation and utilization of lignocellulose. **Biodegrad.** v.3 p.219-38, 1992.

CAO, Y. ; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**. v. 337, p. 1291-1296, 2002.

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

CNABRASIL – Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. <http://www.cnabrazil.org.br/sites/default/files/sites/default/files/uploads/10_fruticultura.pdf> Acesso em: 07 de agosto de 2017.

COELHO, R. R. R.; NASCIMENTO, R. P. Seleção de actinomicetos produtores de enzimas de interesse biotecnológico. In. BOM, E. P. S. ; FERRARA, M. A. ; CORVO, M. L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: **Interciência**, 2008.p.71-94.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acomp. safra bras. grãos, v. 4 Safra 2016/17 - Décimo levantamento, Brasília, p. 1-171 julho 2017. <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_07_12_11_17_01_boletim_graos_julho_2017.pdf> Acesso em: 07 de agosto de 2017.

COURI, S.; DAMASO, M. C. T. Árvore do conhecimento: Tecnologia de alimentos. Agência Embrapa de Informação Tecnológica – AGEITEC. EMBRAPA. <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT00fid5sgif02wyiv80z4s473v6o7sud.html#> Acesso em: 09 de agosto de 2017.

CRUZ, A. C. R. Fungos conidiais do bioma da Caatinga no semi-árido brasileiro. Dissertação (Mestrado). Ciências – Botânicas. Feira de Santana – BA, 2008.

DANTAS, E. M. ; AQUINO, L. C. L. Fermentação em Estado Sólido de diferentes resíduos para a obtenção de lipase microbiana. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.12, n.1, p.81-87.

DESHPANDE, S.K.; BHOTMANGE, M.G.; CHAKRABART, 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.

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**, v. 42, p. 236-242, 2013.

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.

DINGLE, J. ; REID, W. W.; SOLOMONS, G. L.. The enzymatic degradation of pectin and other polysaccharides. II. Application of the “cup-plate” assay to the estimation of

enzymes. **Journal for the Science of Food and Agriculture**, -----, p. 149-155, 1953.

DUARTE, J. O. ; MATTOSO, M. J. ; GARCIA, J. C. ÁRVORE DO CONHECIMENTO: Milho - Importância socioeconômica. **Agencia Embrapa de Informação Tecnológica** – **AGEITEC**, 2017.<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONTAG01_8_168200511157.html>

DZIEZAC, J. D. Enzymes: catalysts for food processes. **Food Technology**, Chicago, v. 45, p. 78-85, 1991.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMPRAPA. Informações sobre o cultivo do trigo <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/trigo1>>

ESPOSITO, E. ; SILVA, M. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. **Critical Reviews in Microbiology**, v.24, n.2, p.89-98, 1998.

EVELEIGH, D. E. *Trichoderma*. In: DEMAIN, A. L., SOLOMON, N. A. (eds) **Biology of industrial micro-organisms**. 1985. pp. 487-509.

FARINAS, C. S.. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. / Cristiane Sanchez Farinas. -- São Carlos: **Embrapa Instrumentação**, 2011. 13 p. – (Embrapa Instrumentação. Documentos, ISSN: 1518-7179; 54). Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/919344/1/DOC542011.pdf>>. Acesso em 09 de agosto de 2017.

FAO – **Food and Agriculture Organization of the United Nations**: Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>.

FERNANDES, A. P. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

FERNANDES, R. E. ; CARDOSO, M. G. ; HOFFMANN, R. S. (2006). Aproveitamento da casca da laranja através da extração de óleos essenciais. **XXI Congresso de Iniciação científica de tecnológica em Engenharia**, Santa Maria.

FLORENCIO, C. **Microrganismos produtores de celulases : seleção de isolados de *Trichoderma spp.*** / Camila Florencio. – São Carlos : UFSCar, 2011. 83 f. Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

FREITAS, F. O. As Expansões do Milho – *Zea mays*, L. - para a América do Sul, baseado no resgate e estudo de DNA ancião de amostras arqueológicas. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. 20 p. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, ISSN 1676-1340 ; n. 32. <<https://www.embrapa.br/documents/1355163/2019007/bpd032.pdf/95609bbe-449c-48ea-9980-1069671239ee>>

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987. <https://www.iupac.org/publications/pac-2007/1987/pdf/5902x0257.pdf>

GOLDMAN, G. H. ; OSMANI, S. The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods. **Boca Raton, USA: CRC Press**, 2008.

GONÇALVES, F. A. ; et al.. Comparison of delignified coconuts waste and cactus for fuel-ethanol production by the simultaneous and semi-simultaneous saccharification and fermentation strategies. **Fuel**, v. 131, p.66-76, 2014.

GUPTA, A. ; VERMA, J.P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review.

Renewable and Sustainable Energy Reviews. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 550–567, 2015.

GURUNG, N. ; et al. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. **BioMed Research International**. Volume 2013 (2013), Article ID 329121, 18 pages. <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/329121>>

GUSMÃO, L. F. P. ; BARBOSA, F. R. ; BARBOSA, F. F. Fungos conidiais. Diversidade e caracterização dos fungos no semi-árido. Associação Plantas do Nordeste. Recife, p. 27-47, 2007.

GUTIERREZ-CORREA, M., TENGERDY, R.P. Production of cellulase on sugar cane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**. v. 19, p. 665-667, 1997.

HANSEN, G.H.; LÜBECK, M.; FRISVAD, J.C.; LÜBECK, P.S.; ANDERSEN, B. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation.

Process Biochemistry, v. 50, p. 1327–1341, 2015.

HENRISSAT, B. A.; A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**., v. 280,p, 309-316, 1991.

HORST, D. J. **Avaliação da produção energética a partir de ligninas contidas em biomassas**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Ponta Grossa – PR, 2013.

<<http://www.pg.utfpr.edu.br/dirppg/ppgep/dissertacoes/arquivos/216/Dissertacao.pdf>>

HYDE, K. D. 1997. Biodiversity of Tropical Microfungi. Hong Kong University Press, Hong Kong. Ingleby, K., Walker, C. & Mason, P.A. 1994. *Acaulospora excavata* sp. nov. - An endomycorrhizal fungus from Cote d' Ivoire. *Mycotaxon* 50: 99-105.

IMANDI, S. B. ; *et al.* Application of statistical experimental designs for the optimization of medium constituents for the production of citric acid from pineapple waste. **Bioresource Technology**, Essex, v.99, p.4.445– 4.450, 2008.

INÁCIO, R. M. **Panorama da utilização de resíduos do beneficiamento do arroz para geração de energia no Brasil e formas de aplicação**. Dissertação (Mestrado) Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2016.

JUTURO, V.; WU, J.C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 188–203, 2014.

KABEL, M. A.; et al.. Standard assays do not predict the efficiency of commercial cellulose preparations towards plant materials. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 93, p. 56-63, 2005.

KIRK, P. Index Fungorum. CABI Bioscience, CBS and Landcare Research, available online, ed. 2012. Disponível em <www.indexfungorum.org>. Acesso em: 17/02/2017

KIRK, P.M.; Cannon, P.F.; David, J.C. & Stalpers, J.A. 2001. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 9 ed. CABI Bioscience, Egham.

KLEMAN-LEYER, K. M.; SIIKA-AHO, M.; TEERI, T. T.; KIRK, T. K.; The Cellulases Endoglucanase I and Cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* Act Synergistically To Solubilize Native Cotton Cellulose but Not To Decrease Its Molecular Size. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, p.2883, 1996.

KLICH, M. A. Identification of common Aspergillus species. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002.

KLICH, M. A. ; PITT, J. I. A laboratory guide to common Aspergillus species and their teleomorphs. North Ryde, Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Division of Food Processing, 1988.

KOBORI, C. N., NUNES, J. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 5, p. 1008-10014, 2005.

KUBICEK C. P. The cellulase proteins of *Trichoderma reesei* : structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation. **Advances in biochemical engineering, biotechnology**, v.45, p.1-27, 1992.

LEITE, R. S. R.; et. al.. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium*

pullulans in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 391–395, 2008.

LEONEL, S. ; LEONEL, M. ; SAMPAIO, A. C. Processamento de frutos de abacaxizeiro cv smooth cayenne: perfil de açúcares e ácidos dos sucos e composição nutricional da farinha de cascas. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 36, n. 2, p. 433-439, Junho 2014 <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v36n2/v36n2a20.pdf>>

LIAO, H.; FAN, X.T.; MEI, X.; WEI, Z.; RAZA, W.; SHEN, Q.; XU, Y. Production and characterization of cellulolytic enzyme from *Penicillium oxalicum* GZ-2 and its application in lignocellulose saccharification. **Biomass and Bioenergy**, v. 74, p. 122 – 134, 2015.

LOUSADA JÚNIOR, J. E.; *et al.* Caracterização físico-química de subprodutos obtidos do processamento de frutas tropicais visando a seu aproveitamento na alimentação animal. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.37, n.1, p.70-76, 2006.

LYND, L. R. et al. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Review**. v.66 p.506-577, 2002.

LYND, L. R.; ZHANG, Y.; Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach. **Biotechnology Bioengineering**, v. 77,p. 467-475, 2002.

MACIEL, G. M. **Desenvolvimento de Bioprocesso para Produção de Xilanases por Fermentação no Estado Sólido Utilizando Bagaço de Cana de Açúcar e Farelo De Soja**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 133f, 2006.

MACHIELSEN, R. ; DIJKHUIZEN, S. ; VAN DER OOST J. Improving enzyme performance in food applications. In: Rastall R. **Novel enzyme technology for food applications**, CRC Press, Boca Raton, New York, 2007; 16-42

MATOS, E. H. S. F. 2007. **Dossiê técnico cultivo do milho verde**. 24p. CDT – Centro de Apoio ao Desenvolvimento Técnico, Brasília, UNB. <<https://www.agrolink.com.br/downloads/Cultivo%20do%20Milho%20Verde.pdf>>

MAURO, A. K. ; Silva, V. L. M. ; Freitas, M. C. J. Caracterização física, química e sensorial de cookies confeccionados com farinha de talo de couve (ftc) de farinha de talo de espinafre (fte) ricas em fibra alimentar. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 30, n. 3, p. 719-728, 2010.

MENEZES, C. R.; BARRETO, A. R. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos: caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimático fúngico. **Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas – UFSM Santa Maria Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental** e-ISSN 2236 1170 - V. 19, n. 2, mai - ago. 2015, p. 1365-1391.

MENON, V. ; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**. v. 38, p. 522-550, 2012.

MENEZES, T. J. B. Os fungos na indústria. **Boletim da SBCTA**, V. 31, N. 2, P. 116-120, 1997.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MIRANDA, M. Z. Trigo: germinação e posterior extrusão para obtenção de farinha integral extrusada de trigo germinado. **Documentos on line**, n. 74, Passo Fundo – RS, dez. 2006. <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do74_1.htm>

MORAES-FERNANDES, M. I. B. ; *et al.* Cytogenetics and immature culture embryo at Embrapa Trigo breeding program: transfer of disease from related species by artificial resynthesis of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell). **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p.1051-1062. 2000. <<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572000000400051>>

MUKHERJEE, M. ; MUKHERJEE, P. K. ; HOEWITZ, B. A. ; ZACHOV, C. ; BERG, G. ; ZEILINGER, S. (2012). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions: advances in genetics of biological control. **Indian J Microbiol** 54:522–529.

MURUGAN, S., ARNOLD, D., PONGIYA, U.D., NARAYANAN, P.M., 2011. Production of Xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC 6915 Using Saw Dust As Substrate under Solid State **Fermentation. Enzyme Research.**

MUSSATTO, S.I., FERNANDES, M., MILAGRES, A.M.M., 2007. Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**. São Paulo. 41(242), 28-33.

NARAIAN R. ; et al.. Studies on in vitro degradability of mixed crude enzyme extracts produced from *Pleurotus* spp. **Journal of environmental Biology**, 31;945-951, 2010.

NIEVES, R. A. ; et al.. Thechnical communication: survey and analysis of commercial cellulose preparations suitable for biomass conversion to ethanol. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.14, p. 301-4, 2009.

NOGUEIRA, E.B.S. & CAVALCANTI, M.A.Q. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 7-9, 1996.

NOVO NORDISK. **Celluclast 1,5L**: ficha técnica. Curitiba,1996.

OLIVEIRA, S. L. R. **Aproveitamento da casca do coco verde (*Cocos nucifera* L.) para produção de celulasas**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Depto. de Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2010.

ONIONS, A. H. S. ; BRADY, B. L. Taxonomy of *Penicillium* and *Acremonium*. In: Peberdy, J.F. (Ed.) *Biotechnology Handbooks 1 Penicillium and Acremonium*. New York and London, **Plenum Press**, pp. 1-36,1987.

PALOMER, X. ; et al.. Study of the strawberry Cel1 endo- β -(1,4)-glucanase protein accumulation and characterization of its in vitro activity by heterologous expression in *Pichia pastoris*. **Plant Science**. v. 167, p. 509-518. 2004

PANDEY, A. Solid State Fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p. 81-84, 2003.

PANDEY, A. ; *et al.*. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, Bangalore, v. 77, n. 1, p. 149-162, July, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v.74, p.69-80, 2000.

PANESAR, P. S. ; KAUR, R. ; SINGLA, G. ; SANGWAN, R. S. Bio-processing of Agro-industrial Wastes for Production of Food-grade Enzymes: Progress and Prospects. **Applied Food Biotechnology**, 2016, 3 (4) : 208-227

PARANÁ. Paulo Fernando de Souza Andrade. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento Departamento de Economia Rural. **Análise da conjuntura agropecuária safra 2016/2017: FRUTICULTURA**. 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2017/Frusicultura_2016_17.pdf>. Acesso em: 07 de agosto de 2017.

PATEL, R. N. Microbial enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 31, p. 804-826, 2002.

PETROVA, S.D.; BAKALOVA, N.G.; KOLEV, D.N. Properties of two endoglucanases from a mutant strain *Trichoderma* sp. M7. **Biotechnology Letters**. v, 24, p. 2104-2111, 2002.

PEREIRA, D. E. P. **Análise de celulases e xilanases por fungo isolado a partir do Bioma Cerrado**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia, 2014.

PIZARRO, A. V. L. ; PARK, E. Y. Lypase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. **Process Biochemistry**, London, v. 38, p. 1077-1082, 2003.

POLITZER, K. ; BOM, E. P. da S. Enzimas Industriais e Especiais. Volume 1 Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Disponível em: < http://www.redetec.org.br/wp-content/uploads/2015/02/tr03_enzimas.pdf > Acesso em: 16 de março de 2017.

POLSHETTIWART, V.; et. al.. [2011]. **Chemical Review**, v. 11, p. 3036-3075.

PORTAL BRASIL, <<http://www.brasil.gov.br/infraestrutura/2017/05/agropecuaria-brasileira-e-uma-das-que-mais-cresce-no-mundo>> Acesso em: 07 de agosto de 2017.

QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E. ; FOLCH-MALLOL, J. L. **Chapter 6: Hydrolysis of biomass mediated by cellulases for the production of sugars.** Sustainable degradation of lignocellulosic biomass – Techniques, Applications and Commercialization. May 15, 2013. <<http://dx.doi.org/10.5772/53719>>

RAJOKA, M.I.; BASHIR, A.; MALIK, K.A. Mutagenesis of *Cellulomonas biazotea* for enhanced production of xylanases. **Bioresource Technology**. v. 62, n. 3, p. 99-108, 2005.

RAPER, K. B. ; THOM, C. **A manual of the Penicillia**. Baltimore, Williams and Wilkins, 1949.

RITCHIE, S. W. ; HANWAY, J. J. ; BENSON, G. O. 2003. Como a planta de milho se desenvolve. Arquivo do Agrônomo n. 15. Encarte de informações agrônômicas n.103, setembro,2003.<[http://brasil.ipni.net/ipniweb/region/brasil.nsf/0/DE02520B8765B8D683257AA0003C46A6/\\$FILE/Encarte103.pdf](http://brasil.ipni.net/ipniweb/region/brasil.nsf/0/DE02520B8765B8D683257AA0003C46A6/$FILE/Encarte103.pdf)>

ROCHA, M. S. R. dos S. ; ALMEIDA, R. M. R. G. ; CRUZ, A. J. G. Avaliação do potencial energético de resíduos agroindustriais provenientes de diferentes regiões brasileiras. **ENGEVISTA**, V. 19, n.1, p. 217-235, Janeiro 2017.

ROVEDA, M. ; HEMKEMEIER, M. ; COLLA, L.; M. Evaluation of lipase production using different strains of microorganisms isolated from dairy effluent through submerged fermentation.

Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 30, n. 1, p. 126-131. 2010.

RUEGGER, M.J.S. & TAUKE-TORNISIELO, S.M. 2004. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** 27:205-211

SAITO, I. M. **Produção de hidrolisados e fibras a partir de resíduo da industrialização da mandioca submetido à pré-tratamento hidrotérmico**. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista - UNESP, 2005.

SALAZAR, R. F. S., SILVA, G. L. P., SILVA, M. L. C. P. Estudo da composição da palha de milho para posterior utilização como suporte na preparação de compósitos. Resumos do **VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, 2005, Campinas – SP.

SALES, M. R. Produção de enzimas do complexo celulolítico e da xilanase por *Aspergillus* spp. da coleção de culturas – Micoteca URM, UFPE, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, Recife, 2010.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*, a review of biology and systematics of the genus. **Mycol Res**, v.100, p. 923-35, 1996.

SANDERS, J. P. M. ; et al.. Process intensification in the future production of base chemicals from biomass. **Chemical Engineering and Processing**, v. 51, p. 117-136, 2012.

SANDGREN, M., SAHLBERG, J., MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Prog.Bioph. Mol. Biol.**, 89: 246-291. *Sci. Technol.*, 1: 45-70, 2005.

SANTOS, E. **Utilização de enzimas produzidas por *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* na extração de óleos essenciais**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2008.

SANTOS, F. A. ; et al. Utilização de resíduos provenientes do milho na produção de celulases pelo fungo FSDE16 em cultivo semissólido. **XI Congresso Brasileiro de**

Engenharia Química em Iniciação Científica-COBEQ. Unicamp-Campinas-SP 19 a 22 de julho de 2015.

SANTOS, F. A ; *et al.* POTENCIAL DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ETANOL. **Quim. Nova**, Viçosa – MG, V. 35, No. 5, 1004-1010, 2012.

SANTOS, F. R. S. **Produção e caracterização de celulasas e hemicelulasas por linhagens fúngicas mesófilas isoladas do Cerrado Sul-Mato-Grossens.** Dissertação (Mestrado) Universidade Federal da Grande Dourados – Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas: Dourados-MTS, 2014.

SANTOS, M. S. R. 2014. **Estudo de pré - tratamentos de palha e sabugo de milho visando a produção de etanol 2G.** 75p. Dissertação (Mestrado) UFAL, Maceió - AL. 2014.

<<http://www.repositorio.ufal.br/bitstream/riufal/1204/1/Estudo%20de%20pr%C3%A9%20tratamentos%20de%20palha%20e%20sabugo%20de%20milho%20visando%20a%20produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20etanol%202G.pdf>>

SANTOS, R. S. **Produção de hidrolases holocelulolíticas por fermentação em estado sólido com uso de fungos filamentosos e coprodutos da agroindústria de óleos vegetais como fontes de carbono.** Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri e Universidade Federal de Uberlândia: Diamantina, 2015. Tese (Doutorado), Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Biocombustíveis.

SANTOS, T. C.; et al.. *Aspergillus niger* como produtor de enzimas celulolíticas a partir farelo de cacau (*Theobroma cacao*). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 80, n.1, p.65-71, jan./mar. 2013.

SCHUSTER, E. et al.. On the safety os *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 4, p. 426-435, 2002.

SILVA, J. V. F. **Produção e avaliação da estabilidade de enzimas fúngicas.** Trabalho de Conclusão de Curso. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - Universidade Estadual Paulista - UNESP, 2013.

SILVA, L. R. C. Espécies de *Penicillium* em solos de caatinga e Mata Atlântica, produção de tanase e detecção do potencial micotoxigênico. Tese (Doutorado) Centro de Ciências Biológicas. Pós-Graduação em Biologia de Fungos, 2013.

SILVA, MÁRCIA JOSEFA DA **Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por *Trichoderma reesei* RUT C-30 em meios com diferentes capacidades de indução /** Márcia Josefa da Silva. – Recife: O Autor, 2014.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 76–82, 2016.

SINGH, R. ; et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech** 6:174, 2016. DOI 10.1007/s13205-016-0485-8.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R.K.; PATEL, A.K.; LARROCHEB, 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.

SIQUEIRA, F. G. de; et al.. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.64, p.20-26, 2010.

SOARES, I. A. ; FLORES, A. C. ; ZANETTIN, L. ; PIN, H. K. ; MENDONÇA, M. M. ; BARCELOS, R. P. ; TREVISOL, L. R. ; CARVALHO, R. D. ; SCHAUREN, D. ; ROCHA, C. L. M. C.da., 2010. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 30(3), 700705.

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.

SONI, R.; NAZIR, A.; CHADHA, B. S. Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus fresenius* strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of solka floc and bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 2, p. 277-283, 2010.

STROPARO, E. C. ; *et al.* Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciências Agrárias**. 33(6), 2267-2278, 2012.

SZENGYEL, Z. **Ethanol from wood: Cellulase enzyme production**. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química, Lund University, Suécia, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3.ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2004. 719p.

TEN, L.N.; IM, W.T.; KIM, M.K.; KANG, M.S.; LEE, S.T. Development of a plate technique for screening polysaccharide-degrading microorganisms by using of insoluble chromogenic substrates. **Journal of Microbiological Methods**. v.56, p.375-382, 2004.

TOMME, P. et al. Cellulose-binding domains: classification and properties. **ACS Symposium Series**. v.618. p.143-163, 1995.

TORRE, P. ; *et al.* Release of ferulic acid from corn cobs by alkaline hydrolysis. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 40, p. 500-506, 2008. < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X08000466> >

TORRELO, G.; HANEFELD, U.; HOLLMANN, F.. [2015]. **Catalysis Letters**, v. 145, n.1, p. 309-345.

TROIAN, R. F. **Análise do secretoma da interação existente entre *Trichoderma harzianum* e os estágios de desenvolvimento do fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum***. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília – UNB. 2014

TSAI, W. T. ; *et al.* Preparation of activated carbons from corn cob catalyzed by potassium salts and subsequent gasification. **Bioresource Technology**, v. 78, p. 203-208, 2000. < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852400001115>>

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP. Bioquímica animal/enzimas. Disponível em: < http://www2.dracena.unesp.br/graduacao/arquivos/bioquimica_animal/enzimas.pdf >. Acesso em: 15de março de 2017.

VAN DEN BRINK, J. ; VRIES, R. P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 1477–1492, 2011.

VILELA, E. D. S. **Análise da produção de celulase e beta glicosidase produzidas por *Streptomyces sp.*** Dissertação (Mestrado) da Universidade Federal de Goiás - Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia, 2013.

VILLENEUVE, P.. **Biotechnology Advances**. 25 [6] [2007], Pages 515-536.

WICKLOW, D.T.; CARROLL, G.C. (Eds.) 1981. The Fungal Community. Its Organization and Role in the Ecosystem. Marcel Dekker, Inc., New York.

WILSON, D. B. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1125, n. 1, p. 289-297, 2008.

WITHERS, S. G. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolyses. **Carbohydr. Polym.** v. 44, p. 325–337, 2001.

WOOD, T.M.; GARCIA-CAMPAYO, V. Enzymes and mechanisms involved in microbial cellulolysis In: Ratledge, C. (Ed.). **Biochemistry of Microbial Degradation**. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. p.590, 1994

YOON, L.W., ANG, T.N., NGOH, G.C., CHUA, A.S.M. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass and bioenergy**, v. 67, p. 319-338, 2014.

YU, Z. ; ZHANG, H. Pretreatments of cellulose pyrolysate for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia sp.* YZ-1 and *Zymomonas mobilis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 24, p. 257-262, 2003.

ZANCHETTA, A. Celulases e suas aplicações. UNESP-SP, 2013. Disponível em: < <http://www.rc.unesp.br/ib/ceis/mundoleveduras/2013/Celulases.pdf> >. Acesso em: 15 de março de 2017.

ZANDONÁ FILHO, A. **Modificação das qualidades processuais de fibras celulósicas através do uso de enzimas**. UFP: Paraná, 2001. Tese (Doutorado), Processo Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2001.

ZHANG, Y.H.P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n.5, p. 452-481, 2006.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology Bioengineering**, v. 88, p.797-824, 2004.

CAPÍTULO II

BIOPROSPECÇÃO DE LINHAGENS DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE SEDIMENTOS DE MANGUE PARA PRODUÇÃO DE CELULASE USANDO COMO SUBSTRATOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

**Manuscrito a ser submetido para publicação na Revista International Journal of
Microbiology**

Bioprospecção de linhagens de fungos filamentosos isolados de sedimentos de mangue para produção de celulase usando como substratos de resíduos agroindustriais

Maria C. Cássia Mororó^{1,3}, Thayse A. de Lima e Silva^{2,3}, Rosileide F.S. Andrade^{2,3} e Galba Maria de Campos-Takaki³

¹Programa de Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-900, Recife, Brasil. E.mail: cassia_mororo@hotmail.com

² Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD-CAPES), Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, 50.500-900 Recife, PE, Brasil. E.mail: ithalv@yahoo.com.br; rosileide_fontenele@yahoo.com.br

³ Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-590, Recife _PE, Brasil. E.mail: galba_takaki@yahoo.com.br

A correspondência deve ser dirigida a Galba Maria de Campos-Takaki; O email: galba_takaki@yahoo.com.br; Telefone / FAX: +55 81 21194017 / +5581 21194043

Abstract

As cepas de *Trichoderma* spp, *Penicillium* sp. e *Aspergillus* spp isoladas de sedimentos de mangue foram estudadas para produção de endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase utilizando resíduos agroindustriais (casca de laranja, casca de abacaxi, coroa de abacaxi, farelo de trigo e milho) como substratos. Os resíduos lignocelulósicos são derivados de diferentes atividades agroindustriais que representam uma fonte maciça de matéria-prima. Para este fim, vinte e cinco estirpes foram utilizadas para a produção de complexos celulolíticos, dentre as quais sete mostraram atividade celulolítica. A estirpe de *Penicillium* sp. UCP 0279 mostrou os melhores resultados em todas as análises, sendo para a CMCase 20,2 UI / mL em 72 horas usando resíduos de farelo de trigo, para a FPase 45,5 U / mL em 48 horas usando resíduos de casca de abacaxi e para β -Glicosidase 18,2 U / mL em 24 horas usando a coroa de resíduos de abacaxi. A estirpe *Penicillium* sp. UCP 0279 se mostrou promissora e representa uma importante fonte de processos industriais.

Palavras-chave: Enzimas celulolíticas; Fungos marinhos; Substratos agroindustriais.

1. Introdução

O mercado mundial de enzimas celulolíticas está crescendo a cada ano, principalmente devido ao bom desempenho desta proteína em diferentes campos de aplicação, que vão desde as indústrias química, combustível, farmacêutica e cosmética até a indústria alimentar [1]. Somente em 2014, as enzimas microbianas que atuam como catalisadores biológicos movimentaram cerca de mais de US \$ 4,2 bilhões no mercado e possuem como perspectiva para o período 2015-2020, um aumento de 7% sob uma taxa de crescimento anual composta que no último ano prevê montantes de cerca de 6,2 bilhões de dólares [2].

As enzimas microbianas são uma alternativa usada para substituir poluentes químicos perigosos devido à natureza biodegradável e não tóxica [3,4,5]. Em relação aos catalisadores de outras origens, os catalisadores microbianos apresentam inúmeras vantagens, entre as quais: sua alta estabilidade; alta eficiência catalítica; alta especificidade para o substrato; redução na formação de subprodutos e conseqüentemente menos impactos no meio ambiente; redução dos custos energéticos dos processos; e biodegradabilidade [6]. Para as indústrias, o grande potencial de aplicação de enzimas de origem microbiana deve-se à possibilidade de produção em grande escala através de processos de fermentação, bem como a facilidade na expressão de genes em organismos já estabelecidos e a produção espontânea, porque não estão sujeitos à produção ou limitações de fornecimento, o que também contribui para a proeminência deste mercado [7].

As enzimas que mais movimentam o mercado econômico são celulasas devido à sua ampla aplicabilidade, por exemplo, na indústria de alimentos, onde são utilizados principalmente nos processos de extração e clareamento de sucos cítricos citrinos, extração de componentes de chá verde, óleos essenciais, proteína de soja, aromas e amido doce de batata [8]. Essas enzimas também estão presentes em outras indústrias nos processos de fabricação de detergentes, produção de drogas e principalmente biocombustíveis [9,10].

O complexo celulolítico consiste em três enzimas: as endoglucanasas ou carboximetilcelulases (CMCases) - EC 3.2.1.4 (EG, endo-1,4-p-D-glucano 4-glucano-hidrolase); exoglucanasas ou celobiohidrolases (CBH, 1.4- β -D-glucan cellobiodehydrolase, EC 3.2.1.91); e as β -glicosidases (EC 3.2.1.21) [11,12], para as quais os fungos filamentosos são os principais produtores de enzimas do complexo celulolítico, caracterizando assim o potencial biotecnológico da microbiota [9]. As espécies da classe Ascomycetes são conhecidas por suas habilidades para degradar materiais lignocelulolíticos e a alta produção de enzimas celulolíticas. Além disso, eles são considerados muito interessantes devido à sua capacidade de adaptação, pois podem agir em condições desfavoráveis [13]. Os gêneros de representantes que possuem a capacidade de produzir essas enzimas são *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola* e *Penicillium* [12,14].

Assim, o incentivo para realizar pesquisas nesta área torna-se essencial para poder identificar sistemas microbianos como ferramentas para processos industriais com maior eficiência [15]. Em segundo lugar, ser capaz de selecionar estirpes de fungos altamente capazes de expressar e apresentar atividade celulolítica é essencial para a hidrólise da biomassa da planta, a fim de obter complexos enzimáticos com custos reduzidos, de forma eficiente e efetiva.

A importância e as aplicações das celulasas, este estudo teve como objetivo examinar os fungos indígenas isolados dos sedimentos de mangue para a capacidade das enzimas celulares como endoglucanase, exoglucanase e β -Glicosidase. Além disso, este estudo tem como objetivo proporcionar uma melhor compreensão das condições de uso de resíduos agroindustriais, como substratos alternativos para a produção de celulasas de baixo custo.

2. Material e Métodos

2.1 Micro-organismos e condições de cultivo

Vinte e cinco cepas de fungos filamentosos isolados do sedimento de mangue localizado em Rio Formoso - PE, foram fornecidos pela Cultures Collection UCP (Universidade Católica de Pernambuco), registrada na WFCC (World Federation for Culture Collection) (Tabela 1). As cepas foram mantidas em meio Sabouraud a 5 ° C (extrato de malte 20,0 g.L⁻¹, glicose 20,0 g.L⁻¹, peptona 1,0 g.L⁻¹ e agar 20,0 g.L⁻¹) em estufa a 28 ° C durante 7 dias.

2.2 Resíduos agroindustriais

Foram utilizados cinco resíduos agroindustriais diferentes como meio alternativo, de modo a produzir o complexo celulolítico por fermentação submersa, a saber: casca de laranja; casca de abacaxi; coroa de abacaxi; farelo de trigo e farelo de milho. Todos os resíduos foram obtidos a partir de fontes comerciais do Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco – CEASA/PE, e previamente tratados, foram lavados com água destilada e submetidos à secagem por calor seco a 70 ° C durante um período de 72 horas em estufa de secagem com circulação e renovação de ar. Posteriormente, os resíduos foram triturados e peneirados até uma granulometria de 0,250 mm de modo a obter um pó homogêneo que facilitou a dissolução no meio de cultura.

2.3 Triagem da atividade celular de fungos filamentosos

As estirpes foram cultivadas em meio sintético com carboximetilcelulose (CMC) de baixa viscosidade como única fonte de carbono (3,0 g.L⁻¹ NaNO₃, 1,0 g.L⁻¹, K₂HPO₄, 0,5 g.L⁻¹ de MgSO₄, 0,5 g.L⁻¹ de KCL, 0,01 g.L⁻¹ de FeSO 4. 7H 2 O, 20,0 g.L⁻¹ de agar e 5,0 g.L⁻¹ de CMC), com crescimento de 96 horas e o inóculo foi obtido a partir

de discos de cultura removidos dos repiques iniciais com crescimento de 96 horas e incubados em estufa a 28 ° C durante 96 horas. Após este tempo, as placas de Petri foram submetidas a choque térmico durante 16 horas a 50 ° C. Em seguida, foi adicionado 10 mL de solução do corante vermelho comgo (2,5 g.L⁻¹) em tampão Tris HCl (0,1 M e pH 8,0). Após 30 minutos, a solução foi descartada e foram adicionados 5 mL de solução de NaCl 0,5M (no mesmo tampão) para lavar o inóculo [8]. O diâmetro das colônias e halos produzidos por microorganismos foi medido com a ajuda de um paquímetro [16]. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os dados calculados para determinar o índice enzimático foram submetidos à Equação (1). Os fungos que apresentaram o maior índice de atividade enzimática foram selecionados para a etapaseguinte da fermentação submersa usando diferentes resíduos agroindustriais.

$$\text{Í.e.} = \frac{\varnothing h}{\varnothing c} \quad \text{Equação 1.}$$

Onde:

Í.e = índice enzimático

$\varnothing h$ = diâmetro da hidrólise de halo

$\varnothing c$ = diâmetro de halo da colônia

2.4 Fermentações submersas

Fermentações submersas foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL de capacidade contendo 100 g.L⁻¹ de meio basal, composto por: água destilada; solução de (KH₂PO₄ (2 g.L⁻¹), MgSO₄ (1 g.L⁻¹), FeSO₄.7H₂O (0,63 mg), MnSO₄ (0,01

mg) e $ZnSO_4$ (0,62 mg)); e 5 g dos resíduos avaliados individualmente. Todos os frascos foram ajustados para pH 6 e esterilizados a 121 ° C durante 15 minutos. Posteriormente, cada frasco foi inoculado assepticamente, cada um com 4 discos de cultura e incubados a 30 ° C em agitador orbital a 120 rpm durante 96 horas. As alíquotas foram retiradas todas as 24 horas, incluindo o tempo 0h. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.5 Atividade enzimática

O extrato enzimático foi obtido através de centrifugação a 1400 g durante 5 minutos, a partir de amostras coletadas durante a fermentação submersa. Os ensaios para determinar a atividade de endoglucanases e exoglucanases foram realizados de acordo com o método descrito por GHOSE [17], através da liberação de açúcares redutores após reação do Ácido Dinitrosalicílico (DNS) e um determinado substrato.

2.6 Atividade com CMCase - endoglucanasas

A atividade de CMCase foi realizada por mistura reacional de 0,5 mL do substrato de carboximetilcelulose (CMC a 2% p / v pré diluído na solução de citrato de sódio com pH 4,8 a 50 mM) e 0,5 mL do extrato de enzima. No controle, foram adicionados 0,5 mL da mesma solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático. O controle para o reagente consistiu em 0,5 mL de CMC (2% p / v) e 0,5 mL de solução tampão. Todos os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 50 ° C durante 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 0,5 ml de DNS e os tubos de ensaio foram submersos em água fervente por 5 minutos. No final deste procedimento adicionaram-se 6,5 ml de água destilada e a absorbância leu a 540 nm.

2.7 *Atividade FPase - Celulases totais*

Para determinar a atividade de FPase, a mistura de reação continha uma tira do papel de filtro Whatman # 1 como substrato (medindo 1,0 cm x 6,0 cm e pesando 50 mg), 1,0 ml de solução tampão citrato de sódio PH 4,8 a 50 mM e 0,5 mL de extrato enzimático. O controle teve 1 mL da mesma solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático. Foram adicionados 1,5 mL de solução tampão e uma tira de papel de filtro ao branco. Todos os tubos de ensaio foram incubados em estufa bacteriológica a 50 ° C durante 60 minutos. A reação foi interrompida por 3 ml de DNS adicionado e os tubos foram submersos em água fervente por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 20 ml de água destilada e a absorbância foi medida a 540 nm.

2.8 *Atividade da β -glicosidase*

A atividade da β -glicosidase foi detectada usando uma solução de celobiose 15 mM como substrato e para determinar a concentração de glicose liberada, um kit de análise de glicose (GODPOD Reagent, BioSystems®), com base na reação das enzimas glicose oxidase e peroxidase. A mistura reaccional nos tubos de ensaio continha 0,5 mL da solução de celobiosa 15 mM e 0,5 mL da amostra; Controle 0,5 mL de tampão de citrato de sódio 50 mM (pH 4,8) e 0,5 mL da amostra; e 1.0 mL do reagente GOD-POD usado para limpar o espectrofotômetro. Os tubos de ensaio foram incubados num banho termostático a 50 ° C durante 30 minutos e depois transferidos para um banho de 100 ° C durante 5 min. A reação foi parada e os tubos foram arrefecidos num banho de gelo até a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 0,01 mL da amostra ao tubo contendo 1,0 mL do reagente; O controle tinha 0,01 do padrão e 1,0 mL do reagente, e o branco tinha apenas 1,0 mL do reagente. Eles foram misturados vigorosamente e incubados a 37 ° C num banho termostático durante 15 minutos, então as leituras foram realizadas no espectrofotômetro a 505 nm. A glicose foi utilizada como padrão para determinar todas as atividades enzimáticas e sua curva

foi feita em concentrações de 0,5 a 2,5 g.L⁻¹ pelo método do ácido 3.5-dinitrosalicílico (DNS). Os valores obtidos foram convertidos em concentração de glicose $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ por meio da interpolação na curva padrão. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de libertar 1 μmol de açúcares redutores por minuto a 50 ° C, para o qual a atividade enzimática foi expressa em IU por mL de substrato (IU.mL^{-1}). A absorbância foi medida no espectrofotômetro a 540 nm.

3 Resultados e discussão

O objetivo do *screening* foi selecionar um potencial produtor de enzimas celulolíticas entre os isolados. Após o cultivo das 25 linhas de fungos filamentosos em meio sintético de CMC de baixa viscosidade e aplicação do método de coloração congo vermelho, determinou-se a atividade enzimática e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 1. Entre as 25 estirpes estudadas, um total de 28% apresentou a formação da enzima halo. A atividade da celulase foi detectada para 3 cepas do gênero *Trichoderma*, 3 cepas do gênero *Aspergillus* e 1 cepa do gênero *Penicillium*.

Os fungos que apresentaram o maior valor do índice enzimático pertencem às cepas do gênero *Penicillium* sp. UCP 0279 com Í. e. = 2,2, seguido pela estirpe UCP 1413 de *Aspergillus flavus* com Í. e. = 1.7. Inicialmente, foi possível verificar se a temperatura de 50 ° C, ao qual as culturas incubadas foram submetidas, proporcionou a aceleração da hidrólise da celulose, garantindo assim que apenas as celulases termostáticas foram selecionadas. Além disso, verificou-se que o diâmetro das colônias não foi alterado após choque térmico, indicando também que a temperatura inibiu o crescimento e / ou a morte de fungos [8, 18].

Malik et al. [19] descobriram que ocorre uma circunferência de cor clara em torno das colônias, correspondente ao halo de degradação CMC, gerado pelo aumento da atividade celulolítica combinado com a inibição do crescimento micelial e, assim, indicando a presença da enzima celulase. Isso foi verificado no presente estudo. Esse

fenômeno ocorre devido ao tratamento térmico aplicado ao inóculo, o que provoca a autólise das hifas basais das colônias que liberam celulasas no meio [18].

Tabela 1. A atividade da celulase das 25 cepas de fungos filamentosos estudados.

UCP	Fungo filamentoso	Øc*	Øh*	Í.e.*
00149	<i>Trichoderma sp.</i>	5,0	-	
00168	<i>Trichoderma sp.</i>	4,4	-	
00217	<i>Trichoderma sp.</i>	4,5	-	
00220	<i>Trichoderma sp.</i>	1,2	2,1	1,5
00230	<i>Trichoderma sp.</i>	4,0	-	
00236	<i>Trichoderma sp.</i>	1,2	-	
00258	<i>Trichoderma sp.</i>	6,6	-	
00279	<i>Penicillium sp.</i>	1,1	2,3	2,2
00288	<i>Trichoderma sp.</i>	0,5	0,6	1,1
00314	<i>Trichoderma sp.</i>	3,4	-	
00319	<i>Trichoderma sp.</i>	5,6	-	
00367	<i>Trichoderma sp.</i>	4,3	-	
00376	<i>Trichoderma sp.</i>	4,9	-	
00432	<i>Trichoderma sp.</i>	6,9	-	
00434	<i>Trichoderma sp.</i>	8,0	-	
00468	<i>Trichoderma sp.</i>	0,7	1,0	1,4
00476	<i>Trichoderma sp.</i>	8,0	-	
00529	<i>Trichoderma sp.</i>	5,8	-	
01268	<i>Aspergillus sp.</i>	1,2	1,5	1,3
01269	<i>Aspergillus sp.</i>	3,0	-	
01355	<i>Aspergillus niger</i>	2,3	-	
01357	<i>Aspergillus niger</i>	2,3	3,0	1,3
01358	<i>Aspergillus niger</i>	1,0	-	
01377	<i>Aspergillus parasiticus</i>	0,2	-	
01413	<i>Aspergillus flavus</i>	1,0	1,7	1,7

* Descrição dos símbolos: Øc = Diâmetro da colônia (mm); Øh = Diâmetro do halo (mm); Íe = índice enzimático; (-) = Não produz halo.

Para a etapa seguinte, da fermentação submersa, as estirpes *Penicillium sp.* UCP 0279 e *Aspergillus flavus* UCP 1413 obtiveram o maior índice enzimático e foram selecionados, sendo possível verificar o crescimento e a produção das enzimas celulolíticas em todos os resíduos utilizados.

A atividade CMCase realizada com a estirpe *Penicillium* sp. UCP 0279, o resíduo que melhor forneceu a produção enzimática foi farelo de trigo com 20,2 UI.mL⁻¹ de atividade no tempo de 72 horas e a coroa do abacaxi foi o segundo substrato influenciou a produção enzimática de 18,3 UI.mL⁻¹ após 24 horas. A mesma atividade enzimática foi observada na amostra de *Aspergillus flavus* UCP 1413 utilizada em nosso estudo, que apresentou casca de farelo de milho e abacaxi como substratos com maior estresse de produção, que obteve 14,9 UI.mL⁻¹ e 14,5 UI.mL⁻¹, respectivamente, ambos dentro de 24 horas (Figura 1).

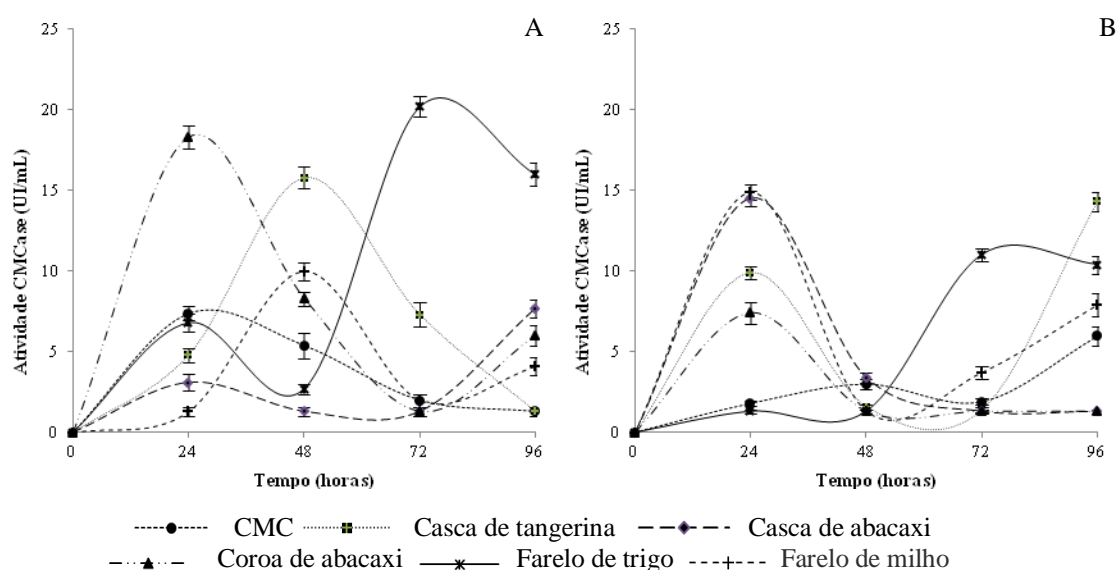


Figura 1. Atividade com CMCase usando CMC, casca de tangerina, casca de abacaxi, coroa de abacaxi, farelo de trigo e farelo de milho como substratos: (A) *Penicillium* sp. UCP 0279; (B) *Aspergillus flavus* UCP 1413.

Prasanna et al. [20], realizaram estudos para detectar as enzimas Fpase, CMCase e β -glucosidase por *Penicillium* sp. usando Czapek-Dox como meio, suplementado com 0,5% (p / v) de celulose (Celulose a 0,5%, lactose a 0,5%, serradura a 0,5%, extracto de levedura a 0,2% como fonte de nitrogênio), pH 5,0 a 30° C. Esses autores verificaram que os rendimentos de Fpase, CMCase e β -glucosidase foram 8,7, 25 e 9,52 U / ml, respectivamente, com incremento de 9,2, 5,9 e 43,8 vezes sobre os títulos da respectiva enzima em meio não otimizado.

Cunha et al., [21] também usaram *Penicillium* spp e resíduo de soja com diferentes tratamentos como substrato e seus estudos foram para as atividades de CMCase e β -amilase, como resultado registradas valores menores para estas enzimas em relação aos resultados de Prasanna et al.[20].

A atividade FPase com *Penicillium* sp. UCP 0279, o resíduo de casca de abacaxi obteve 45,5 UI.mL⁻¹ e a casca de tangerina 42,8 UI.mL⁻¹, ambas em 48 horas. Para *A. flavus* UCP 1413, a coroa de abacaxi tinha 25,0 UI.mL⁻¹ em 24 horas e a casca de abacaxi 14,4 UI.mL⁻¹, também em 24 horas, como visto na Figura 2. Morais et al.22, em estudos com *Colletotrichum gloeosporioides* URM 7124, descobriram que a atividade mais alta para FPase foi de 23,13 UI.mL⁻¹ enquanto Liming e Xueliang [23] obtiveram o valor máximo de 5,20 UI.mL⁻¹ usando a espécie *Trichoderma reesei*. Nos estudos realizados por Rosa et al. [24] usando o microorganismo *Aspergillus* sp e diferentes resíduos como substrato, verificou-se que a atividade máxima de FPase foi de 5,01 UI.mL⁻¹. Segundo esses autores, esse resultado mostra que a alta atividade das celulases totais está associada ao potencial biotecnológico e industrial da cepa estudada.

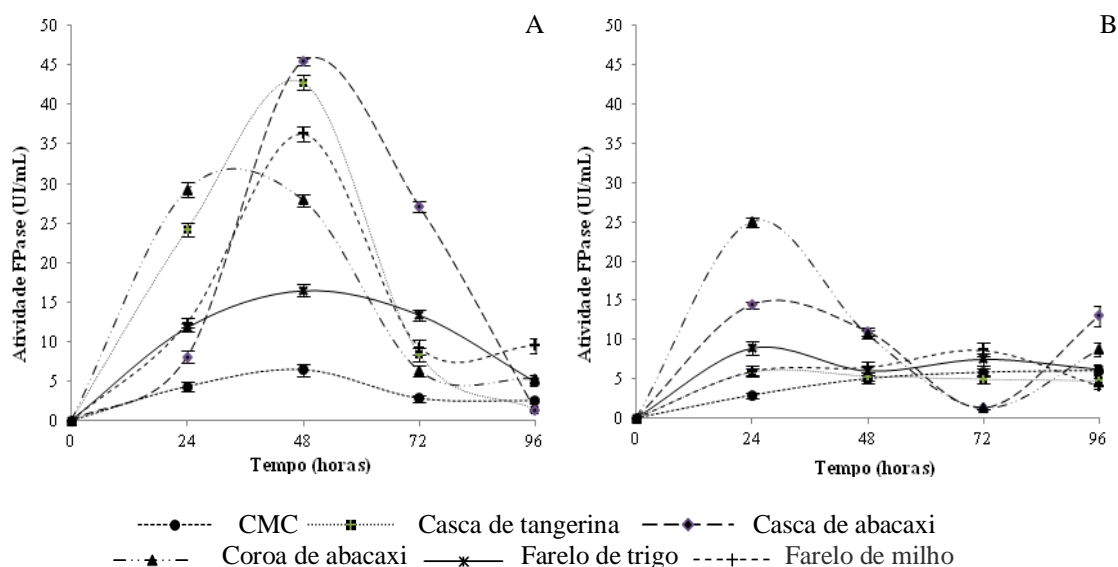


Figura 2. Atividade Fpase usando CMC, casca de tangerina, casca de abacaxi, coroa de abacaxi, farelo de trigo e farelo de milho como substratos: (A) *Penicillium* sp. UCP 0279; (B) *Aspergillus flavus* UCP 1413

Os resultados obtidos relacionaram-se com a concentração, tipo de substrato e tamanho de grão, já que para Salihu et al. [25], e Kumar, et al. [26], a redução do tamanho de partícula, um aumento na área de superfície do substrato, bem como a diminuição da cristalinidade da celulose presente nos resíduos, permitem que os fungos acessem as fontes de carbono disponíveis. Outro fator importante é o potencial biotecnológico da cepa fúngica, uma vez que o pH, temperatura e tipo de fermentação utilizados estão entre os valores e parâmetros utilizados em diferentes estudos.

Penicillium sp. UCP 0279 produziu 18,2 UI.mL⁻¹ da atividade da β -glicosidase em 24 horas utilizando como substrato o resíduo da coroa de abacaxi. No entanto, essa enzima usou um segundo substrato, a casca de abacaxi e teve atividade de 9,1 UI.mL⁻¹ em 48 horas. Para *A. flavus* UCP 1413, o farelo de trigo e o resíduo de farelo de milho obtiveram 16,9 UI.mL⁻¹ e 14,5 UI.mL⁻¹, respectivamente, em 96 horas.

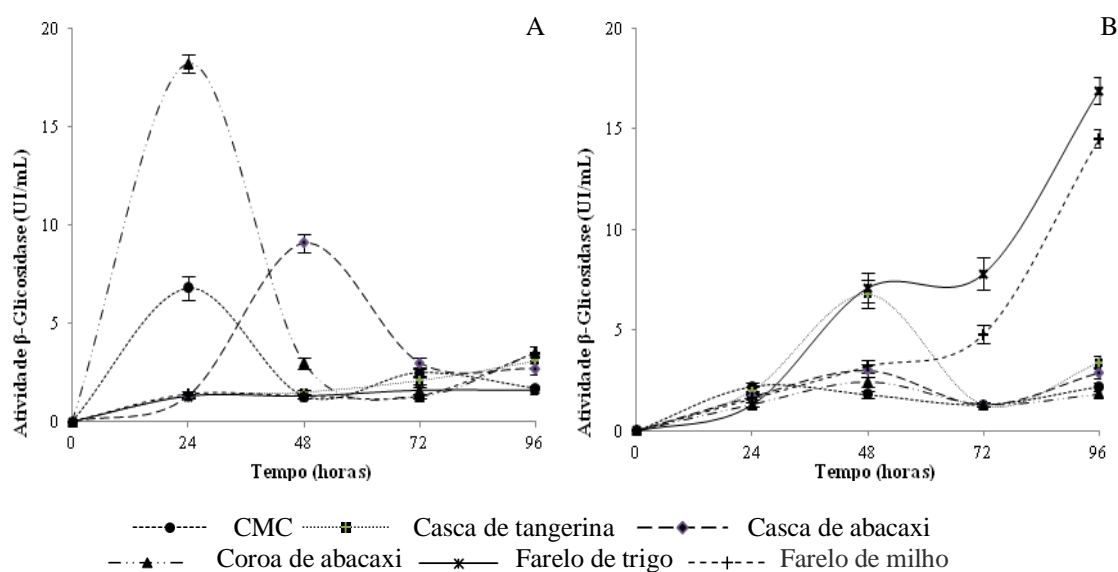


Figura 3. Atividade de β -Glicosidase utilizando CMC, casca de tangerina, casca de abacaxi, coroa de abacaxi, farelo de trigo e farelo de milho como substratos: (A) *Penicillium* sp. UCP 00279; (B) *Aspergillus flavus* UCP 01413.

Nos estudos realizados por Salihu et al. [25] utilizando *Aspergillus niger* e resíduos agroindustriais sem tratamento prévio, obtiveram-se os seguintes resultados para a atividade da β -glicosidase: 0,14 UI.mL⁻¹ para casca de milho; 0,21 UI.mL⁻¹ para casca de sorgo; 0,67 UI.mL⁻¹ para cascas de banana; 0,79 UI.mL⁻¹ para haste de

milho; 0,59 UI.mL⁻¹ para casca de mandioca; 0,40 UI.mL⁻¹ para efluentes de mandioca; 0,91 UI.mL⁻¹ para palha de arroz; 0,81 UI.mL⁻¹ para resíduo de soja; 0,84 UI.mL⁻¹ para bagaço de cana-de-açúcar; e 0,84 UI.mL⁻¹ para casca de amendoim. Entre os valores alcançados por esses autores, o resíduo da palha de arroz foi o único que se aproximou dos resultados alcançados em nossa pesquisa, o que possivelmente demonstra o potencial produtivo da cepa em estudo.

4. Conclusão

Todas as cepas isoladas dos sedimentos de mangue usados neste estudo cresceram no meio CMC. No entanto, apenas sete cepas mostraram produção de celulase extracelular. As duas cepas selecionadas para a fermentação submersa das estirpes de *Penicillium* sp. UCP 0279 e *A. flavus* UCP 1413, foram cultivados em todos os meios contendo os resíduos como substrato e apresentaram atividade celulolítica. No entanto, a cepa de *Penicillium* sp UCP 0279 mostrou a maior atividade em todas as enzimas como CMCase (20,2 UIg⁻¹) em 72 horas no resíduo de farelo de trigo, para FPase (45,5 UI.mL⁻¹) em 48 horas na Resíduo de casca de abacaxi e para a β -glicosidase (18,2 IU.mL⁻¹) em 24 horas usando a coroa de resíduos de abacaxi.

Em conclusão, este estudo revelou os melhores resíduos agroindustriais como substratos como a casca de abacaxi, coroa de abacaxi e resíduos de farelo de trigo, que são exemplos de agro-resíduos domésticos e industriais, favoreceu o aumento de grandes quantidades de enzimas celulase quando hidrolisadas pelo celulolítico da micro-organismos selecionados *Penicillium* sp UCP 0279 e *A. flavus* UCP 1413. Finalmente, concluímos que o isolado fúngico *Penicillium* sp UCP 0279 mostrou maior potencial para processos biotecnológicos industriais.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação para o Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de de Nível Superior (CAPES) através da bolsa de estudos para M.C.C.M. Os autores agradecem ao Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Brasil, pelo uso dos laboratórios.

Contribuições de autores: M. C. C. Mororó e G. M. Campos-Takaki conceberam e projetaram os experimentos; M. C. Cássia Mororó realizou os experimentos; M. C. Cássia Mororó, T. A. Lima e Silva, R. F. S. Andrade e Galba M. Campos-Takaki analisaram os dados; Galba M. Campos-Takaki contribuiu com reagentes / materiais; M. C. C. Mororó e Galba M. Campos-Takaki utilizaram ferramentas de análise; M. C. C. Mororó; Galba M. Campos-Takaki, R. F. S. Andrade e T. A. Lima e Silva escreveram o artigo.

Conflito de Interesses: as autoras declaram não haver conflito de interesses

Referências

- [1] M. Mandels, J. Weber J. “The production of cellulases and their applications”. *Adv Chem Ser.* vol.95, pp.391-414, 1969.
- [2] V.Beniwal, A.K. Sharma. “Industrial enzymes: Trends, Scope and Relevance”. Published by Nova Science Publishers, Inc., New York, p. p. (197), 2016.
- [3] J.M. Choi, S.S.Han, H.S.Kim. “Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspect.” *Biotechnol Adv.* vol. 33, pp. 1443–1454, 2015
- [4] A. Illanes, A. Cauerhff, L. Wilson, G.R.Castro. “Recent trends in biocatalysis engineering”. *Bioresour Technol.* vol. 115, pp. 115:48–57, 2012.

[5] R.C.Kuhad, R. Gupta, A.Singh. "Microbial Cellulases and Their Industrial Applications". *Enzyme Res.* vol 2011, pp. 1-10, 2011.

[6] G. Torrelo, U. Hanefeld, F. Hollmann. "Biocatalysis. Catalysis Letters" *Springer Journals.* vol. 45, pp. 45: 309-345, 2015.

[7] Q. Zhang, J. Bao. "Industrial cellulase performance in the simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of corn stover for high-titer ethanol production". *Bioresour. Bioprocess.* vol.4, pp. 17, 2017.

[8] H.P Sharma, P. H. Sugandha. "Enzymatic added extraction and clarification of fruit juices: A review". *Crit Rev Food Sci Nutr.*, vol. 57, n° 6, pp. 1215-1227, 2017.

[9] N. Gurung, S.Ray, S. Bose, R.V. Vivek. "A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond". *Biomed Res Int.* vol.2013, pp.1-18, 2013.

[10] A. Ahmed, F.H.Nasim, K. Bato, A. Bibi. "Microbial β -Glucosidase: Sources, Production and Applications" *J. Appl. Envir. Microbio.* vol. 5, n 1, pp. 31-46, 2017

[11] B. Merchel, P. Pereira, T.M. Alvarez, P.S. Delabona, A.J.P. Dillon, M.F. Squina, J.G.C.Pradella. "Cellulase On-Site Production from Sugar Cane Bagasse Using *Penicillium echinulatum*". *BioEnergy Res.* vol. 6, n° 3, pp.1052–1062, 2013.

[12] L.R. Lynd, P. J. Weimer, W.H. van Zyl, I. S. Pretorius. "Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology". *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, vol. 66, n°4, pp. 506–577, 2002.

[12] A.V. Karpe, D.J. Beale, N.B Godhani, P.D Morrison, I.H. Harding, E.A. Palombo "Untargeted metabolic profiling of winery-derived biomass waste degradation by *Aspergillus niger*." *J Chem Technol Biotechnol* , vol 91, n° 5, pp. 1505–1516, 2016.

[13] S. Ellilä, L. Fonseca, C. Uchima, J. Cota, G.H.Goldman, M. Saloheimo, V. Sacon, M. Siika-aho. "Development of a low-cost cellulase production process using

Trichoderma reesei for Brazilian biorefineries”. *Biotechnol. Biofuels*. vol . 10, pp.1-17, 2017.

[14] A. Kumar, S. Singh. “Directed evolution: Tailoring biocatalysis for industrial application”. *Crit. Rev. Biotechnol.* vol. 33, n^o 4, 365–378, 2013.

[15] E.B.S. Nogueira, M.A.Q. Cavalcanti. “Cellulolytic fungi isolated from processed oats”. *Rev. Microbiol.* vol. 27, n^o1, pp. 7-9, 1996.

[16] T.K. Ghose. “Measurement of cellulase activities. Pure and Applied Chemistry”. vol. 59, n^o 2, pp. 257-268, 1987.

[17] B.S. Montenecourt, D.E.Eveleigh. “Semi-quantitative plate assay for determination of cellulase production by *Trichoderma viride*.” *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 33, n^o 1, pp. 33: 178-183, 1977.

[18] S.K. Malik, H. Mukhtari, A.A. Farooqi, M. Ikram-ul-haq. “Optimization of process parameters for the biosynthesis of cellulases by *Trichoderma viride*.” *Pakistan J. Botany*. vol. 42, n^o6, pp. 4243-4251, 2010.

[19] H.N. Prasanna, G. Ramanjaneyulu, R. Reddy. “Optimization of cellulase production by *Penicillium* sp.” *3 Biotech*. vol. 6, n^o 2, pp. 1- 11, 2016.

[20] J.R.B. Cunha, F.C.P. Santos, V. F.G. Assis, P.L. Leal. “ Cultivation of *Penicillium* spp. in soy bean crop residues for production of cellulase, protease and amylase.” *Rev. Ceres*. vol. 63, n^o5, pp. 597-604, 2016.

[21] M.S. Morais, N.T.Oliveira, P.N.Herculano, K.A.Moreira. “Cellulolytic complex produced by two species of phytopathogenic fungi isolated from cassava”. *Summa phytopathol.* vol. 42, n^o 3, pp. 249-253, 2016.

[22] X. Liming, S. Xueliang. “High-yield production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue”. *Bioresource Technol.* vol. 91, n^o3, pp. 259-262, 2004.

[23] M. Camassola, A.J.P. Dillon. "Effect of Different Pretreatment of Sugar Cane Bagasse on Cellulase and Xylanases Production by the Mutant *Penicillium echinulatum* 9A02S1 Grown in Submerged Culture. *Biomed Res Int.* vol. pp. 2-9, 2014.

[24] A. Salihu, A. B. Sallau, O. Abbas, Z. Alam. "Agricultural residues for cellulolytic enzyme production by *Aspergillus niger*: effects of pretreatment". *3 Biotech.* vol. 5, n°6, pp. 1101-1106. 2015.

[25] P. Kumar, D.M. Barrett, M. J. Delwiche, P. Stroeve. "Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production". *Ind Eng Chem Res.* vol. 48, n°8, pp.3713–3729, 2009.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES GERAIS

- Todas as 25 amostras utilizadas nesse estudo cresceram no meio CMC, todavia, apenas 7 linhagens apresentaram atividade extracelular na produção de celulases;
- As duas linhagens selecionadas para a etapa da fermentação submersa, *Penicillium* sp. UCP 00279 e *A. flavus* UCP 01413, cresceram em todos os meios de cultura contendo os resíduos como substrato e apresentaram atividade celulolítica;
- A amostra de *Penicillium* sp UCP 00279 se destacou com a maior atividade para as enzimas CMCCase, FPase e β -Glicosidase;
- A partir dos resultados obtidos nesse estudo, verifica-se o potencial biotecnológico dos fungos, em especial do *Penincillium* sp UCP 00279, o que sugere a realização de estudos otimizando as condições de produção e caracterização das enzimas, visando obter benefícios para o meio ambiente através da contribuição nos processos biotecnológicos industriais.

ANEXOS

Author Guidelines

Language editing

Hindawi has partnered with Editage to provide an English-language editing service to authors prior to submission. Authors that wish to use this service will receive a 10% discount on all editing services provided by Editage. To find out more information or get a quote, please [click here](#).

Submission

Manuscripts should be submitted by one of the authors of the manuscript through the online Manuscript Tracking System. Regardless of the source of the word-processing tool, only electronic PDF (.pdf) or Word (.doc, .docx, .rtf) files can be submitted through the MTS. There is no page limit. Only online submissions are accepted to facilitate rapid publication and minimize administrative costs. Submissions by anyone other than one of the authors will not be accepted. The submitting author takes responsibility for the paper during submission and peer review. If for some technical reason submission through the MTS is not possible, the author can contact ijmicro@hindawi.com for support.

Terms of Submission

Papers must be submitted on the understanding that they have not been published elsewhere and are not currently under consideration by another journal published by Hindawi or any other publisher. The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors. It is also the authors' responsibility to ensure that the articles emanating from a particular institution are submitted with the approval of the necessary institution. Only an acknowledgment from the editorial office officially establishes the date of receipt. Further correspondence and proofs will be sent to the author(s) before publication unless otherwise indicated. It is a condition of submission of a paper that the authors permit editing of the paper for readability. All inquiries concerning the publication of accepted papers should be addressed to ijmicro@hindawi.com.

Peer Review

All manuscripts are subject to peer review and are expected to meet standards of academic excellence. If approved by the editor, submissions will be considered by peer-reviewers, whose identities will remain anonymous to the authors.

Concurrent Submissions

In order to ensure sufficient diversity within the authorship of the journal, authors will be limited to having two manuscripts under review at any point in time. If an author already has two manuscripts under review in the journal, he or she will need to wait until the review process of at least one of these manuscripts is complete before submitting another manuscript for consideration. This policy does not apply to Editorials or other non-peer reviewed manuscript types.

Article Processing Charges

International Journal of Microbiology is an open access journal. Open access charges allow publishers to make the published material available for free to all interested online visitors. For more details about the article processing charges of International Journal of Microbiology, please visit the Article Processing Charges information page.

Units of Measurement

Units of measurement should be presented simply and concisely using System International (SI) units.

Title and Authorship Information

The following information should be included

Paper title
Full author names
Full institutional mailing addresses
Email addresses
Abstract

The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained and citation-free and should not exceed 200 words.

Introduction

This section should be succinct, with no subheadings.

Materials and Methods

This part should contain sufficient detail so that all procedures can be repeated. It can be divided into subsections if several methods are described.

Results and Discussion

This section may each be divided by subheadings or may be combined.

Conclusions

This should clearly explain the main conclusions of the work highlighting its importance and relevance.

Acknowledgments

All acknowledgments (if any) should be included at the very end of the paper before the references and may include supporting grants, presentations, and so forth.

References

Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references must be numbered consecutively and citations of references in text should be identified using numbers in square brackets (e.g., “as discussed by Smith [9]”; “as discussed elsewhere [9, 10]”). All references should be cited within the text; otherwise, these references will be automatically removed.

Preparation of Figures

Upon submission of an article, authors are supposed to include all figures and tables in the PDF file of the manuscript. Figures and tables should not be submitted in separate files. If the article is accepted, authors will be asked to provide the source files of the figures. Each figure should be supplied in a separate electronic file. All figures should be cited in the paper in a consecutive order. Figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least unless the resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

Preparation of Tables

Tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used.

Proofs

Corrected proofs must be returned to the publisher within 2-3 days of receipt. The publisher will do everything possible to ensure prompt publication. It will therefore be appreciated if the manuscripts and figures conform from the outset to the style of the journal.

Copyright

Open Access authors retain the copyrights of their papers, and all open access articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.

The use of general descriptive names, trade names, trademarks, and so forth in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations.

While the advice and information in this journal are believed to be true and accurate on the date of its going to press, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

Conflicts of Interest

Conflicts of interest (COIs, also known as ‘competing interests’) occur when issues outside research could be reasonably perceived to affect the neutrality or objectivity of the work or its assessment. For more information, see our publication ethics policy. Authors must declare all potential interests – whether or not they actually had an influence – in a ‘Conflicts of Interest’ section, which should explain why the interest may be a conflict. If there are none, the authors should state “The author(s) declare(s) that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.” Submitting authors are responsible for co-authors declaring their interests. Declared conflicts of interest will be considered by the editor and reviewers and included in the published article.

Authors must declare current or recent funding (including for article processing charges) and other payments, goods or services that might influence the work. All funding, whether a conflict or not, must be declared in the ‘Acknowledgments’. The involvement of anyone other than the authors who 1) has an interest in the outcome of the work; 2) is affiliated to an organization with such an interest; or 3) was employed or paid by a funder, in the commissioning, conception, planning, design, conduct, or analysis of the work, the preparation or editing of the manuscript, or the decision to publish must be declared.