

REVISTA BRASILEIRA DE ENERGIAS RENOVÁVEIS

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CELULASES PELO MÉTODO DNS DE FUNGOS ISOLADOS DE SEMENTES EM GERMINAÇÃO¹

Fábio José Inforsato², André Luiz Meleiro Porto³

¹Aceito para Publicação no 4º Trimestre de 2016.

²Mestrando em Microbiologia Aplicada na Universidade Estadual Paulista- UNESP, fabiao_ji@hotmail.com.

³Professor Dr. no Departamento de Físico-Química na Universidade de São Paulo- USP, alporto@iqsc.usp.br.

Resumo: O objetivo do trabalho foi utilizar o caldo enzimático dos fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 e *Rhizopus* sp. CBMAI 1458 isolados de sementes em germinação para degradar a celulose utilizando papel de filtro. Inicialmente os fungos foram cultivados em meio de cultura sólido contendo celulose como indutor de celulases em diferentes valores de pH. A atividade enzimática máxima foi obtida no período de 48 a 72 h após serem cultivados em meio semi-sólido de farelo de trigo (*Aspergillus* sp. CBMAI 1198: 2,20 e 2,18 UI.mL⁻¹, 48-72h, pH 6,0; *Rhizopus* sp. CBMAI 1458, 5,30 UI.mL⁻¹, pH 6,0, 48 h). Para quantificação da atividade enzimática para celulases totais foi utilizado o método DNS. Concluiu-se que os fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 e *Rhizopus* sp. CBMAI 1458 produziram celulases que degradaram a celulose presente no papel e podem ser utilizados na produção dessas enzimas.

Palavras-chave: Celulases, biocombustíveis, fungos.

**ENZYMATIC ACTIVITY OF CELLULASES BY DNS METHOD USING BROTH OF
FUNGI ISOLATED FROM GERMINATING SEEDS**

Abstract: The aim of this study was use the culture broth of *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 and *Rhizopus* sp. CBMAI 1458 isolated from germinating seeds to degrade cellulose using filter paper. Initially, the fungi were grown on solid culture medium containing cellulose as inductor of cellulases at different pH values. The maximum enzyme activity was obtained within 48 to 72 h after being cultured in semi-solid with wheat bran (*Aspergillus* sp. CBMAI 1198: 2.20 and 2.18 UI.mL⁻¹, 48-72 h, pH 6.0; *Rhizopus* sp. CBMAI 1458, 5.30 UI.mL⁻¹, pH 6.0, 48 h). To quantify the activity of total cellulases was used the DNS method. It was concluded that the fungi *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 and *Rhizopus* sp. CBMAI 1458 produced cellulases that degraded the cellulose present in the paper and the fungi can be used in the production of these enzymes.

Keywords: Cellulases, biofuels, fungi.

1. Introdução

A biomassa pode ser utilizada em diversos segmentos industriais, principalmente o energético. A crescente preocupação com a poluição ambiental e também a demanda de petróleo para abastecer o mercado mundial estão gerando alterações nas economias dos países, no meio ambiente e na sociedade (SATER et al., 2011; ZOREL, 2011).

O Brasil tem destaque no cenário mundial na produção de cana-de-açúcar. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) a safra de cana-de-açúcar em 2014/2015 estava prevista para 73.569 kg.ha⁻¹, a produção de açúcar foi estimada em de 670 milhões de toneladas e a de etanol deveria superar os 28 bilhões de litros. A área destinada à produção sucroalcooleira é de aproximadamente 9.130,1 mil hectares (CONAB, 2014; CONAB, 2014).

Toda essa produção, seja para exportação ou consumo interno, gera grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos (biomassa), no caso específico da cana-de-açúcar, a palha e o bagaço. Partes desses resíduos muitas vezes não são aproveitadas e acabam sendo descartados na natureza, gerando desequilíbrios ambientais, tais como, acúmulo de matéria orgânica em ambientes aquáticos levando a eutrofização, aumento da emissão de gases causadores do efeito estufa (CO₂ e CH₄) devido à intensa atividade biológica oriunda da ação bacteriana do solo, desequilíbrio da população microbiológica que constitui o solo, etc (SATER et al., 2011; ZOREL, 2011; MENDES et al., 2014; ESCOBAR, 2008).

O Brasil tem vantagem em relação a outros países, principalmente por ser detentor de uma tecnologia de produção de etanol bem desenvolvida, eficiente e em larga escala via etanol de primeira geração. Entretanto, a produção de etanol de primeira geração não supre os combustíveis fósseis, sendo necessários investimentos em novas tecnologias para aproveitar a biomassa e elevar a produção de etanol nacional. Assim, pode-se utilizar, por exemplo, o próprio bagaço da cana para a produção de etanol de segunda geração (KOHLHEPP, 2010; FLORENTINO et al., 2008). Com a degradação dos resíduos da cana-de-açúcar pode-se elevar até 30% ou mais a produção de etanol sem que haja necessidade de ampliação na área de cultivo. O bagaço da cana-de-açúcar é constituído aproximadamente por 15% de celulose, 38% hemicelulose, 28% lignina e 18% proteínas e cinzas (FLORENTINO et al., 2008; REYES et al., 1998; CANILHA et al., 2010; VASQUEZ et al., 2007; DING et al., 2006).

A degradação de materiais lignocelulósicos até monossacarídeos como a glicose não é um processo simples, para melhorar a eficiência são utilizados alguns processos prévios para a abertura ou rompimento da fibra através de ataques físicos e químicos. Esse pré-tratamento tem como objetivo remover a hemicelulose e a lignina que são de difícil conversão em glicose e aumentar a porosidade do substrato, disponibilizando a celulose para posterior ataque de enzimas. Os pré-tratamentos são diversificados e diferem muito quanto aos rendimentos e os efeitos que causam na biomassa, sendo os mais conhecidos a pirólise, “steam explosion”, “ammonia fiber explosion”, “CO₂ explosion”, ozonólise, hidrólise ácida, hidrólise alcalina, deslignificação oxidativa e processo Organosolv (SUN et al., 2002).

A degradação da celulose é realizada principalmente por um conjunto de enzimas que atuam intra e extracelularmente, esse complexo enzimático é denominado de celulases. A celulose é um homopolissacarídeo com ligações glicosídicas β -(1,4), apresenta alto grau de polimerização com até 10.000 unidades de glicose e é composta por regiões amorfas e cristalinas. A estrutura linear, conferida pelas ligações β -(1,4), permite a formação de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e acarreta na agregação das cadeias celulósicas em “fibrilas elementares”. Estes agregados conferem elevada resistência à tensão, baixa solubilidade na maioria dos solventes, inclusive em água (ARANTES et al., 2009; ABREU et al., 2007; CASTRO, 2015; CASTRO et al., 2010; NELSON et al., 2006).

A degradação de matéria orgânica é realizada por enzimas presentes em diversos microrganismos, principalmente fungos e bactérias, sendo os fungos filamentosos os mais promissores (SUN et al., 2002; ARANTES et al., 2009; CASTRO, 2015). Os basidiomicetos destacam-se na natureza por serem eficientes em degradar compostos lignocelulósicos, sendo

responsáveis pela “podridão da madeira”. (ARANTES et al., 2009; ABREU et al., 2007; CASTRO, 2015; CASTRO et al., 2010; NELSON et al., 2006). A decomposição é extracelular e ocorre através de um complexo enzimático que propicia uma despolimerização dos componentes lignocelulósicos para que esses possam ser transportados pela parede celular e utilizados no metabolismo fúngico. As enzimas extracelulares são introduzidas no material orgânico através das hifas e iniciam o complexo processo de degradação nas células vegetais (ARANTES et al., 2009; ABREU et al., 2007; CASTRO, 2015; CASTRO et al., 2010).

Industrialmente o fungo *Trichoderma reesei* tem destaque no cenário de produção de celulases, porém outros microrganismos mostraram-se eficientes na degradação de celulose, como *Trichoderma koningi* e *Phanerochaete funiculosum*. Algumas bactérias também são capazes de produzir celulases como no caso da *Clostridium thermocellum* e *Clostridium cellulovorans* (PEREIRA et al., 2012; ALMEIDA, 2012; SOMERA, 2008; SANTOS, 2007; SALES et al., 2010; OLIVEIRA et al., 1999; MESCHEDE et al., 2012).

As celulases começaram a ser produzidas em escala industrial por volta da década de 80 para diversas aplicações, tais como, aditivo de ração animal, clarificação de sucos e vinhos, etc. Em meados da década de 90 as celulases já ocupavam aproximadamente 20% do mercado mundial de enzimas comerciais. Uma aplicação mais recente das celulases é a liberação de açúcares a partir de materiais lignocelulósicos para posterior produção de biocombustíveis (etanol). As tecnologias para hidrólise de materiais lignocelulósicos estão sendo amplamente estudadas, com o objetivo de minimizar o custo de produção de etanol, contudo o processo utilizado pelas biorrefinarias ainda é muito elevado e inviável economicamente, o que requer subsídios governamentais para sua produção (FLORENTINO et al., 2008; DING et al., 2006; SUN et al., 2002; CASTRO et al., 2010).

As empresas Iogen Corporation com a Shell/Raizen instalaram uma planta comercial de bioetanol no Canadá e em 2014 implantaram essa tecnologia no Brasil. Segundo a empresa Raizen espera-se aumentar em 50% a produção de álcool nacional e sem aumentar a área de cultivo. O investimento na Usina Costa Pinto, na cidade de Piracicaba-SP, foi de aproximadamente R\$ 230 milhões, com a produção anual de 40 milhões de litros de bioetanol, a unidade foi oficialmente inaugurada em julho de 2015. Essa é a primeira de oito usinas que serão implantadas na próxima década no estado de São Paulo com capacidade de produzir 1 bilhão de litros por ano de etanol. Essa foi concebida com o objetivo de utilizar a celulose proveniente do bagaço e a palha da cana-de-açúcar para a produção de etanol de

segunda geração, as enzimas utilizadas para o processo (celulases) são fornecidas pela empresa dinamarquesa Novozymes (IOGEN, 2015; RAIZEN, 2015; COSTA, 2015)

Assim, o objetivo deste trabalho foi utilizar o caldo enzimático dos fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 e *Rhizopus* sp. CBMAI 1458 cultivados em farelo de trigo para determinar atividade enzimática de celulases pelo método do DNS.

2. Materiais e Métodos

2.1 Reagentes utilizados

Agar (MERCK), celulose ((C₆H₁₀O₅)_n, Sigma-Aldrich), peptona de farinha de soja (Merck), cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl₂.2H₂O, P.A., Synth), cloreto de magnésio hexa-hidratado (MgCl₂.6H₂O, P.A., Synth), cloreto de potássio (KCl, P.A., Synth), cloreto de sódio (NaCl, P.A., Synth), fosfato de sódio dibásico anidro (Na₂HPO₄, P.A., Synth), sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄, P.A., Synth), bicarbonato de sódio (NaHCO₃, P.A., Synth), brometo de potássio (KBr, P.A., Synth), cloreto de estrôncio hexa-hidratado (SrCl₂.6H₂O, P.A., Synth), ácido bórico (H₃BO₃, P.A., Synth), ureia (CH₄N₂O, P.A., Synth), sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄, P.A., Synth), fosfato de potássio monobásico anidro (KH₂PO₄, P.A., Synth), sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO₄.7H₂O, P.A., Synth), sulfato de zinco hepta-hidratado (ZnSO₄.7H₂O, P.A., Synth), sulfato de ferro(II) hepta-hidratado (FeSO₄.7H₂O, P.A., Synth), cloreto de cobalto hexa-hidratado (CoCl₂.6H₂O, Sigma-Aldrich), sulfato de manganês tetra-hidratado (MnSO₄.4H₂O, P.A., Merck), ácido 3,5-dinitrosalicílico (C₇H₄N₂O₇, Sigma-Aldrich), tartarato de sódio e potássio tetra-hidratado (KNaC₄H₄O₆.4H₂O, P.A., Synth), hidróxido de sódio (NaOH, P.A., Synth).

2.2 Fungos utilizados nos ensaios de atividade enzimática

Aspergillus sp. CBMAI 1198 - O fungo quando cultivado em extrato de malte formou colônias de aspecto irregular por toda a superfície da placa de Petri. As hifas eram brancas e ralas na parte inferior e hastes com esporos de coloração negra na parte superior. O reverso da placa apresentou coloração marrom clara. O fungo foi isolado da semente de *Peltophorum dubium* (canafístula).

Rhizopus sp. CBMAI 1458 - O fungo quando cultivado em extrato de malte sólido formou colônias cotonosas de cor branca, circular, com centro ligeiramente mais elevado e os

esporos eram negros. A coloração do reverso da placa era branca e mais escura no centro. Este fungo foi isolado da semente de *Chorisia speciosa* (paineira).

Os fungos foram identificados no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA-UNICAMP) e estão depositados na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI-UNICAMP, <http://www.cpqba.unicamp.br/colecoes/2015-06-10-19-50-09.html>.)

Toda manipulação dos microrganismos foi realizada em cabine de fluxo laminar (Veco) em condições estéreis, tais como, luz ultravioleta, solução de hipoclorito de sódio 1-2% e álcool 70% e na presença de chama de bico de Bunsen. Todos os materiais, meios de cultura e soluções utilizados para o cultivo dos fungos foram previamente esterilizadas em autoclave (Phoenix).

2.3 Avaliação do crescimento de colônias frente o pH do meio de cultura

Primeiramente foi avaliado a influência do pH no crescimento fúngico obtendo-se as colônias puras e induzindo os fungos a degradarem o material fibroso contendo apenas celulose para absorção de fonte de carbono como energia. Assim, os fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 e *Rhizopus* sp. CBMAI 1458 foram inicialmente cultivados em placas de Petri contendo celulose (30,0 g.L⁻¹), Agar (15,0 g.L⁻¹) em água salina de composição: CaCl₂.2H₂O (1,36 g.L⁻¹), MgCl₂.6H₂O (9,68 g.L⁻¹), KCl (0,61 g.L⁻¹), NaCl (30,0 g.L⁻¹), Na₂HPO₄ (0,140 g.L⁻¹), Na₂SO₄ (3,47 g.L⁻¹), NaHCO₃ (0,170 g.L⁻¹), KBr (0,10 g.L⁻¹), SrCl₂.6H₂O (0,04 g.L⁻¹), H₃BO₃ (0,03 g.L⁻¹) em diferentes valores de pH (5, 6, 8 e 9) (pHmetro Qualxtron, Model 8010). O crescimento dos fungos foi avaliado nos diferentes valores de pH utilizados durante 7 dias de crescimento com o objetivo de certificar qual seria o melhor valor de pH para cultivá-los em fermentação semi-sólida (FSS). O crescimento dos fungos foi realizado em estufa (Incubadora B.O.D. 411D, Nova Ética) na temperatura de 30º C.

2.4 Meios de cultura

Posteriormente à seleção do melhor valor de pH para o meio de cultura e indução dos fungos na presença de celulose como única fonte de carbono, os microrganismos foram inoculados em meio de cultura semi-sólido contendo como fonte de material celulósico e carbono o farelo de trigo.

Foram utilizados na preparação do meio de cultura semi-sólido farelo de trigo para uso alimentar (adquirido em comércio local) e outros constituintes como fontes de nutrientes. Em

um frasco tipo Schott de 250 mL foi adicionado farelo de trigo (5,0 g) em 10 mL de uma solução aquosa contendo as seguintes composições: ureia (0,30 g.L⁻¹), peptona (0,75 g.L⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (1,40 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (2 g.L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (0,30 g.L⁻¹), CaCl₂.2H₂O (0,40 g.L⁻¹), ZnSO₄.7H₂O (1,40 mg.L⁻¹), FeSO₄.7H₂O (5,0 mg.L⁻¹), CoCl₂.6H₂O (2,0 mg.L⁻¹) e MnSO₄.4H₂O (1,60 mg.L⁻¹). O pH do meio foi ajustado para 6 com auxílio de um pHmetro previamente calibrado utilizando solução de HCl 0,5 M. Posteriormente o meio foi esterilizado em autoclave à temperatura de 120 °C durante 20 min e 1atm.

2.5 Cultivo dos fungos para produção de celulases

Para realizar a inoculação dos fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 e *Rhizopus* sp. CBMAI 1458 foram retirados da placa de Petri colônias puras, previamente cultivadas no meio de cultura sólido com celulose, com auxílio de um bisturi, fragmentos de 3 mm x 3 mm do agar contendo as colônias fúngicas com os esporos e micélios. Um total de 5 fragmentos foram transferidos para os frascos Schott de 250 mL (total de 5 frascos) contendo os meios de cultura com farelo de trigo. Os frascos foram colocados em estufa a 34 °C (Incubadora B.O.D. 411D, Nova Ética) sendo que em 48, 72, 96 e 120 h um frasco reacional contendo o respectivo fungo foi retirado e extraído o caldo enzimático e determinada a atividade celulolítica.

2.6 Extração do caldo enzimático

Após o período de crescimento dos fungos (48, 72, 96 e 120 h) realizou-se a extração das enzimas celulases. Adicionou-se aos frascos Schott uma solução tampão de acetato de sódio (0,2 mol.L⁻¹, pH 4,5) na relação de 10 mL de tampão para 1 g de substrato (farelo de trigo mais micélios do respectivo fungo cultivado). Em seguida utilizando-se um agitador magnético de bancada, agitou-se vigorosamente a mistura contendo o caldo enzimático durante 60 min. Após este período a mistura foi filtrada a vácuo para a retirada dos esporos e dos fragmentos sólidos como farelo de trigo e micélios que foram formados durante o crescimento fúngico. Posteriormente a solução sobrenadante contendo o caldo enzimático foi centrifugada por 10 min a 6000 rpm (Hermle Z200A) para remoção de materiais particulados.

O caldo resultante foi transferido para tubos Falcon de 15 mL e armazenado em congelador a -10 °C por até 5 dias para posterior determinação da atividade enzimática.

2.7 Análise de açúcares redutores pelo método de DNS

Os açúcares redutores quando em meio alcalino a quente formam enediois e estes atuam como doadores de elétrons, os quais reagem com o ácido 3,5-dinitro-salicílico (amarelo) reduzindo-o para o ácido 3-amino-5-nitro-salicílico (laranja avermelhado) (MILLER, 1959).

Preparação do reagente DNS (MILLER, 1959)

Para a preparação do reagente DNS pesou 10 g de ácido 3,5-dinitro-salicílico e 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio (Sal de Rochelle). Para o preparo do reagente foram preparadas duas soluções:

Solução A - Em um frasco bêquer de 400 mL dissolveu-se 10 g de DNS em 200 mL de NaOH_{aq} (2 mol. L^{-1}).

Solução B - Em um frasco bêquer de 1000 mL contendo 500 mL de água destilada adicionou-se o Sal de Rochelle. Para dissolução completa a solução foi mantida em aquecimento (50 °C) e agitação em placa magnética.

Em seguida as *soluções A e B* foram misturadas e homogeneizadas e o volume da solução final foi completado para 1000 mL. Devido a solução ser fotossensível essa foi armazenada em um recipiente envolvido por papel alumínio e armazenada na geladeira à temperatura de 5°C por um período de até 2 dias.

Preparação da curva analítica

Para a obtenção da curva analítica preparou-se as soluções de glicose com concentração de 0,00; 0,55; 1,11; 1,66; 2,22; 3,33; 4,44; 4,99 mmol.dL $^{-1}$. Em tubos de ensaio contendo 1 mL de solução DNS adicionou-se 1 mL de cada solução padrão de glicose. Posteriormente os tubos foram agitados e aquecidos por 5 min à temperatura de 100 °C. Após atingir a temperatura ambiente adicionou-se 13 mL de água destilada. O tubo apenas com água destilada (ausência de glicose) foi utilizado como controle (branco) e as leituras de absorbância foram realizadas a 540 nm. Os valores de absorbância foram plotados em um

gráfico no eixo da ordenada e os valores de concentração na abscissa. As medidas de absorbância foram realizadas no Espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu).

2.8 Determinação da atividade de celulases totais (FPase)

Para determinar a atividade de FPase totais adicionou-se uma tira de papel Whatman no. 1 (1 cm x 6 cm) enrolada em formato espiral dentro de 5 tubos de ensaio de 9 cm contendo em cada tudo 2 mL de solução tampão citrato de sódio (50 mmol.L⁻¹, pH 4,8). Em seguida à temperatura ambiente adicionou-se 1 mL do caldo enzimático fúngico em cada tudo de ensaio. A solução resultante foi homogeneizada e mantida em banho termostatizado (50°C) durante 60 min. Posteriormente os tubos foram resfriados à temperatura ambiente, retirou-se uma alíquota de 1 mL da solução, a essa solução adicionou-se 3 mL do reagente DNS e 1 mL de água destilada. A solução resultante foi submetida ao aquecimento em banho-maria 100 °C durante 5 min. Em seguida resfriou-se a solução à temperatura ambiente e analisou em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm (MILLER, 1959; SILVA et al.; 2003). O controle foi realizado seguindo todos os passos descritos anteriormente, exceto que ao invés de utilizar 1 mL do extrato enzimático fúngico adicionou-se 1 mL de água destilada.

O cálculo da atividade enzimática foi realizado através da Equação 1 (ZERAIK et al., 2008).

$$UI = \frac{D \times C (\mu\text{mol.mL}^{-1}) \times V_t (\text{mL})}{T (\text{min}) \times V_e (\text{mL})} \quad (\text{Equação 1})$$

D - diluição (realizada quando foi preciso diluir a solução enzimática)

C - concentração determinada a partir do método DNS

Vt - Volume total da reação

T - Tempo de reação

Ve - Volume da solução enzimática

3. Resultados e Discussão

3.1 Cultivo dos fungos em fermentação semi-sólida e em farelo de trigo

Quando comparada a FSS com a fermentação submersa (FS) tem-se como principal diferença a quantidade de água disponível no meio de cultura. Em geral, a água está adsorvida no substrato utilizado formando um filme em sua superfície, isso diminui a quantidade de água livre, essas condições são mais próximas das encontradas no meio ambiente, fazendo com que os microrganismos se desenvolvam melhor, outra vantagem da menor disponibilidade de água livre é a diminuição dos riscos de contaminação por outros microrganismos e mesmo pela perda da umidade devido a evaporação ser mais rápida (CASTRO et al., 2010).

A FSS possui várias vantagens em relação à FS, tais como, a aeração do meio (o meio apresenta porosidade devido a granulometria do substrato) o que disponibiliza maior concentração de oxigênio para os microrganismos aeróbios se desenvolverem; os custos operacionais são menores e os gastos energéticos também, pois todo o processo permanece total ou quase totalmente em regime estático. Esse tipo de fermentação geralmente é utilizado quando os substratos são poucos solúveis, como é o caso da celulose e materiais lignocelulósicos, diminuindo os custos de produção e empregando substratos sem utilidade para a indústria (CASTRO et al., 2010; SANTOS et al., 2006).

Uma desvantagem da FSS é o difícil controle dos parâmetros do processo, tais como, pH e temperatura devido a heterogeneidade do meio. Os microrganismos utilizados para um determinado processo devem ser capazes de crescerem em meios com baixa umidade e elevada pressão osmótica, por isso, muitas vezes, fungos filamentosos são os que melhor se adaptam a tais condições por necessitarem pouca água livre e por terem boa aderência ao substrato (MACHADO, 2002).

A utilização do farelo de trigo em FSS é muito interessante, pois esse substrato apresenta taxa nutricional elevada e sua granulometria permite uma melhor aeração do meio de cultura. Ainda o farelo de trigo torna-se vantajoso, pois naturalmente é um bom indutor para a produção de celulases, pois é constituído em média por 11% de celulose, 30% hemicelulose, 5% lignina e 17% de proteína (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011). Neste trabalho foi utilizado como substrato o farelo de trigo adquirido em comércio local, destinado especialmente para uso alimentício humano.

Portanto, pelas razões aqui expostas neste estudo optou-se em cultivar os fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 e *Rhizopus* sp. CBMAI 1458 em meio de cultura semi- sólido contendo farelo de trigo.

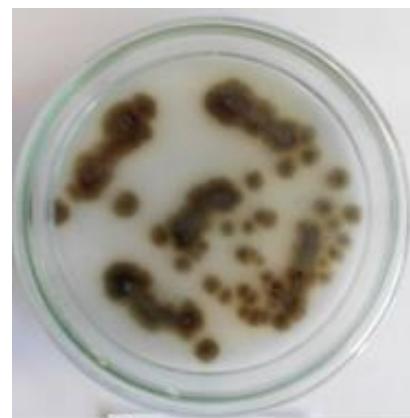
3.2 Crescimento dos fungos em meio ácido contendo celulose e solução salina

Na literatura é relatado que em pH ácido na faixa de 5,0 a 6,0 as celulases apresentam maior atividade, já em pH alcalino ocorre uma inibição do complexo, dificultando a assimilação do substrato pelos enzimas fúngicas (CASTRO et al., 2010; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2010). A primeira etapa do trabalho utilizou diferentes valores de pH em meio de cultura contendo celulose e agar para determinar a melhor faixa de pH para o crescimento dos fungos e induzir a utilização da celulose como fonte de carbono. A indução no meio sólido foi realizada com o objetivo também de maximizar o período de adaptação do fungo ao substrato utilizado no meio semi-sólido (farelo de trigo), fazendo com que os microrganismos pudessem prontamente iniciar a degradação do material celulósico pelas celulases.

Avaliou-se o crescimento das colônias na superfície das placas de Petri periodicamente durante 7 dias. As Figuras 1 e 2 mostram através do registro fotográfico o melhor desenvolvimento de ambos os fungos utilizados em pH ácido, especialmente em pH 5 e 6. Inclusive, o crescimento do fungo filamentoso *Rhizopus* sp. CBMAI 1458 foi mais notório que do *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 nestas condições (Figuras 1-2).



Rhizopus sp.; pH 5



Rhizopus sp.; pH 6

Figura 1. Colônias do fungo *Rhizopus* sp. CBMAI 1458 em meio sólido contendo celulose (pH 5 e 6).

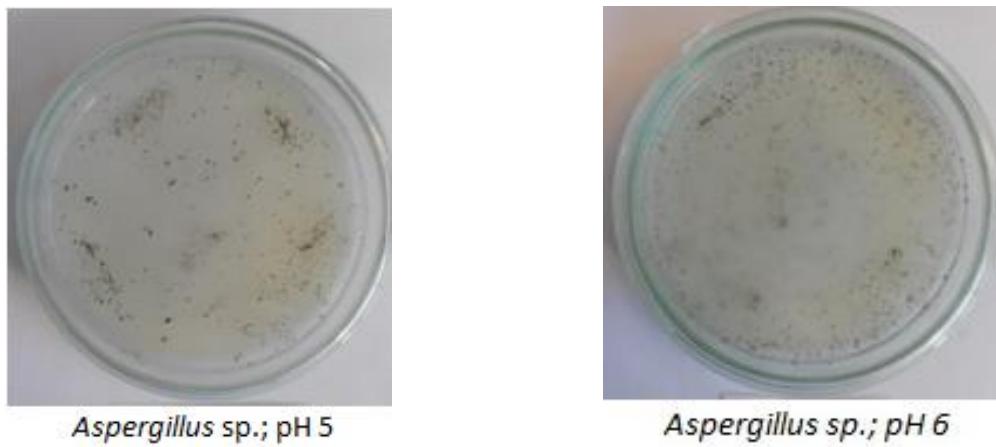


Figura 2. Colônias do fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 em meio sólido contendo celulose (pH 5 e 6).

Portanto, conclui-se que os fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 e *Rhizopus* sp. CBMAI 1458 apresentaram um crescimento desejável considerando um meio que continha exclusivamente celulose, a única fonte de nutriente disponível, além do ágar. Portanto, um material recalcitrante de difícil assimilação de nutrientes, o que pode induzir o metabolismo dos fungos a secretarem celulases para degradarem o biopolímero.

3.3 Quantificação de açúcares redutores pelo método DNS liberados por celulases fúngicas

A produção de açúcares redutores produzidos por celulases dos fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 e *Rhizopus* sp. CBMAI 1458 foi realizada no período de crescimento fúngico em até 120 h. O método de determinação de açúcares redutores é utilizado para quantificar a atividade celulases totais (FPase) presentes no meio de cultura. Para a quantificação da atividade enzimática foi necessário determinar a concentração de açúcares redutores liberados durante o processo de degradação do substrato polissacarídico. Nesse caso, o substrato utilizado foi uma tira de papel de filtro Whatman nº 1 (1 cm x 6 cm) (MILLER, 1959; SILVA et al., 2003).

Inocularam-se os fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 e *Rhizopus* sp. CBMAI 1458 em frascos Schott com capacidade de 250 mL em meio semi-sólido de farelo de trigo. A extração do caldo enzimático foi realizada a cada 24 h durante um período de até 120 h.

O método DNS é descrito na literatura como sendo confiável, adequado e apresenta sensibilidade de detecção de 1 a 20 μ mol de glicose (MILLER, 1959), apresentando desvios

mínimos e um alto grau de linearidade como pode ser observado na curva analítica experimental obtida da Figura 3.

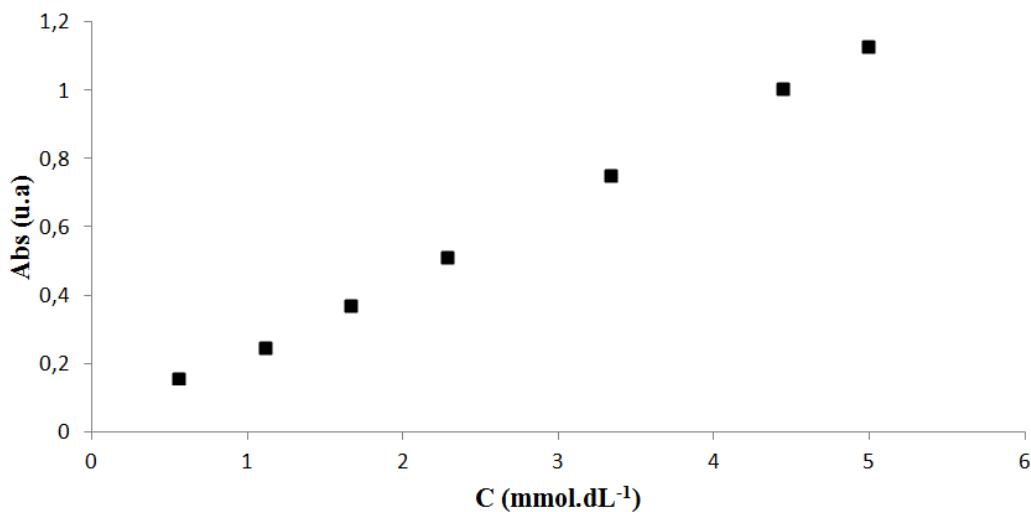


Figura 3. Curva analítica do padrão de glicose frente à reação com o ácido 3,5-dinitrosalicílico.

Através do gráfico da Figura 3 foi obtida a equação $y = 0,2235x + 0,0084$ e também o $R^2 = 0,9989$. Esta equação extraída através da curva analítica experimental foi utilizada para quantificar por interpolação a quantidade de açúcares redutores totais liberados pela ação das celulases provenientes dos fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 e *Rhizopus* sp. CBMAI 1458 no papel de filtro.

3.4 Determinação da atividade enzimática das celulases fúngicas

A atividade da celulase cristalina (Fpase) é importante, pois avalia a ação conjunta (sinérgica) das enzimas celulolíticas, mostrando assim sua atuação em substratos com regiões amorfas e cristalinas.

Em geral, o papel de filtro utilizado em laboratório são produzidos a partir de polpa de celulose refinada e/ou linteres de algodão; possuem quantidade elevada de α -celulose (α -celulose $> 95\%$) sendo esta a porção insolúvel da celulose e teores de cinzas extremamente baixos (em geral os valores são menores de 0,1%) (GLOSSÁRIO, 2015; SARTORIUS, 2015; SIGMA, 2015).

Utilizando a Equação 1 foi possível determinar a atividade total de celulases produzidas para os fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 e do *Rhizopus* sp. CBMAI 1458 em

função do tempo de cultivo dos microrganismos em meio de cultura semi-sólido de farelo de trigo ([Tabela 1](#)).

Tabela 1. Atividade enzimática para celulases totais produzidas pelos fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 e *Rhizopus* sp. CBMAI 1458 cultivados em meio de cultura semi-sólido de farelo de trigo. Fábio

Tempo de inoculação (h)	Atividade (U.mL ⁻¹)	
	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.
	CBMAI 1198	CBMAI 1458
24*	-	-
48	2,2	5,30
72	2,18	3,92
96	0,62	2,09
120	0,31	0,67

*Nas primeiras 24 h após a inoculação o valor da atividade não foi avaliado devido ao pequeno crescimento do fungo

Com os dados apresentados na [Tabela 1](#) foi possível obter um gráfico da atividade enzimática das celulases em função do tempo para os fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 e *Rhizopus* sp. CBMAI 1458 ([Figura 4](#)).

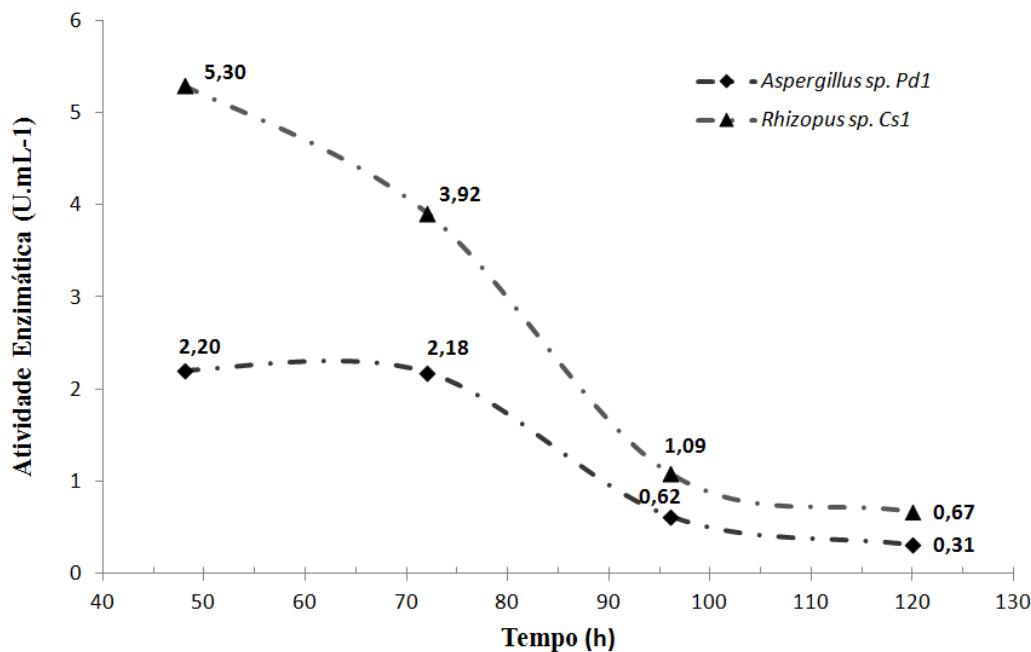


Figura 4. Curva da atividade enzimática celulolítica obtida para os fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 e *Rhizopus* sp. CBMAI 1458 em função do tempo de cultivo.

O cultivo do fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 em meio contendo farelo de trigo como substrato ao longo de 120 h mostrou que o fungo produziu as enzimas, devido obter resultados para a atividade de celulases totais ao longo dos diferentes tempos de cultivo. Como pode ser observado através da Figura 4 os maiores valores da atividade enzimática ocorreram no intervalo de 48 a 72 h, logo após a inoculação do fungo. Após o período de 72 h ocorreu um acentuado decréscimo na atividade enzimática. Os maiores valores de atividade enzimática foram entre 2,20 e 2,18 UI.mL⁻¹ em pH 6,0 durante as primeiras 72 h após a inoculação do fungo no meio semi-sólido.

A atividade enzimática determinada para o fungo *Rhizopus* sp. CBMAI 1458 foi melhor no período de 48 h após a inoculação, como pode ser observado na Figura 4, apresentando o valor máximo de atividade de 5,30 UI.mL⁻¹ em pH 6,0 cujo valor foi superior ao obtido para o fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198. Após o período de 72 h houve um acentuado decréscimo na atividade enzimática do fungo *Rhizopus* sp. CBMAI 1458.

Para um melhor entendimento das atividades obtidas ao longo do tempo de cultivo com os microrganismos utilizados neste estudo, avaliou-se as curvas de crescimento. Na literatura a curva de crescimento geral para os microrganismos está dividida em 4 fases principais: fase *Lag* (ou latência), fase *Log* (ou exponencial), fase estacionária e fase de declínio (TORTORA et al., 2012).

Levando em consideração esse modelo de crescimento populacional microbiano com as atividades enzimáticas pode-se inferir alguns aspectos comuns nas curvas de crescimento e as atividades das celulases obtidas neste trabalho. A primeira fase (*Lag*) não foi observada no caso do presente trabalho, pois os fungos já haviam passado pelo processo de indução da produção das celulases em meio sólido contendo celulose como fonte de carbono, então não foi necessário o período de adaptação ao substrato utilizado na FSS.

Na fase exponencial (*Log*) ocorreu uma rápida reprodução fúngica e intensa atividade enzimática, comparando com as curvas da atividade enzimática pode-se inferir que esse período ocorreu por volta de 48 h após a inoculação e incubação dos fungos. Durante o período estacionário ocorreu diminuição/estabilização do sistema metabólico, isso pode ser observado entre 48 e 72 h após a inoculação dos fungos, apesar de não ser tão marcante para o *Rhizopus* sp. CBMAI 1458, porém foi mais notável para o *Aspergillus* sp. CBMAI 1498, possivelmente essa diferença foi devido à fisiologia dos fungos.

A fase de declínio foi marcada possivelmente pela diminuição do número de indivíduos e decréscimo significativo da atividade enzimática, em ambos os casos as curvas de atividades enzimáticas sofreram acentuados declínios em seus valores após 72 h de incubação.

No contexto de crescimento polulacional e atividade enzimática estão os mecanismos de atuação das enzimas e o processo de *feedback*. Após determinado tempo de atuação da enzima no substrato, ocorreu uma elevação da concentração de um determinado produto formado, nesse caso os açúcares redutores. A concentração elevada de açúcares pode levar à inibição da atividade enzimática, total ou parcial, até que o equilíbrio produto/substrato seja atingido. Alguns exemplos de enzimas do complexo celulolítico que sofrem inibição pelo produto são a 1,4- β -D-glucana-celobio-hidrolase (CBH - EC 3.2.1.91), que hidrolisa terminais não redutores e oligossacarídeos em celobiose, a β -glicosídeo gluco-hidrolase (BG - EC 3.2.1.21) que promove a hidrólise de oligossacarídeos e celobiose em glicose (TORTORA et al., 2012; CASTRO et al., 2010).

Observando-se as curvas da atividade das celulases é possível que isso possa ter ocorrido no presente estudo com os fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 e *Rhizopus* sp. CBMAI 1458. Como foi observado após 72 h houve um decréscimo acentuado na atividade enzimática do fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198, enquanto que após 48 h começou a decrescer a atividade enzimática do fungo *Rhizopus* sp. CBMAI 1458. Esse decréscimo abrupto da atividade enzimática pode ser que tenha ocorrido devido ao aumento da concentração de açúcares provenientes da degradação da celulose; a elevação da concentração de açúcares no meio faz com que as enzimas diminuam sua atividade (NELSON et al., 2006).

Na literatura encontram-se vários estudos realizados com outros fungos do gênero *Aspergillus*, por exemplo, o fungo *Aspergillus aculeatus* URM 4953 apresentou atividade de celulases totais de 0,45 e 0,27 UI.mL⁻¹ em pH 6,0 (SALES et al., 2010). Estudos envolvendo a cinética enzimática celulolítica frente ao fungo *Aspergillus niger* mostraram maior atividade com 72 h de cultivo, utilizando bagaço de cana como substrato (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011).

Estudos na literatura foram realizados utilizando diferentes substratos indutores para a produção de celulases (farelo de arroz, palha de cana, bagaço de cana, casca de coco, casca de uva). Neste estudo verificou-se que cada microrganismo apresentou uma atividade para celulases distinta dependendo da capacidade de adaptação a determinado substrato, sendo em

geral o pH com maior atividade do complexo enzimático foi entre 5,0 e 6,0 (CASTRO et al., 2010; SALES et al., 2010; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011).

O fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 utilizado no presente estudo, se comparado com os resultados de outros microrganismos apresentou uma atividade enzimática elevada, sendo uma possível fonte de exploração de degradação de material lignocelulósico para produção de enzimas. Na Tabela 2 estão listados alguns microrganismos que já foram estudados para a produção de celulases.

Tabela 2. Microrganismos produtores de celulases em diferentes tipos de substratos.

Microrganismos	Atividade enzimática FPase (UI.mL ⁻¹)	Substratos
<i>Rhizopus</i> sp. (SANTOS et al., 2011)	8,7	Palma
<i>Penicillium</i> sp. CPF2 (SYED et al., 2013)	1,2	Bagaço de cana
<i>Aspergillus niger</i> IZ9 (SANTOS et al., 2011)	0,2	Resíduo de Manga
<i>Trichoderma harzianum</i> IOC 3844 (ROCHA et al., 2013)	1,22	Bagaço de cana
<i>Trichoderma harzianum</i> P49P11 (ROCHA et al., 2013)	1,21	Bagaço de cana
<i>Asperillus niger</i> (SANTOS et al., 2013)	7,51	Farelo de cacau

Santos et al. (2011) em seus estudos da atividade enzimática, utilizando uma linhagem de fungo *Rhizopus* sp. tendo como substrato a palma forrageira, obteve-se valores variando-se entre 2,0 a 8,7 UI.mL⁻¹ cujos resultados foram condizentes com os obtidos com *Rhizopus* sp. CBMAI 1458 do presente trabalho (SANTOS et al., 2011). Encontram-se também outros fungos estudados para a degradação do bagaço de cana e madeira como o *Penicilium brasiliense* que apresentou valor de atividade de 0,59 UI.mL⁻¹, o qual foi inferior ao encontrado com o *Rhizopus* sp. CBMAI 1458 (CASTRO et al., 2010; JORGENSEN et al., 2006).

Como descrito anteriormente, os maiores valores de atividade do complexo enzimático foram obtidos entre 48 e 72 h para os fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 e *Rhizopus* sp. CBMAI 1458 no meio de cultura semi-sólido. Esse fato pode estar relacionado aos mecanismos de controle e produção enzimática, também conhecida como *feedback*. Tais mecanismos são utilizados para que uma enzima atue apenas quando necessário, mas para

processos industriais isso pode ser um fator desfavorável, pois em larga escala espera-se que a enzima atue em sua capacidade máxima para que possa converter a maior parte do substrato de interesse em produto (nesse caso celulose em açúcares redutores), diminuindo o custo da produção e o consumo de energia do processo (NELSON et al., 2006). Possível solução para o problema é utilizar um sistema que retire os produtos desejados industrialmente (nesse caso glicose e outros açúcares) para que o sistema não entre em equilíbrio e esteja sempre deslocado para a conversão do substrato em produto pelas enzimas, bem como evite a inibição da atividade enzimática.

Cabe ressaltar que os meios utilizados continham como fonte de carbono a celulose pura (no meio sólido) e no meio semi-sólido farelo de trigo (indutor devido possuir celulose e hemicelulose em sua composição) e proteínas, peptona, ureia e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio que são fatores juntamente com o pH muito importantes para o desenvolvimento do fungo e consequentemente para a produção de enzimas. A temperatura de 34°C favorece utilização dos fungos para a obtenção de enzimas celulases em escalas industriais por não demandar um gasto energético alto para manter o processo metabólico ativo.

Os resultados apresentados neste trabalho foram interessantes e promissores, pois ainda há vários estudos que podem ser realizados com o objetivo de maximizar a atividade das celulases, tais como, temperatura e tipos de substratos. Destaca-se que o Brasil é um país que detém a maior biodiversidade do planeta, porém os recursos biotecnológicos desta rica biodiversidade não são explorados cientificamente e economicamente, como no caso específico das celulases o país é importador deste coquetel de enzimas.

4. Conclusão

Utilizando gêneros de diferentes fungos isolados de sementes de plantas em fase de germinação foi possível através da fermentação semi-sólida avaliar a produção de celulases realizada em função do tempo para *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 e *Rhizopus* sp. CBMAI 1458.

O fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 apresentou atividade enzimática para celulase cristalina, tendo alcançado valor máximo no período entre 48-72 h de cultivo, temperatura de 34 °C e pH 6,0 obtendo valores de atividade entre 2,20 e 2,18 UI.mL⁻¹. O fungo *Rhizopus* sp. CBMAI 1458 revelou-se foi promissor para a produção de celulases apresentando maior atividade no período de 48 h de cultivo, na temperatura de 34 °C e pH 6,0 (5,30 UI.mL⁻¹).

Faz-se necessário o estudo das variáveis que afetam a produção das enzimas por esses fungos, tais como a temperatura e o tipo de substrato, mas os resultados obtidos já se mostraram promissores mesmo sem a otimização de alguns parâmetros.

5. Agradecimentos

À FAPESP pelo bolsa de iniciação científica ao estudante Fábio José Inforsato (Processo nº 2011/12638-4). À FAPESP e CNPq ao Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto pelos projetos financiados ao laboratório para aquisição de equipamentos e materiais de consumo. Ao Núcleo de Pesquisa em Ciência e Tecnologia de BioRecursos (CITECBio) da Universidade de São Paulo.

6. Referências

- ABREU, L. D.; MARINO R. H.; MESQUITA, J. B.; RIBEIRO, G. T. Degradação da madeira de *Eucalyptus* sp. por basidiomicetos de podridão branca. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.74, n.4, p.321-328, 2007.
- ALMEIDA, M. C. O. **Indução de celulases e xilanase por *Trichoderma reesei* e *Penicillium variabile* em cultivo em estado sólido a partir de substratos lignocelulósicos.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). 2012. 145f, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC.
- ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Relevância de compostos de baixa massa molar produzidos por fungos e envolvidos na biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1586–1595, 2009.
- CANILHA, L.; MILAGRES, A. M. F; SILVA, S. S.; SILVA, J. B. A.; FELIPE, M. G. A.; ROCHA, G. J. M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: Uma estratégia de "desconstrução" da fibra vegetal. **Revista Analytica**, v. 8, p. 48-54, 2010.
- CASTRO, A. M. DE; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- CASTRO, N. M. de. Parede Celular. Disponível em: <http://www.anatomiavegetal.ib.ufu.br/paredeCelular/>. Acesso em: 5 setembro de 2015.
- Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar, Quarto Levantamento Safra 2014/2015. Conab, Brasília, Abril, 2014. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_04_13_08_45_51_boletim_cana_portugues_-_4o_lev_-_14-15.pdf. Acesso em junho de 2014

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Oitavo Levantamento Safra 2013/2014. Conab, Brasília, Maio, 2014. <http://www.cpqba.unicamp.br/colecoes/2015-06-10-19-50-09.html>. Acesso em setembro de 2014.

COSTA, M. T. Região produzirá etanol de 2^a geração: Grupo de Piracicaba prevê levar combustível do bagaço e palha da cana ao mercado em 2014. Disponível em: http://correio.rac.com.br/_conteudo/2013/11/capa/campinas_e_rmc/129213-regiao-produzira-ethanol-de-2-geracao.html. Acesso em 19 de setembro 2015.

DING, S.Y.; HIMMEL, M. E. The maize primary cell wall microfibril: A new model derived from direct visualization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 597-606, 2006.

ESCOBAR, L. F. **Emissão de gases de efeito estufa em sistemas de manejo em solo do Planalto Médio do Rio Grande do Sul**. 2008. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS.

FLORENTINO, H. DE O.; MORENO, E. V.; SARTORI, M. M. P. Multiobjective optimization of economic balances of sugarcane harvest biomass. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 5, p. 561–564, 2008.

Glossário (2015). Disponível em:

<http://fibria.infoinvest.com.br/static/ptb/glossario.asp?idioma=ptb>. Acesso em: 7 outubro de 2015.

Iogen Corporation. Disponível em: <http://www.iogen.ca/>. Acesso em: 18 de setembro de 2015.

JORGENSEN, H.; OLSSON, L. Production of cellulases by *Penicillium brasiliianum* IBT 20888 - Effect of substrate on hydrolytic performance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 3-4, p. 381–390, 2006.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 68, p. 223–253, 2010.

MACHADO, C. M. M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de hormônio vegetal (ácido giberélico – GA3) por fermentação no estado sólido em resíduos agroindustriais brasileiros: Relação da produção de GA3 em biorreator piloto e bioensaios em mudas de tomateiro (*Lycopersicum esculentum*)**. 2002. 95f. Tese (Doutorado em Processo Biotecnológico). Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR.

MENDES, R. F.; GUIMARÃES JUNIOR, J. B. Chemical treatment of banana tree pseudostem particles aiming the production of particleboards. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 1, p. 43-49, 2014.

MESCHEDE, D. K.; VELINI, E. D.; CARBONARI, C. A.; MORAES, C. P. Teores de lignina e celulose em plantas de cana-de-açúcar em função da aplicação de maturadores. **Planta Daninha**, v. 30, n. 1, p. 121–127, 2012.

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

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4a. ed., São Paulo: Sarvier, 2006, cap. 7: Carboidratos e Glicobiologia, p. 236-270.

- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4a. ed., São Paulo: Sarvier, 2006, cap. 6: Enzimas, p. 191-235.
- OLIVEIRA, M. W.; TRIVELIN, P. C. O.; GAVA, G. J. C.; PENATTI, C. P. Degradação da palhada de cana-de- açúcar. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 4, p. 3–11, 1999.
- OLIVEIRA, S. L. R. de. **Aproveitamento da casca de coco verde (*Cocos nucifera* L.) para produção de celulases**. 2010. 81f. Dissertação (Mestrado em tecnologia de alimentos). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE.
- PEREIRA, V. M. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização da produção de celulases por *Aspergillus sulphureus* (Fresen) Wehmer**. 2012. 111f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.
- Raizen breaks ground on Iogen facility in Brazil. Disponível em: http://www.iogen.ca/media-resources/press_releases/2013_Iogen_pr_Raizen_nov28.pdf. Acesso em: 18 de setembro de 2015.
- REYES, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; DURÁN, N. Hidrólise enzimática de casca de arroz utilizando-se celulases. Efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos. **Química Nova**, v. 21, n. 2, p. 140–143, 1998.
- ROCHA, V. A. L.; MAEDA, R. N.; SANTA ANNA, L. M. M.; PEREIRA, N. Sugarcane bagasse as feedstock for cellulase production by *Trichoderma harzianum* in optimized culture medium. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 1–13, 2013.
- RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 8, p. 912–919, 2011.
- SALES, M. R.; MOURA, R. B.; PORTO, T. S.; MACEDO, G. R.; PORTO, A. L. F. Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 11, p. 1290–1296, 2010.
- SANTOS dos, T. C; SOARES G. S.; ROCHA J. O.; FERREIRA, A. N.; PACHECO, C. S. V.; FRANCO, M. Quantificação da atividade de CMCase FPase produzidas a partir da fermentação em estado sólido da palma forrageira. **Revista Científica do Departamento de Química e Exatas**, v.2, n.2, p.22-29, 2011.
- SANTOS, D. T.; SARROUH, B. F.; SANTOS, J. C.; PÉREZ, V. H.; SILVA, S. S. Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em biotecnologia. **Revista Janus**, v. 3, p. 164-183, 2006.
- SANTOS, E. S. Microrganismos promissores para a degradação de compostos fenólicos presentes em bagaço-de-cana, lodo e águas residuárias de agroindústria sucro-alcooleira. 2007. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal de Alagoas, Maceió-Al.
- SANTOS, T. C. DOS et al. *Aspergillus niger* como produtor de enzimas celulolíticas a partir farelo de cacau (*Theobroma cacao*). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 1, p. 65–71, 2013.

SANTOS, T. C. dos; ROCHA, T. J. O.; OLIVEIRA, A. C.; ABREU FILHO, G.; FRANCO, M. Optimization of productions of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* using residue of mango a substrate. **Ciência Rural**, v. 41, n. 12, p. 2210–2216, 2011.

SARTORIUS (2015). Papéis de Filtro para Laboratório e Indústria. Disponível em: http://www.sartorius.com/fileadmin/fm-dam/DDM/Lab-Products-and-Services/Lab-Filtration/Filters-and-Holders/Filter-Papers/Catalogues/Cat_Filter-Papers_S--1502ac.pdf. Acesso em: 7 outubro de 2015.

SATER, O.; SOUZA, N. D. DE; OLIVEIRA, E. A. G. DE, ELIAS, T. F.; TAVARES, R. Estudo comparativo da carbonização de resíduos agrícolas e florestais visando à substituição da lenha no processo de secagem de grãos de café. **Revista Ceres**, v. 59, n. 6, p. 717–722, 2012.

SIGMA. Whatman® qualitative filter paper, Grade 1 (2015). Disponível em: <http://www.sigmaldrich.com/catalog/product/aldrich/wha1001325?lang=pt®ion=BR>. Acesso em: 7 outubro de 2015.

SILVA, R. N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. D. X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E. R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 337-341, 2003.

SILVA, R. N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. D. X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E. R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 337–341, 2003.

SOMERA, A. F. **Estudo da multiplicidade de formas de β -glicosidases de Aspergillus versicolor**. 2008. 156f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : A review. **Bioresource technology**, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002.

SYED, S.; RIYAZ-UL-HASSAN, S.; JOHRI, S. A Novel Cellulase from an Endophyte, *Penicillium* sp. NFCCI 2862. **American Journal of Microbiological Research**, v. 1, n. 4, p. 84–91, 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012, cap. 6: Crescimento microbiano, p. 156-174.

VASQUEZ, M. P. **Desenvolvimento de processo de hidrólise enzimática e fermentação simultânea para a produção de etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. 205f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ.

ZERAIK, A. E.; SOUZA, F. S.; FATIBELLO-FILHO, O.; LEITE, O. D. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Quimica Nova**, v. 31, n. 4, p. 731–734, 2008.

ZOREL, D. **Atributos químicos e microbiológicos de solo cultivado com caba de açúcar sob manejo convencional e orgânico**. 2011. 74f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural) - Universidade Federal de São Carlos, Araras-SP.