



Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

CLAUDIANY SILVA LEITE LIMA

**ENZIMAS CELULOLÍTICAS DE MACRO-BASIDIOMICETOS ISOLADOS DO
CERRADO TOCANTINENSE CULTIVADOS EM BIOMASSAS
LIGNOCELULÓSICAS RESIDUAIS DA AGROINDÚSTRIA DO AÇAÍ (*Euterpe spp.*)**

**GURUPI - TO
2019**



**Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

CLAUDIANY SILVA LEITE LIMA

**ENZIMAS CELULOLÍTICAS DE MACRO-BASIDIOMICETOS ISOLADOS DO
CERRADO TOCANTINENSE CULTIVADOS EM BIOMASSAS
LIGNOCELULÓSICAS RESIDUAIS DA AGROINDÚSTRIA DO AÇAÍ (*Euterpe spp.*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Félix Gonçalves de Siqueira,
Embrapa Agroenergia

Co-orientador: Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida
Universidade Federal do Tocantins

**GURUPI - TO
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- S586e Silva Leite Lima, Claudiany .
ENZIMAS CELULOLÍTICAS DE MACRO-BASIDIOMICETOS
ISOLADOS DO CERRADO TOCANTINENSE CULTIVADOS EM
BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS RESIDUAIS DA AGROINDÚSTRIA
DO AÇAÍ (*Euterpe spp.*). / Claudiany Silva Leite Lima. – Gurupi, TO, 2019.
106 f.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins
– Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em
Biotecnologia, 2019.
- Orientador: Félix Gonçalves de Siqueira
Coorientador: Alex Fernando de Almeida
1. Resíduos do açaí. 2. Fungos da podridão-branca. 3. Cocultivos. 4.
Atividade enzimática. I. Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Rua Badejós, Chácara 69 e 72 - CEP: 77402-970 - Caixa Postal 66 | Gurupi/TO
(63) 3311-1649 | www.uft.edu.br/biotecnologia | ppgbiotec@uft.edu.br



CLAUDIANY SILVA LEITE LIMA

Enzimas celulolíticas de macro-basidiomicetos isolados do cerrado tocantinense cultivados em biomassas lignocelulósicas residuais da agroindústria do açaí (*Euterpe spp.*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em 04/04/2019 foi julgada adequada para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data da aprovação: 04/04/2019.

Banca Examinadora:



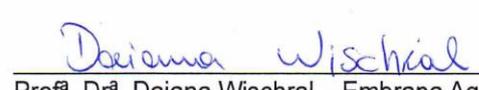
Prof. Dr. Felix Gonçalves de Siqueira – Orientador – Embrapa Agroenergia Brasília



Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida – Coorientador - UFT



Prof. Dr. Amanda Araujo Souza – Embrapa Agroenergia Brasília



Prof. Dr. Daiana Wischral – Embrapa Agroenergia Brasília

Brasília (DF).
2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre presente em minha vida e iluminando o meu caminho, por me permitir realizar todos os meus sonhos, permitir errar, aprender e crescer, por sua eterna compreensão e tolerância.

A minha família que são à base da minha vida, o meu porto seguro, a quem eu posso recorrer em todas as horas, nos momentos de tristezas e de alegrias.

Ao meu namorado, Osvaldo José Ferreira Júnior, por me acompanhar nos momentos mais difíceis, pelo apoio, dedicação, compreensão sempre me motivando.

As minhas amigas acadêmicas, Naiane Gomes, Vanessa Matte e Dalmácia pelo companheirismo e motivação.

Ao meu orientador Professor Felix Siqueira, pela paciência e cordialidade que sempre teve por mim. Em nenhum momento cansarei de agradecer a oportunidade e por confiar nas minhas capacidades.

Ao meu co-orientador Professor Alex Fernando de Almeida, pelo acolhimento, boa vontade, interesse e disponibilidade sempre quando eu precisei.

Ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia pela oportunidade que foi me dada, ao fazer este mestrado;

A equipe e aos usuários Laboratório de Biotecnologia, Análise de Alimentos e Produtos da Habite – Incubadora de Empresas de Biotecnologia da UFT, em especial Ryhára Dias, Adriana Augusta, Nayra Morgana, Ana Caroline, Erika Pino e Lucas, pelo acolhimento, apoio, vínculo e bons momentos.

A Associação dos Agroextrativistas Familiares Solidários do Povoado Km 1700 pelo fornecimento dos resíduos vegetais de açaí.

Aos terceirizados da UFT, em especial Dona Terezinha, que tão gentilmente cuida dos seus filhos acadêmicos com amor e carinho.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Alex Fernando de Almeida, Dra. Amanda Araújo Souza e Dra. Daiana Wischral, que gentilmente aceitaram participar e contribuir com esta dissertação.

À Prof^a Talita, agradeço pelo incentivo e pelas conversas breves, porém valiosas e ao Prof. Ezequiel, pela atenção e carinho.

A todos aqueles que contribuíram direto ou indiretamente para realização de mais uma etapa em minha vida, o meu muito obrigada.

Dedicatória

Ao grande e eterno poderoso Pai eterno que nunca nos abandonará.

Aos meus filhos Mariana Leite e Davi Leite.

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram isolar e avaliar fungos do tipo macro-basidiomicetos, do cerrado no Tocantins, sobre a capacidade do crescimento em biomassa da agroindústria do açaí e a produção enzimática. Os macro-basidiomicetos foram cultivados em meio sólido ágar-ágar enriquecidos com substratos lignocelulósicos de Fibra do Cacho do açaí (FC), ou Fibra da Semente do açaí (FS) ou caldo de batata, suplementados ou não com glicose, foram avaliados quanto ao diâmetro, índice de velocidade e taxa de crescimento micelial. A produção enzimática foi realizada utilizando FC e FS como substratos, por cultivo em estado submerso e sólido, no qual, os cultivos em estado sólido foram realizados com cinco diferentes formulações dos substratos. Os cocultivos entre os isolados de macro-basidiomicetos e *Trichoderma asperellum* BC-2 A70882D foram realizados em placas de Petri contendo os meios BDA ou MEA. Dentre os oito isolados de macro-basidiomicetos, o FPB 173 foi selecionado para a cultivo em meio submerso em monocultivo e cocultivo com o *T. asperellum*, para avaliação das atividades enzimáticas de β -glicosidase, xilanases e lipases. Os cultivos em placa contendo meios agar enriquecidos (BDA-C, FC-C e FC-S) apresentaram diferença significativa no diâmetro de crescimento micelial para o isolado FPB 166. Os FPB 166 e FPB 173 apresentaram melhor índice de crescimento micelial. Nos cultivos em estado sólido (CES), a melhor formulação observada para todas as enzimas foi a F1 (100% cacho do açaí). O isolado FPB 167 apresentou maior atividade para a β -glicosidase, e para CMCase, com $0,187 \text{ U.gss}^{-1}$, $0,245 \text{ U.gss}^{-1}$, respectivamente. As melhores atividades observadas para a pectinase, foram com as isolados FPB 166 ($0,664 \text{ U.gss}^{-1}$) e FPB 173 ($0,615 \text{ U.gss}^{-1}$), e para a xilanase, o isolado FPB 169 ($0,766 \text{ U.gss}^{-1}$). No cultivo submerso (CS), o cocultivo de FPB 173 e *T. asperellum*, teve a maior atividade de β -glicosidase nos substratos FC e FS, com $0,384 \text{ U.mL}^{-1}$ e $0,366 \text{ U.mL}^{-1}$, respectivamente. Para a lipase, foram observados diferenças entre o monocultivo de *T. Asperellum* e o cocultivo de FBP 173 e *T. asperellum* ($0,747 \text{ U.mL}^{-1}$ e $0,632 \text{ U.mL}^{-1}$, respectivamente). Nos resultados da atividade enzimática da xilanase, o monocultivo de *T. asperellum* no FC, após 48 e 168 horas, atingiu $1,824 \text{ U.mL}^{-1}$ e $1,732 \text{ U.mL}^{-1}$, respectivamente. As biomassas da agroindústria do açaí, quando utilizadas como fonte de carbono ou como fator de enriquecimento de meio, para macro-basidiomicetos ou cocultivos em processos de cultivos, foram significativas para o crescimento micelial e produção de complexo enzimáticos.

Palavra-chave: resíduos do açaí; fungos da podridão-branca; cocultivos; atividade enzimática.

ABSTRACT

The aim of this work were to isolate and evaluate macro-basidiomycete fungi, from the cerrado in Tocantins, with the capacity of growth in biomass of açai byproduct and enzymatic production. The macro-basidiomycetes were grown in solid medium enriched with açai berry (FC) fiber lignocellulosic substrates, or açai seed fiber (FS) or potato broth, supplemented or not with glucose. The fungi were evaluated for mycelial growth diameter, mycelial growth rate index and mycelial growth rate. The enzymatic production was performed using FC and FS as substrates, by submerged and solid culture. Solid-state cultivation (SSC) were made with five different formulations of the substrates. Co-cultivation between the macro-basidiomycetes and *Trichoderma asperellum* BC-2 A70882D isolates were performed in Petri dishes containing the PDA or MEA media. Among the eight macro-basidiomycete isolates, FPB 173 was selected for cultivation in submerged medium in monoculture and cocultivated with *T. Asperellum* BC-2 A70882D, for evaluation of the enzymatic activities of β -glucosidase, xylanases and lipases. Plate cultures containing BDA-C, FC-C and FC-S medium showed a significant difference in the mycelial growth diameter for the FPB 166 isolate, and the FPB 166 and FPB 173 had better mycelial growth index. In solid state cultures, the best formulation observed for all enzymes was F1. The FPB 167 line presented higher activity for β -glucosidase, and for CMCase, with 0.187 U.gss^{-1} , 0.245 U.gss^{-1} , respectively. The best observed activities for pectinase were FPB 166 (0.664 U.gss^{-1}) and FPB 173 (0.615 U.gss^{-1}), and for xylanase, FPB 169 (0.766 U.gss^{-1}). In the submerged culture, the co-culture of FPB 173 and *T. asperellum* had the highest β -glucosidase activity in the substrates FC and FS, with 0.384 U.mL^{-1} and 0.366 U.mL^{-1} , respectively. For lipase, differences between the monoculture of *T. asperellum* and the cocultivation of FBP 173 and *T. asperellum* (0.747 U.mL^{-1} and 0.632 U.mL^{-1} , respectively) were observed. In the results of the enzymatic activity of xylanase, monoculture of *T. asperellum* in FC, after 48 and 168 hours, reached $1,824 \text{ U.mL}^{-1}$ and $1,732 \text{ U.mL}^{-1}$, respectively. The biomass of the açai agroindustry, when used as a carbon source or as a medium enrichment factor, for macro-basidiomycetes or cocultures in cultivation processes, were significant for mycelial growth and production of enzymatic complexes.

Key words: açai wastes process, white rot fungi; coculture; enzyme activity.

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
1.1 CULTURA DO AÇAÍ: PRODUTOS E BIOMASSAS RESIDUAIS.....	19
ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.	
1.1.1 Aspectos produtivos e mercadológicos do açaí.....	22
1.2 CADEIA PRODUTIVA DO AÇAÍ.....	23
1.3 A PROBLEMÁTICA DAS BIOMASSAS RESIDUAIS DO AÇAÍ E POTENCIAIS APLICAÇÕES PARA GERAÇÃO DE NOVOS PRODUTOS.....	26
1.3.1 Substrato para a produção de cogumelos comestíveis.....	29
1.3.1.1 Composição química das fibras lignocelulolíticas	30
1.3.1.1.1 <i>Celulose</i>	30
1.3.1.1.2 <i>Hemicelulose</i>	31
1.3.1.1.3 <i>Lignina</i>	31
1.4 ENZIMAS DE MACRO-BASIDIOMICETOS SELVAGENS: APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA.....	32
1.5 ENZIMAS CELULOLÍTICAS MICROBIANAS E APLICAÇÕES EM BIOMASSAS ALIMENTARES.....	34
1.5.1 Holocelulases.....	35
1.5.1.1 Celulases.....	35
1.5.1.2 Hemicelulases.....	36
1.5.2 Ligninases.....	36
1.5.2.1 Peroxidases (Ligninas Peroxidases - LiPs e Manganês Peroxidases - MnPs.....	37
1.5.2.2 Lacases.....	37
1.6 ENZIMAS: BENEFICIAMENTO DE POLPA DE AÇAÍ	38
2. JUSTIFICATIVA.....	40
3. OBJETIVOS.....	41
3.1 OBJETIVO GERAL.....	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
4. MATERIAL DE MÉTODOS.....	42
4.1 COLETA, ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DOS MACRO-BASIDIOMICETOS.....	42
4.2 BIOMASSAS RESIDUAIS DE AÇAÍ: OBTENÇÃO, PREPARO E ARMAZENAMENTO.....	44

4.3 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DOS MACRO-BASIDIOMICETOS POR CES EM SUBSTRATOS ENRIQUECIDOS COM BIOMASSAS DO AÇAÍ.....	45
4.3.1 Delineamento experimental.....	45
4.3.1.1 Preparo dos meios enriquecidos com biomassas residuais do açaí.....	46
4.3.1.2 Inoculação	46
4.3.1.3 Avaliação do crescimento micelial.....	47
4.4 ENZIMAS CELULOLÍTICAS DE MACRO-BASIDIOMICETOS CULTIVADOS EM CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO EM BIOMASSAS RESIDUAIS DO AÇAÍ.....	48
4.4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	48
4.4.1.1 Cultivo: cultivo em estado sólido.....	48
4.4.1.2 Inoculação.....	48
4.4.2 Análises enzimáticas.....	49
4.4.2.1 Determinação de atividade de β -glicosidase.....	49
4.4.2.2 Determinação de atividade de CMCCase.....	50
4.4.2.3 Determinação de atividade de lipase.....	50
4.4.2.4 Determinação de atividade de pectinase.....	51
4.4.2.5 Determinação de atividade de xilanase.....	52
4.4.3 Análises dos dados.....	52
4.5 COCULTIVO DE MACRO-BASIDIOMICETO E <i>Trichoderma asperellum</i> BC-2 A70882D EM BIOMASSAS RESIDUAIS DE AÇAÍ.....	53
4.5.1 <i>Trichoderma asperellum</i> BC-2 A70882D E MACRO-BASIDIOMICETO – COCULTIVO.....	53
4.5.2 Determinação do crescimento fúngico.....	54
4.5.3 Cocultivo: tipos de interações entre Macro-basidiomicetos e <i>Trichoderma asperellum</i> BC-2 A70882D.....	54
4.5.3.1 Desenho experimental para cocultivos em meio ágar (placa).....	55
4.5.4 Monocultivo em cultivo submerso.....	57
4.5.5 Cocultivo dos fungos filamentosos em cultivo submerso.....	57
4.5.5.1 Obtenção do extrato enzimático e atividades enzimáticas.....	57
5. RESULTADOS.....	59
5.1 ISOLAMENTO DE MACRO-BASIDIOMICETOS.....	59
5.2. MACRO-BASIDIOMICETOS: CRESCIMENTO MICELIAL.....	60
5.3 CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DOS MACRO- BASIDIOMICETOS EM BIOMASSAS RESIDUAIS DO AÇAÍ.....	71

5.4 COCULTIVO E ATIVIDADES ENZIMÁTICAS: MACRO-BASIDIOMICETO E <i>Trichoderma asperellum</i> BC-2 A70882D.....	82
5.4.1 Cocultivo macro-basidiomicetos e <i>T. asperellum</i> BC-2 A70882D em meio ágar-enriquecido.....	82
5.4.2 Cocultivo macro-basidiomicetos e <i>T. asperellum</i> BC-2 A70882D em cultivo submerso, enriquecido com FC e FS.....	84
6. DISCUSSÃO	89
6.1 MACRO-BASIDIOMICETOS: CRESCIMENTO MICELIAL.....	89
6.2 CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DOS MACRO-BASIDIOMICETOS EM BIOMASSAS RESIDUAIS DO AÇAÍ.....	90
6.3 COCULTIVOS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA: MACRO-BASIDIOMICETOS E <i>Trichoderma asperellum</i> BC-2 A70882D	92
6.3.1 Cocultivo macro-basidiomicetos e <i>Trichoderma asperellum</i> BC-2 A70882D em meio distintos.....	92
6.3.2 Atividade enzimática de cocultivo de macro-basidiomicetos e <i>Trichoderma asperellum</i> BC-2 A70882D em meio enriquecido.....	93
7. CONCLUSÃO.....	95
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química de biomassas lignocelulósicas, incluindo o caroço de açaí.	29
Tabela 2. Modelos de interação entre fungos filamentosos crescidos em placa.....	55
Tabela 3. Interação entre fungos filamentosos crescidos em placa	56
Tabela 4. Tempo (dias) de colonização Máximo em placa de Petri em diferentes meio de cultura.....	64
Tabela 5. Resumo da análise da variância para Diâmetro de Crescimento do Micélio (DCM) e Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) de Macro-basidiomicetos (MB) em função da composição do Meio de Cultura (M).....	65
Tabela 6. Valores nutricionais e de componentes orgânicos da Batata inglesa (BDA), Fibra do Cacho do açaí (FC) e Fibra da Semente do açaí (FS).....	70
Tabela 7. Resumo da análise da variância para as enzimas β -glicosidase, CMCcase, pectinase e xilanase de Macro-basidiomicetos (MB) cultivados em diferentes Formulações de meios (F).....	73
Tabela 8. Resumo da análise da variância para as enzimas β -glicosidase, lipase e xilanase de diferentes inoculações e cocultivos.....	84

FIGURAS

Figura 1. Palmeira de <i>Euterpe precatoria</i> (A); Caule (B); Frutos (C).....	20
Figura 2. Palmeira de <i>Euterpe oleracea</i> (A), Cachos (B), Frutas no cacho (C), Corte transversal das frutas (D).....	21
Figura 3. Despoldadeira tradicional (semi-industrial) para frutos de açaí.....	25
Figura 4. Matéria-prima extraída do interior das plantas.....	30
Figura 5. Processo de biodegradação por macro-basidiomicetos selvagens na obtenção de valiosos subprodutos.....	32
Figura 6. Esquema de degradação da celulose a partir da ação das enzimas endo-1,4-β-D-glucanase (EG), celobiohidrolases (CBHI e CBHII), 1,4-β-Dglucosidase (BGL), celobiose desidrogenase (CDH) e monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMO1, 2 e 3).....	36
Figura 7. Áreas de coleta dos macro-basidiomicetos.....	43
Figura 8. Registro da coleta de macro-basidiomiceto número FPB 173.....	44
Figura 9. Coleta e tratamento das biomassas.....	45
Figura 10. Meios de cultura para o crescimento micelial dos macro-basidiomicetos.....	46
Figura 11. Diagrama esquemático das interações entre duas linhagens diferentes de fungos filamentosos crescidos em batata-dextrose-ágar e ágar extrato de malte.....	56
Figura 12. Crescimento micelial dos macro-basidiomicetos quando cultivados em placa de Petri em meio de cultura.....	59
Figura 13. Crescimento micelial dos macro-basidiomicetos quando cultivados em placa de Petri em meio de cultura com Batata-Dextrose-Ágar – com glicose (BDA-C).....	61
Figura 14. Crescimento micelial dos macro-basidiomicetos quando cultivados em placa de Petri em meio de cultura com Batata-Dextrose-Ágar – sem glicose (BDA-S).....	61
Figura 15. Crescimento micelial dos macro-basidiomicetos quando cultivados em placa de Petri em meio de cultura com Ágar Fibra do Cacho do Açaí com glicose (FC-C).....	62
Figura 16. Crescimento micelial dos macro-basidiomicetos quando cultivados em placa de Petri em meio de cultura com Ágar Fibra do Cacho do Açaí sem glicose (FC-S).....	62
Figura 17. Crescimento micelial dos macro-basidiomicetos quando cultivados em placa de Petri em meio de cultura com Agar Fibra da Semente do Açaí com glicose (FS-C).....	63
Figura 18. Crescimento micelial dos macro-basidiomicetos quando cultivados em placa de Petri em meio de cultura com Ágar Fibra da Semente do açaí sem glicose (FS-S).....	63

Figura 19: Diâmetro de Crescimento do Micélio (DCM) ao oitavo dia de Macro-basidiomicetos: FPB 166, FPB 167, FPB 168, FPB 169, FPB 170, FPB 171, FPB 172, FPB 173.....	66
Figura 20. Diâmetro de Crescimento do Micélio (DCM) ao oitavo dia em diferentes Meios: BDA-C, BDA-S, FC-C, FC-S, FS-C e FS-S.....	66
Figura 21. Diâmetro de Crescimento do Micélio (DCM) ao oitavo dia macro-basidiomicetos: FPB 166, FPB 167, FPB 168, FPB 169, FPB 170, FPB 171, FPB 172, FPB 173, em função dos meios: BDA-C, BDA-S, FC-C, FC-S, FS-C e FS-S.....	67
Figura 22. Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) de macro-basidiomicetos: FPB 166, FPB 167, FPB 168, FPB 169, FPB 170, FPB 171, FPB 172, FPB 173.....	68
Figura 23. Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) em diferentes meios: BDA-C, BDA-S, FC-C, FC-S, FS-C e FS-S.....	68
Figura 24. Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) ao oitavo dia macro-basidiomicetos: FPB 166, FPB 167, FPB 168, FPB 169, FPB 170, FPB 171, FPB 172, FPB 173, em função dos meios: BDA-C, BDA-S, FC-C, FC-S, FS-C e FS-S	69
Figura 25. Macro-basidiomicetos após 21 dias de incubação em B.O.D sob cultivo em estado sólido usando cinco formulações a base de biomassa lignocelulósica da agroindústria do açaí (Fibra do cacho do açaí, Fibra da semente do açaí e mistura: Cacho+semente nas proporções: (50:50), (80:20) (20:80). Macro-basidiomicetos: FPB 166 (A); FPB 167 (B); FPB 168 (C); FPB 169 (D); FPB 170 (E); FPB 171 (F); FPB 172 (G); FPB 173 (H).....	72
Figura 26. Atividade β -glicosidase dos extratos obtidos em CES de macro-basidiomicetos cultivados nos substratos lignocelulolíticos da agroindústria do açaí. Macro-basidiomicetos: FPB 166, FPB 167, FPB 168, FPB 169, FPB 170, FPB 171, FPB 172, FPB 173.....	73
Figura 27. Atividade β -glicosidase dos extratos obtidos em CES de macro-basidiomicetos cultivados nas Formulações da agroindústria do açaí. Formulações: F1 (100%FC), F2 (100%FS), F3 (50%FC e 50%FS), F4 (80%FC e 20%FS) e F5 (20%FC e 80%FS).....	74
Figura 28. Atividade β -glicosidase dos extratos obtidos em CES dos macro-basidiomicetos: FPB 166, FPB 167, FPB 168, FPB 169, FPB 170, FPB 171, FPB 172, FPB 173; em função das Formulações: F1 (100%FC), F2 (100%FS), F3 (50%FC e 50%FS), F4 (80%FC e 20%FS) e F5 (20%FC e 80%FS).....	75
Figura 29. Atividade CMCase dos extratos obtidos em CES de macro-basidiomicetos cultivados nos substratos lignocelulolíticos da agroindústria do açaí. Macro-basidiomicetos: FPB 166, FPB 167, FPB 168, FPB 169, FPB 170, FPB 171, FPB 172, FPB 173.....	75
Figura 30 Atividade CMCase dos extratos obtidos em CES de macro-basidiomicetos cultivados nas Formulações da agroindústria do açaí. Formulações: F1 (100%FC), F2 (100%FS), F3 (50%FC e 50%FS), F4 (80%FC e 20%FS) e F5 (20%FC e 80%FS).....	76

Figura 31. Atividade CMCase dos extratos obtidos em CES dos macro-basidiomicetos: FPB 166, FPB 167, FPB 168, FPB 169, FPB 170, FPB 171, FPB 172, FPB 173; em função das Formulações: F1 (100%FC), F2 (100%FS), F3 (50%FC e 50%FS), F4 (80%FC e 20%FS) e F5 (20%FC e 80%FS).....	77
Figura 32. Atividade pectinase dos extratos obtidos em CES de macro-basidiomicetos cultivados nos substratos lignocelulolíticos da agroindústria do açaí. Macro-basidiomicetos: FPB 13, FPB 20, FPB 35, FPB 39, FPB 38, FPB 90, FPB 91, FPB 92.....	77
Figura 33. Atividade pectinase dos extratos obtidos em CES de macro-basidiomicetos cultivados nas Formulações da agroindústria do açaí. Formulações: F1 (100%FC), F2 (100%FS), F3 (50%FC e 50%FS), F4 (80%FC e 20%FS) e F5 (20%FC e 80%FS).....	78
Figura 34. Atividade pectinase dos extratos obtidos em CES das Formulações: F1 (100%FC), F2 (100%FS), F3 (50%FC e 50%FS), F4 (80%FC e 20%FS) e F5 (20%FC e 80%FS); em função dos macro-basidiomicetos: FPB 13, FPB 20, FPB 35, FPB 39, FPB 38, FPB 90, FPB 91, FPB 92.....	79
Figura 35. Atividade xilanase dos extratos obtidos em CES de macro-basidiomicetos cultivados nos substratos lignocelulolíticos da agroindústria do açaí. Macro-basidiomicetos: FPB 13, FPB 20, FPB 35, FPB 39, FPB 38, FPB 90, FPB 91, FPB 92.....	80
Figura 36. Atividade xilanase dos extratos obtidos em CES de macro-basidiomicetos cultivados nas Formulações da agroindústria do açaí. Formulações: F1 (100%FC), F2 (100%FS), F3 (50%FC e 50%FS), F4 (80%FC e 20%FS) e F5 (20%FC e 80%FS).....	80
Figura 37. Atividade xilanase dos extratos obtidos em CES das Formulações: F1 (100%FC), F2 (100%FS), F3 (50%FC e 50%FS), F4 (80%FC e 20%FS) e F5 (20%FC e 80%FS); em função dos macro-basidiomicetos: FPB 166, FPB 167, FPB 168, FPB 169, FPB 170, FPB 171, FPB 172, FPB 173.....	81
Figura 38. Cocultivo em placas entre macro-basidiomicetos e <i>Trichoderma asperellum</i> BC-2 A70882D em meio BDA e MEA.....	82
Figura 39. Cocultivo em placas entre macro-basidiomicetos e <i>Trichoderma asperellum</i> BC-2 A70882D em meio BDA e MEA.....	83
Figura 40. Cocultivo em placas entre macro-basidiomicetos e <i>Trichoderma asperellum</i> BC-2 A70882D em meio BDA e MEA.....	83
Figura 41. Cocultivo em placas entre macro-basidiomicetos e <i>Trichoderma asperellum</i> BC-2 A70882D em meio BDA e MEA.....	84
Figura 42. Fungos selecionados para o cultivo submerso: A) Macro-basidiomiceto FPB 173; B) <i>Trichoderma asperellum</i> BC-2 A70882D	85
Figura 43. Atividade enzimática da β -glicosidase em cultivo submerso entre o FPB 173 e <i>Trichoderma asperellum</i> BC-2 A70882D nos monocultivos e cocultivos, tem como fonte de carbono, Fibra do Cacho do açaí (FC) e Fibra da Semente do açaí (FS).....	86

Figura 44. Atividade enzimática da lipase em cultivo submerso entre o FPB 173 e *Trichoderma asperellum* BC-2 A70882D nos monocultivos e cocultivos, tem como fonte de carbono, Fibra do Cacho do açai (FC) e Fibra da Semente do açai (FS).....87

Figura 45. Atividade enzimática da xilanase em cultivo submerso entre o FPB 173 e *Trichoderma asperellum* BC-2 A70882D nos monocultivos e cocultivos, tem como fonte de carbono, Fibra do Cacho do açai (FC) e Fibra da Semente do açai (FC).....88

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1. Cadeia produtiva da polpa do açaí incluindo as principais biomassas residuais geradas no beneficiamento do fruto.....	24
Fluxograma 2. Fluxograma de aproveitamento do açaí.....	27
Fluxograma 3. Áreas onde estão sendo realizadas pesquisas para a geração de produtos a partir do caroço do açaí.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
BDA-C	Batata-Dextrose-Ágar com glicose
BDA-S	Batata-Dextrose-Ágar sem glicose
B.O.D	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CMC	Carboximetilcelulose
CES	Cultivo em estado sólido
CS	Cultivo submerso
DNS	Ácido 3,5 – dinitrosalicílico
ϵ	Coefficiente de extinção molar
FC	Fibra do cacho do açaí
FC-C	Fibra do cacho do açaí com glicose
FC-S	Fibra do cacho do açaí sem glicose
FPB	Fungos da podridão-branca
FS	Fibra da semente do açaí
FS-C	Fibra da semente do açaí com glicose
FS-S	Fibra da semente do açaí sem glicose
G	grama
Gss	grama por substrato seco
m/v	Massa/Volume
MEA	Ágar Extrato de Malte
mL	mililitros
Rpm	Rotações por minuto
UI/U	Unidades Internacionais
μ L	microlitros
V	Volume
v/v	Volume /Volume
Vi	Volume inicial
Vf	Volume final
V _{total}	Volume total

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 CULTURA DO AÇAÍ: PRODUTOS E BIOMASSAS RESIDUAIS

A região amazônica é rica em espécies frutíferas com potencial de exploração comercial, como tem ocorrido com o açaí ou açazeiro (*Euterpe precatoria* Mart. e *Euterpe oleracea* Mart.) que possui potencial agrônômico, tecnológico, nutricional e econômico (YUYAMA et al., 2011). O nome açaí é de origem Tupi-Guarani e pode ser traduzido literalmente como “palmeira de água” (MOURÃO., 2011), ou ainda, como “fruta que chora” em referência a forma como a polpa flui durante o processo de extração (VASCONCELOS et al., 2019).

As espécies de açaí estão presentes na América Central e do Sul, por exemplo, ocupando grandes extensões no estuário amazônico (BICHARA e ROGEZ., 2011). As espécies se distinguem principalmente, pela maneira como crescem e pelo tamanho do fruto (YMAGUCHI et al., 2015). No Brasil, a principal região de dispersão de *Euterpe spp.* está no bioma Amazônico, onde o Pará, Amapá e Maranhão possuem as maiores concentrações com predominância da *E. oleracea* Mart. Porém, esta espécie também pode ser encontrada nos estados do Amazonas, Mato Grosso, Acre, Roraima e Tocantins (MOURÃO., 2011).

A *E. precatoria* é nativa do estado do Amazonas, sendo conhecida como “Açaí do Amazonas” (BENTES-GAMA et al., 2005) (Figura 1). As principais características estão na forma de único caule, crescimento em terra firme, sendo mais comumente vista ao sul da Linha do Equador (YUYAMA et al., 2011; YMAGUCHI et al., 2015). Esta espécie tem pouco destaque na produção de frutos, sendo tradicionalmente utilizada na construção civil de ribeirão para partes das casas, poste/cerca e palha para cobertura de telhados (BUSSMAN e ZAMBRANA., 2012).

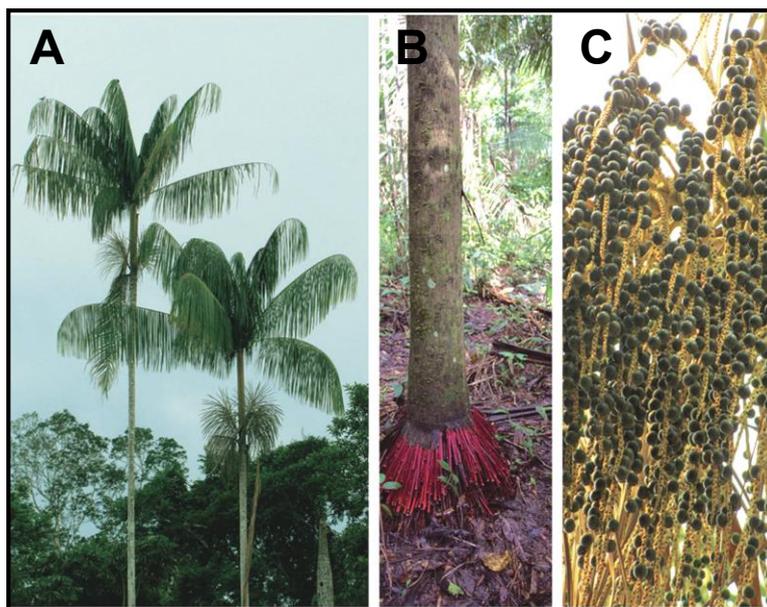


Figura 1. Palmeira de *Euterpe precatoria* (A); Caule (B); Frutos (C). Fonte: Bussman e Zambrana (2012)

A *E. olearcea* Mart é conhecida popularmente como Açai-do-Pará, Açai-do-Baixo Amazonas, Açai-de-Touceira, Açai-de-Planta e Açai-Verdadeiro (OLIVEIRA et al., 2007). A espécie é típica de terrenos de várzea e igapó. Apresenta porte arbóreo típico de floresta, que cresce a partir de uma planta matriz, formando posteriormente touceiras (perfilhamento). Na fase adulta os troncos têm alturas que variam de 3 a 20 m, com diâmetros de 7 a 18 cm (OLIVEIRA, NETO e PENA et al., 2007; MOURÃO, 2011; YUYAMA et al., 2011; YMAGUCHI et al., 2015) (Figura 2A). Os frutos possuem formato globular com um diâmetro de 1-2 cm e um peso de 0,8-2,3 g. Estes por sua vez, ocorrem em cachos e geralmente apresentam cor preto-violeta (Figura 2B e 2C), formados por núcleo (caroço) e polpa. O núcleo tem um endosperma pequeno e sólido, que é anexado ao tegumento (Figura 2D). O pericarpo, descrito como parcialmente fibroso, é rico em sílica e pobre em lipídios e proteínas. Os caroços/sementes ocupam cerca de 80% do fruto. A polpa utilizada para alimentação humana representa entre 5% a 15% do peso da fruta, variando de acordo com a origem e maturidade do fruto (BICHARA e ROGEZ., 2011; MIAO e WU, 2014; COSTA et al., 2017; PALA et al., 2018).



Figura 2. Palmeira de *Euterpe oleracea* (A), Cachos (B), Frutas no cacho (C), Corte transversal das frutas (D).
Fonte: Bichara e Rogez (2011); Bussman e Zambrana (2012).

A importância socioeconômica do açaizeiro, decorre de seu potencial referente ao uso integral da planta, que possui uma ampla variedade de aplicações, e por estar associado à agricultura familiar e agroextrativista (MENDONÇA et al., 2014; MOURÃO, 2011). O açaizeiro tem sido empregado no paisagismo, em construções, na produção de celulose (papel Kraft), na confecção de biojoias, para ração animal, adubo e suas raízes também podem ser usadas para produzir vermífugos (OLIVEIRA, NETO e PENA., 2007; YUYAMA et al., 2011; SOUZA et al., 2011). Entretanto, a principal atividade econômica ligada ao açaí, está centrada na produção de frutos e palmito para o consumo humano, tendo em vista seu benefício para a saúde. Os principais constituintes encontrados em sua matéria seca do fruto são: lipídios (50%), fibras (25%) e proteínas (10%), apresentando abundância de compostos fenólicos e antocianinas, substâncias com elevada capacidade antioxidante e de comprovados efeitos benéficos à saúde (YMAGUCHI et al., 2015).

Os frutos são muito apreciados, sobretudo na região amazônica, podendo ser consumidos na forma de sucos (com ou sem açúcar), ou misturado a outros alimentos como a farinha de mandioca ou tapioca (YUYAMA et al., 2011). Além disso, a polpa tem sido largamente utilizada na produção industrial ou artesanal de alimentos e bebidas, incluindo sucos, sorvetes, geleias, bebidas energéticas, licores, encapsulados (COSTA et al., 2017; MIAO e WU., 2014).

1.1.1 Aspectos produtivos e mercadológicos do açaí

Inicialmente a produção e venda do açaí eram apenas locais, principalmente no Estado do Pará, onde a cultura de consumo é muito forte, tendo assim mercado consumidor já consolidado (ALMEIDA et al., 2017). Nos últimos anos, o mercado do açaí tem se expandido de maneira considerável. A partir da década de 1990, a cultura ganhou espaço no cenário nacional, mas recentemente tem sido comercializado em novos mercados a nível internacional, tornando-se uma importante fonte de emprego e renda para região (BICHARA e ROGEZ., 2011; YAMAGUCHI et al., 2015). Em parte, o sucesso comercial do açaí está ligado às novas tendências alimentares. Recentemente, houve uma demanda mundial cada vez maior por alimentos e bebidas saudáveis e nutricionais, com novos sabores, criando boas oportunidades para frutas tropicais, como o açaí (CONAB., 2018).

Considerado por alguns como uma “superfruta”, o açaí vem ganhando espaço e sendo consumido em todo mundo como um alimento funcional. Há um mercado crescente para os nutracêuticos e suplementos alimentares que contêm açaí na formulação (PORTINHO et al., 2012). Estudos realizados com os frutos têm apresentado resultados interessantes quanto à extração/rendimento em óleos vegetais, com potencial para produção bioprodutos (compostos químicos bioativos), que podem ter alto valor agregado (COSTA et al., 2017).

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE apontou que de 2015 para 2017 houve um aumento na a produção nacional de frutos do açaí de 1,0 milhão de toneladas para 1,1 milhão (IBGE., 2017). O Estado brasileiro com a maior produção registrada nesse período foi o Pará com 98,3 % do total nacional. Nesse estado a produção de frutos do açaí cresce exponencialmente a cada ano, e isto fica evidente quando se compara os dados de produção referentes aos anos de 2003, que foi cerca de 112 mil toneladas do fruto, com os dados obtidos em 2016 que registrou uma quantidade produzida de 1.092.205 toneladas (IBGE., 2003-2016). A importância comercial dessa cultura tem trazido diversas vantagens econômicas para regiões produtoras.

Outra fonte de dados afirma que no ano de 2017, a produção de açaí no país foi 1,3 milhão de toneladas e, novamente, o maior produtor foi o Estado do Pará. Neste mesmo ano, o Estado do Pará comercializou mais de 593,8 milhões de reais em produtos decorrentes do beneficiamento do açaí, destinados tanto ao mercado nacional, como ao mercado internacional (SEFA-PA, 2017).

No contexto internacional, as previsões indicam um incremento substancial na demanda por açaí até o ano de 2026, incentivada principalmente pela produção de cosméticos

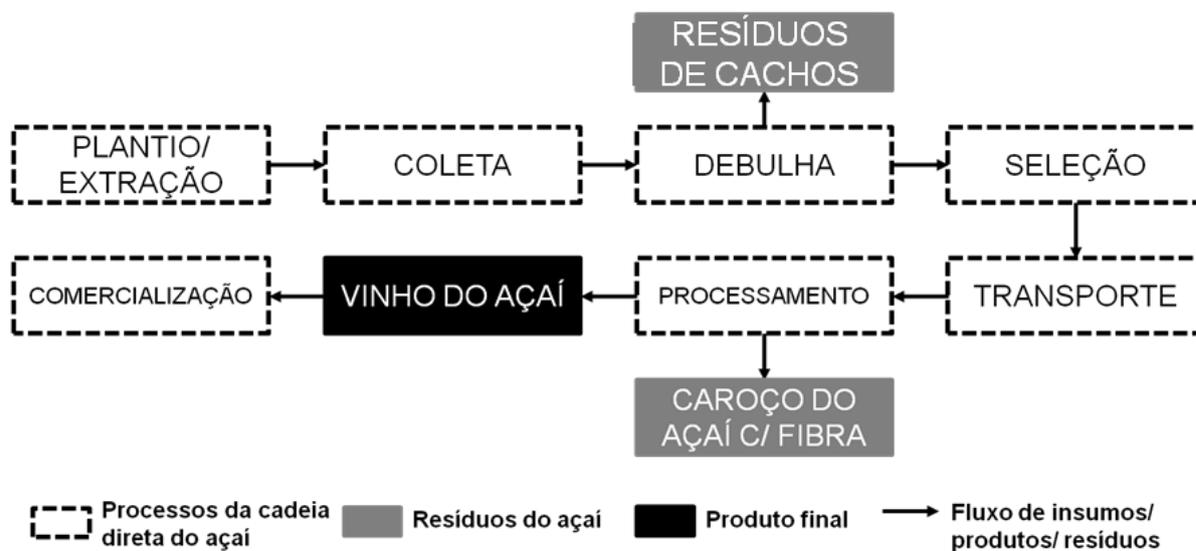
a base de ingredientes naturais (IBGE, 2017). De acordo com o relatório "Açaí Berry Market: Global Industry Analysis and Opportunity Assessment, 2016-2026", em 2016, mais de 300.000 toneladas de produtos à base de polpa de açaí foram comercializados em todo o mundo (FMI, 2017). O *Future Market Insights* também prevê um aumento impressionante no consumo global de produtos de polpa de açaí e espera que as vendas globais superem 1 milhão de toneladas até o final de 2026

1.2 CADEIA PRODUTIVA DO AÇAÍ

A extração da polpa de açaí ainda é a principal finalidade da utilização do açazeiro, embora nos últimos anos tenham surgido muitas alternativas de uso para a cultura (NOGUEIRA et al., 2005). Deste modo, a cadeia produtiva do açaí esta composta por plantio, extração e processamento dos frutos e comercialização do chamado “vinho” ou polpa (EMBRAPA., 2006). Uma visão geral de todo o processo de geração da polpa está descrito no Fluxograma 1. Aspectos referentes ao plantio não serão abordados, uma vez que o foco deste estudo está relacionado à geração de potenciais produtos a partir dos resíduos da colheita e processamento da polpa.

O processo de extração compreende etapas desde a colheita até a pós-colheita dos frutos. Normalmente, o açazeiro começa a produção de frutos quatro anos após o plantio. Durante a colheita é realizada a escalada dos estirpes/troncos que podem alcançar facilmente de 10 a 15 metros de altura, existindo o perigo de quebra e tombamento dos mesmos (NOGUEIRA et al., 2005). Em vista disso, essa é uma etapa onerosa e difícil, que tradicionalmente é feita de maneira manual por coletores, que escalam troncos com o auxílio de uma ¹peconha, fazendo o corte do cacho e colocação deste no solo (ALMEIDA et al., 2017; SUFRAMA., 2003).

¹ Laço feito de corda, cipós, pano, ou da própria palha dos açazeiros que é colocada nos pés dos escaldadores com a finalidade de facilitar o acesso aos cachos (HOMMA et al., 2006).



Fluxograma 1. Cadeia produtiva da polpa do açaí incluindo as principais biomassas residuais geradas no beneficiamento do fruto. Fonte: Adaptado de Almeida et al. (2017).

Os procedimentos pós-colheita são realizados ainda no açazal, que inclui a debulha dos cachos, a seleção visual de frutos sadios e maduros, o acondicionamento e o transporte para os locais de processamento (ALMEIDA et al., 2017; NOGUEIRA et al., 2005). Essas etapas devem ser realizadas o mais rápido possível, tendo em vista que os frutos do açazeiro são altamente perecíveis (MOURÃO., 2011). A demora nos procedimentos pós-colheita podem comprometer a qualidade do açaí, levando a perda de água, aroma e variações nas propriedades nutricionais (BICHARA e ROGEZ., 2011). Na impossibilidade do transporte imediato até as unidades de processamento, os frutos devem ser acondicionados em cestos feitos de fibras vegetais, ou ainda em caixas plásticas com aeração, tendo o cuidado para não tocar o solo e protegido dos raios solares. O material é levado a um local de armazenamento que seja exclusivo para a estocagem do açaí, a fim de evitar possíveis contaminações. A preservação dos frutos pode ser prolongada mantendo-os em ambiente refrigerado (em torno de 10 °C). Entretanto, o despulpamento deve ocorrer no tempo máximo de 24 horas após a colheita, quando os frutos são estocados em temperatura ambiente (NOGUEIRA et al., 2005).

Nas unidades de processamento os frutos são recebidos e avaliados quanto as características de tamanho, maturidade e tempo de coleta. Em seguida são lavados, imersos em água a temperatura ambiente ou aquecida (40 a 60 °C), dependendo do grau de maturidade dos frutos, para o amolecimento do epicarpo e do mesocarpo. Na sequência os frutos são lavados em água clorada e segue-se uma nova etapa de lavagem para a retirada do excesso de cloro. Ao final dessas etapas, os frutos são levados à despulpadeiras (SUFRAMA., 2003). O despulpamento depende da finalidade do produto, que pode ser para consumo imediato ou

passar por processos subsequentes para conservação e posterior comercialização. Este processo pode ser manual ou mecanizado (despolpadeiras) (ALMEIDA et al., 2017).

De acordo com Nogueira et al. (2005) o uso de despolpadeiras pode ser classificado em tradicional (semi-industrial) e industrial. O primeiro tipo é feito normalmente em pequena escala e utiliza um cilindro vertical contendo varetas horizontais e uma peneira na parte inferior, conhecidas popularmente como bateadeiras. Os frutos são inseridos através da abertura superior, adicionando lentamente água. Ao final do processo, forma-se uma emulsão que desce por gravidade passando por uma peneira para ser coletado na saída do funil (Figura 3) (PESSOA et al., 2010).



Figura 3. Despolpadeira tradicional (semi-industrial) para frutos de açai. Fonte: Autora (2018)

No segundo tipo, processo industrial, faz-se uso de despolpadeiras horizontais, compostas por um cilindro de aço inoxidável, onde acontecem etapas de refino e homogeneização. A polpa extraída do açai pode ser imediatamente embalada e congelada ou passar por tratamento térmico, esterilização – para evitar possíveis contaminantes. O crescimento do mercado de polpa do açai tem induzido a implantação de plantas-industriais, visando atender aos mercados interno e externo. Com isso, o processo de industrialização favorece uma maior higiene e qualidade do produto final (HOMMA et al., 2006).

Muitos desafios ainda precisam ser superados para tornar a cadeia de produção do açai mais eficiente, tanto do ponto de vista de plantio e manejo, quanto na parte de beneficiamento e processamento dos frutos. Alguns processos ao longo da cadeia de produção podem ser otimizados com adoção de novas tecnologias e com melhoria da gestão dos

resíduos gerados. Conforme afirmam Farinas et al. (2012) o desenvolvimento da cadeia produtiva do açaí também depende da correta destinação de todos os resíduos gerados, reduzindo-se ao máximo o impacto ambiental. Assim, as biomassas residuais desta cadeia produtiva, que vão desde cachos no campo até as polpas do processamento, podem ser passíveis de valoração econômica, gerando novos produtos de valor agregado.

1.3 A PROBLEMÁTICA DAS BIOMASSAS RESIDUAIS DO AÇAÍ E POTENCIAIS APLICAÇÕES PARA GERAÇÃO DE NOVOS PRODUTOS

A agroindústria do açaí produz grande quantidade de biomassas residuais, tanto na exploração do palmito, quanto na exploração dos frutos (TEIXEIRA et al., 2015). Esses resíduos, sobretudo, aqueles provenientes da produção de polpas, vem se tornando um problema socioambiental, em função de serem despejados em ambientes não apropriados. No entanto, tais biomassas residuais podem ser uma grande oportunidade para geração de benefícios sustentáveis, com potenciais ganhos ambientais, sociais e econômicos (SILVA-DIAS., 2017).

Na extração do palmito, um dos subprodutos gerados é a chamada capa de palmito, que correspondem às partes vegetais que recobrem o palmito e que podem ser destinadas, por exemplo, para a produção de adubo orgânico (TEIXEIRA et al., 2015). Durante a coleta dos frutos para a extração da polpa, após a debulha, os resíduos dos cachos geralmente são deixados no local de coleta sem nenhuma destinação específica (NOGUEIRA et al., 2005).

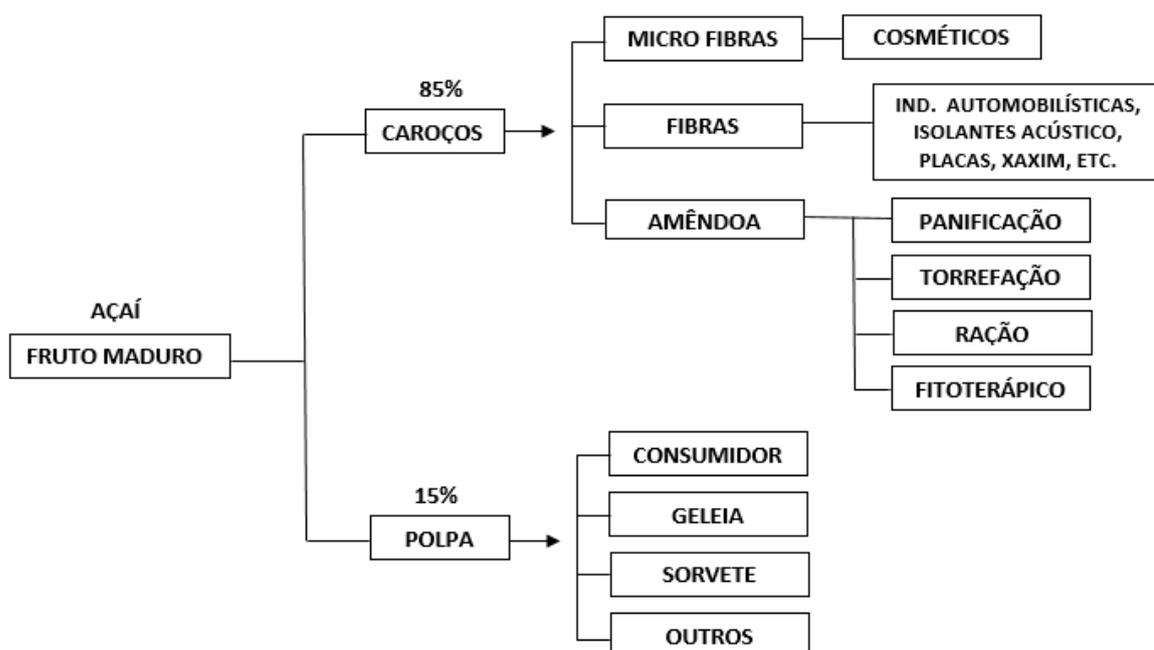
Na produção da polpa, o principal resíduo gerado é o caroço. Este resíduo é uma semente oleaginosa, formada por um pequeno endosperma sólido ligado a um tegumento rico em celulose (FARINAS et al., 2012). Segundo a Política Nacional de Resíduos Sólidos – PNRS², os caroços de açaí, são um tipo de resíduo classificado quanto à origem, como resíduo de estabelecimentos comerciais (PNRS, art. 13, I, d). De acordo com Mesquita et al. (2018), somente na região metropolitana de Belém-PA, tem gerado em torno de 93 mil toneladas/ano caroço de açaí, e por vezes alcançado 1.200 toneladas diárias. Em toda a região amazônica o valor estimado da deposição desses resíduos tem sido mais 1.000.000 de toneladas anuais (IBGE., 2016), gerando assim, a necessidade de discussões e medidas sobre como otimizar estas biomassas residuais e produtos de valor agregado.

² Foi promulgada pela Lei N° 12.305/10 para instituir governança sobre a gestão dos Resíduos Sólidos (RS) e racionalizar o uso das matérias-primas, reinserindo-as ao ciclo produtivo, maximizando seu aproveitamento e promovendo o desenvolvimento sustentável (BRASIL., 2010).

Em regiões como Pará, cuja produção acentuada dos açazeiros se dá localmente, uma parte dos frutos tem sido processada em pequenos batedores (beneficiadoras) artesanais, distribuídos ao longo da cidade. De acordo com Almeida et al. (2017), após o processamento, as beneficiadoras separam os caroços, que posteriormente, são lavados, ensacados e dispostos em frente ao local de venda para que sejam recolhidos pelo serviço de limpeza pública ou empresa terceirizada. O caroço do açaí, como resíduo sólido urbano (RSU), legalmente deve ser destinado ao aterro para ser incinerado. Entretanto, nem sempre isso acontece, levando a um acúmulo desses resíduos, que tem causado problemas relacionados a poluição ou exaustão dos locais de disposição final (aterros sanitários) (SILVA-DIAS., 2017; MENEZES et al., 2018).

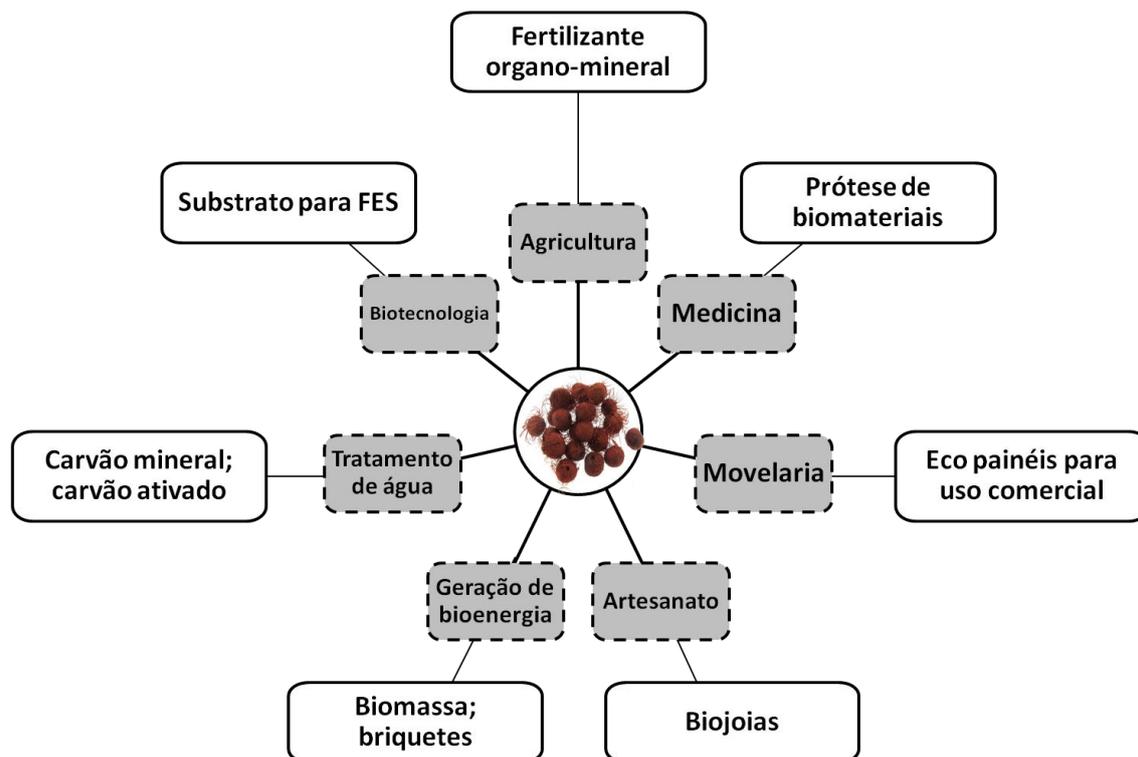
Na produção industrial da polpa, os caroços podem ser reaproveitados ainda durante o beneficiamento dos frutos, como combustível para alimentar caldeira, que gera energia na forma de eletricidade ou calor (OLIVEIRA., 2007). Por outro lado, também há situações industriais de descarte, como rejeitos orgânicos, tendo como destino final os lixões e/ ou corpos d'água (MESQUITA et al., 2018).

Em virtude de sua composição química centesimal, o caroço pode ser uma fonte de fibras, contendo celulose (53%), hemicelulose (12%) e lignina (22%) (RODRIGUES et al., 2006), além de lipídios e proteína, como também antocianina, minerais, vitamina C e Complexo B. Deste modo, as biomassas residuais do processamento do fruto podem se tornar potenciais insumos em diversas indústrias (ALMEIDA et al., 2017, LIMA et al., 2017), tais como os exemplificados no Fluxograma 2 (SILVA-DIAS., 2017).



Fluxograma 2. Fluxograma de aproveitamento do açaí. Fonte: Silva-Dias (2017).

As biomassas residuais dos frutos do açaí têm sido estudadas em processos biotecnológicos para agregação de valor na geração de bioprodutos. Simas (2008) relataram resultados experimentais com o uso da amêndoa de açaí para extração de manose. Também há relatos experimentais para produção de enzimas por fermentação em estado sólido (FES) (FARINAS et al., 2009a e 2012) e também como substrato para a produção de cogumelos comestíveis (FONSECA et al., 2014a e 2015b). Almeida et al. (2017), realizaram um estudo propondo o desenvolvimento de um canal para a revalorização do caroço do açaí em diferentes tipos de atividades. Neste estudo, os autores apontam diversas áreas onde estão sendo realizadas pesquisas utilizando o caroço do açaí residual para a obtenção de potenciais produtos (Fluxograma 3).



Fluxograma 3. Áreas onde estão sendo realizadas pesquisas para a geração de produtos a partir do caroço do açaí. Legenda: FES (Fermentação Estado Sólido). Fonte: Esquema desenvolvido pela autora com base nos dados disponibilizados por Almeida et al. (2017).

Além de proporcionar retorno econômico por meio da comercialização dos resíduos, a aplicação nas diferentes áreas não exige nenhum beneficiamento prévio por parte da agroindústria, desta maneira os caroços podem ser comercializados da forma que saem do processamento. A multiplicidade de aplicações aos resíduos de açaí, em especial o caroço e as fibras, revelam tanto o seu potencial como a necessidade de se estruturar sistemas efetivos,

que possam maximizar seu uso e minimizar sua disposição em locais inadequados (ALMEIDA et al., 2017).

1.3.1 Substrato para a produção de cogumelos comestíveis

O cultivo de cogumelos em resíduos agroindustriais tem se revelado como uma alternativa viável de aproveitamento de materiais lignocelulósicos e sua conversão em produtos de elevado valor agregado (cogumelos comestíveis) e com alto teor nutricional (FONSECA et al., 2015b; SALES-CAMPOS et al., 2013).

Alguns fatores como temperatura, compostos carbono e nitrogênio, disponibilidade de nutrientes, potencial genético e fontes de meios de cultura (substratos) podem interferir no cultivo de cogumelos comestíveis (HOA e WANG., 2015). Por esta razão, a escolha dos resíduos agroindustriais na formulação de substrato pode conferir uma maior produtividade em relação a outros. Tais biomassas vegetais residuais podem ser utilizadas de forma individual ou em diferentes combinações.

As características bromatológicas do caroço de açaí são favoráveis a formulação de substratos para o cultivo de cogumelos comestíveis (Tabela 1). Fonseca et al. (2014a e 2015b) apresentaram resultados para cultivo de cogumelos comestíveis fazendo uso de diferentes resíduos agroindustriais da região norte, incluindo o caroço de açaí. Este por sua vez apresentou crescimento micelial significativo do fungo *Pleurotus ostreatus*, sendo também um substrato viável para o cultivo das espécies *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes*.

Tabela 1. Composição química de biomassas lignocelulósicas, incluindo o caroço de açaí.

Biomassa lignocelulósica	% Celulose	% Hemicelulose	% Lignina
Caroço de açaí**	53-54	12-13	23-24
Palha de cana*	40-44	30-32	22-25
Bagaço de cana*	32-48	19-24	23-22
Farelo de milho*	10-11	23-24	4-5
Madeira dura*	43-44	25-35	16-24
Madeira mole*	40-44	25-29	25-31

Fonte: (*Santos et al., 2012; **Rodrigues et al., 2006).

1.3.1.1 Composição química das fibras lignocelulósicas

A composição química das fibras lignocelulósicas, se baseiam em um alto teor de celulose e são compostas por microfibrilas, envolvidas por uma matriz amorfa denominada hemicelulose e uma porção rígida chamada de lignina (Figura 4). A função da matriz é proteger a celulose da agressão de microrganismos/enzimas, desta maneira a estrutura vegetal possui mais rigidez (recalcitrância) e pouca reatividade (SANTOS et al., 2012). Os teores encontrados na matriz podem variar de acordo a espécie ou parte da planta em analisada, porém, em média são encontrados 40-50% de celulose, 20-30% de hemicelulose e 20-28% de lignina.

A estrutura celular das paredes dos vegetais é composta por duas camadas complexas: parede primária fina (P) e parede secundária (S1, S2 e S3). A parede primária é formada durante o crescimento do vegetal e recobre a parede secundária, esta é formado por três camadas: parede secundária externa S1, parede secundária média S2 e parede secundária interna S3. A camada S2 possui maior rigidez e desenvolve maior propriedade mecânica sobre fibra do vegetal, e consiste de microfibrilas em uma cadeia longa de celulose (CARVALHO et al., 2009; SILVA et al., 2009).

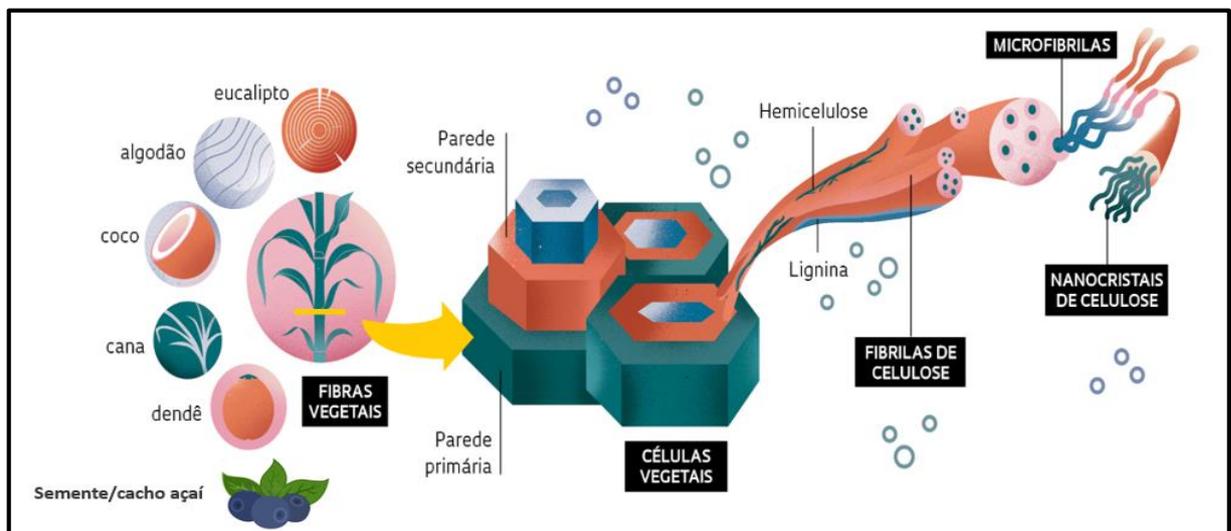


Figura 4. Matéria-prima extraída do interior das plantas. Fonte: Adaptado de Sorrentino (2017).

1.3.1.1.1 Celulose

O principal componente estrutural das “fibras” lignocelulósicas é a celulose, que fornece força e estabilidade para as paredes celulares. É considerado o componente mais

abundante na parede celular vegetal, tratando-se de um polímero linear composto por ligações β -1,4-glicosídicas. A tendência da celulose em formar cristais, adquirindo insolubilidade a alguns solventes orgânicos e a água, é devido a presença de ligações de hidrogênio intermolecular e intramolecular (ARANTES e SADDLER., 2010; AGUIAR e FERRAZ., 2011).

1.3.1.1.2 *Hemicelulose*

As hemiceluloses são polissacarídeos heterogêneos capazes de formar ligações cruzadas, através de ponte de hidrogênio ou formando ligações covalentes com as microfibrilas de celulose, formando uma estrutura complexa entre os dois polissacarídeos. Esta interação, entre hemiceluloses e celulose, auxilia na montagem, complexidade e estabilidade da parede celular do vegetal (AGUIAR et al., 2011; NETO et al., 2012).

Os diferentes tipos de hemicelulose presentes na parede celular variam entre os distintos tipos de células e entre distintas espécies vegetais; que podem depender do açúcar presente e distribuição na estrutura do polímero, como: xiloglucanas, xilanas, mananas, glucomananas e β -(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4)-glucanas (SCHELLER e ULVSKOV, 2010). Dentre as diversas funções da hemiceluloses, estão a reserva de carbono, mecanismo de defesa da planta, sustentação e transporte de nutrientes e água nas plantas (BUCKERIDGE et al., 2008).

1.3.1.1.3 *Lignina*

A lignina é o segundo componente mais abundante presente nos vegetais, com complexas biomacromoléculas e considerável dificuldade de isolamento em sua forma natural. Possui uma estrutura tridimensional polifenólica, altamente ramificada, formada por várias unidades de fenilpropano (álcool coferílico, álcool *p*-cumarílico e álcool sinápílico) disseminadas de forma irregular. O aumento da rigidez da parede celular é determinada pela lignina, atuando como agente fixador entre as células. É considerada uma estrutura amorfa, com alto peso molecular e possui comportamento hidrofóbico, o que auxilia na diminuição da permeabilidade da parede celular. A lignina também é responsável por proteger a célula de microrganismos e pela resistência suportada pela planta, o que define seu crescimento e desenvolvimento (MONTEIRO, PEREIRA e ABREU., 2012; SANTOS et al., 2012).

1.4 ENZIMAS DE MACRO-BASIDIOMICETOS SELVAGENS: APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

Os fungos selvagens ou silvestres, além de serem utilizados para alimentação, apresentam diversas aplicações pelo seu potencial biotecnológico, por exemplo: a produção de metabólitos secundários com potencial farmacológico, a produção de enzimas utilizadas em diversos processos industriais, sua utilização como fatores de crescimento para plantas, biorremediação e biodestoxificação (HASIN, SELDIN e LUSIS., 2017). O interessante da utilização destes fungos está relacionado com o seu potencial de produção utilizando substratos residuais vegetais, posto que os mesmos são de hábito saprofítico, coletado em troncos mortos em florestas (Figura 5) (CONCEIÇÃO et al., 2018).

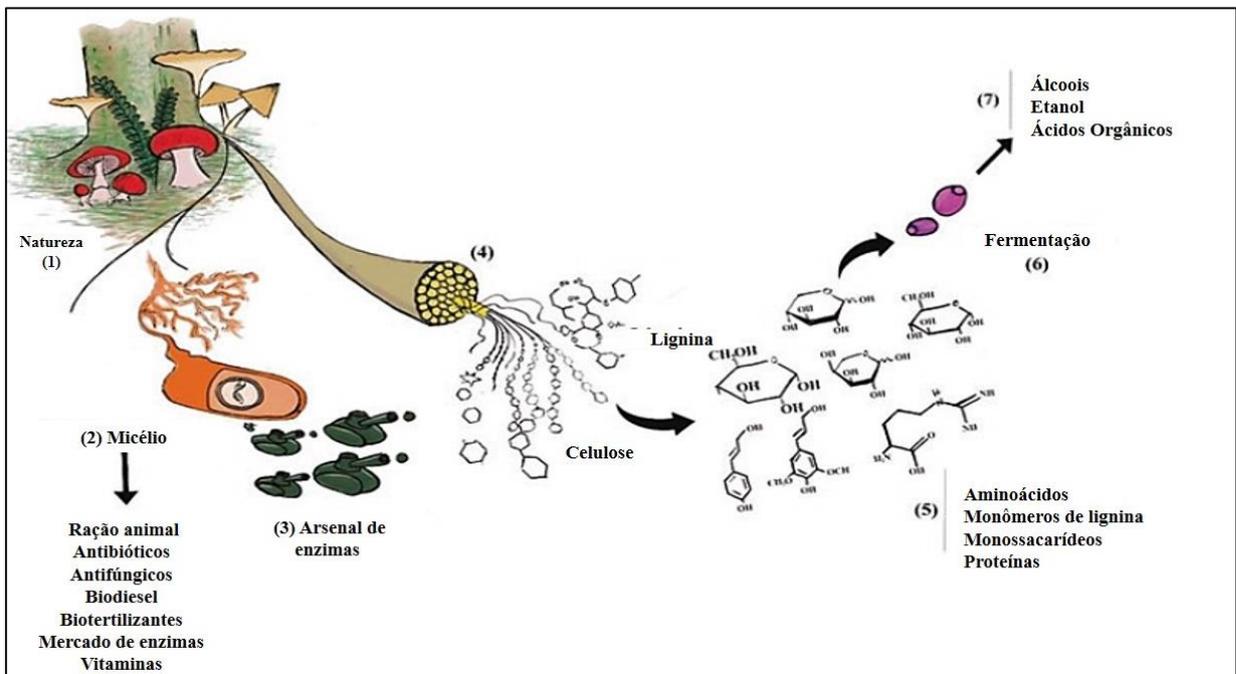


Figura 5. Processo de biodegradação por macro-basidiomicetos selvagens na obtenção de valiosos subprodutos. Legenda: (1) Os macro-basidiomicetos selvagens são degradadores naturais responsáveis pela decomposição da madeira. (2) Os macro-basidiomicetos silvestres são capazes de biotransformar os nutrientes da madeira morta em importantes moléculas bioativas para atividades humanas. (3) Excelentes produtores de complexo enzimático desconstrutores de parede celular vegetal. (4) Possui grande potencial para a biodegradação dos complexos componentes da parede celular da planta, lignina, celulose e hemicelulose. (5) Transformando-os em oligômeros e monômeros. (6) Os monômeros de açúcar podem ser empregados no processo de fermentação (7) para a produção de outras substâncias como: etanol, ácidos orgânicos, entre outras. Fonte: Conceição et al. (2018).

Muitos estudos tem sido realizados com macro-basidiomicetos, pois eles demonstraram ser uma fonte importante de moléculas e alimentos com grande valor nutricional. Entretanto, apenas uma pequena porcentagem de espécies de macro-basidiomicetos são conhecidas, em comparação com a sua extensão real na natureza. Os

macro-basidiomicetos selvagens podem ser uma excelente fonte de alimentos nutritivos e uma fonte de melhores moléculas bioativas, ou espécies que podem ser usadas como biodegradadores e biotransformadores de diversos tipos de substâncias (HASIN, SELDIN e LUSIS., 2017).

Os macro-basidiomicetos são importantes agentes responsáveis pela mineralização e são especializados no processo de desconstrução de estruturas complexas do vegetal, como por exemplo, a lignina. Tais fungos com a capacidade de produzir diferentes enzimas, podem degradar eficientemente uma ampla gama de substâncias. Estudos científicos mostraram que esses organismos produzem enzimas e metabólitos que podem ser aplicados em alimentos, medicamentos, indústria têxteis, papel e matéria-prima (CHEN e CHIU., 2005).

Os fungos que englobam o grupo dos macro-basidiomicetos são capazes de se adaptarem em diversas condições, e como meio de sobrevivência esses microrganismos produzem enzimas e/ou metabólitos secundários que os auxiliam na obtenção de nutrientes e a sobreviver em ambiente de estresse. Como meio de cultivo são utilizadas diversas técnicas, entre elas a cultivo em estado sólido (CES) e cultivo submerso (CS) com biomassas lignocelulolíticas para obtenção de complexo enzimático. O método da CES ou FES (“fermentação” estado sólido) consiste no crescimento de microrganismos em superfícies de materiais sólidos, com propriedade de absorção de água suficiente para manter o crescimento dos microrganismos (RAHARDJO et al., 2006; LIMA et al., 2017). Enquanto o CS faz-se uso de meios de cultura líquidos enriquecidos com nutrientes solúveis na presença de biomassas lignocelulolíticas, por exemplo. Assim, o uso de resíduos da indústria do açaí como substrato para o processo de CES e CS em conjunto com macro-basidiomicetos, mostra-se promissor em virtude a sua composição química e baixo custo de aquisição (FARINAS et al., 2012b), caso sejam utilizados nas proximidades da geração de tais coprodutos.

A capacidade dos fungos macro-basidiomicetos e ascomicetos de se desenvolverem aos mais variados meios e condições, proporcionando e/ou aumentando a produção de substâncias de interesse industrial, como enzimas e metabólitos, possibilita a utilização de técnicas para otimizar o máximo a produção dessas substâncias. Assim, estudos tem demonstrado que associações simbióticas melhoram a colonização dos substratos pelos microrganismos em cultivos no estado sólido, podendo aumentar o rendimento da produção de celulase (DUENAS, TENDERDY e GUTIERREZ-CORREA., 1995). Culturas mistas (cocultivo) de fungos filamentosos, podem levar a uma produção superior de enzimas com pouco aumento da biomassa celular, comparado com os cultivos controles, indicando que as interações sinérgicas não foram diretamente relacionadas ao aumento do crescimento em

biomassa, mas foram responsáveis para o aumento da produção de enzimas (GUTIERREZ-CORREA et al., 1999).

A cultura mista (cocultivo) pode ser realizada entre diferentes organismos, como: organismos de diferentes reinos, por exemplo entre fungos e bactérias (*Aspergillus fumigatus* e *Streptomyces leeuwenhoekii*) (WAKEFIELD et al., 2017); diferentes gêneros (*Trichophyton rubrum* e *Bionectria ochroleuca*) (BERTRAND et al., 2013a), ou em diferentes espécies (*Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*) (HU et al., 2011). A obtenção de novos metabólitos secundários com atividade biológica é um dos principais objetivos desta técnica (BERTRAND et al., 2014b). Em busca do aumento da produção de substâncias de interesse industrial como enzimas e fármacos, o cocultivo tem sido proposto (CUPUL et al., 2014; NONAKA et al., 2011).

1.5 ENZIMAS CELULOLÍTICAS MICROBIANAS E APLICAÇÕES EM BIOMASSAS ALIMENTARES

O material residual vegetal lignocelulolítico possui características recalcitrantes, ou seja, há resistência quanto ao sua desconstrução. A recalcitrância da parede celular vegetal é relacionada, principalmente, a presença da lignina. Os fungos, para terem acesso aos carboidratos solúveis (monômeros de açúcares) presente nas biomassas vegetais, utilizam-se de mecanismos que quebram a recalcitrância e os complexos polissacarídeos de celulose e hemicelulose através de enzimas extracelulares (DASHTBAN et al., 2010).

Durante o seu desenvolvimento no material vegetal, os macro-basidiomicetos reconhecem seu ambiente e podem adaptar-se às condições atuais, excretando substâncias que ajudam a modular uma condição propícia para sua sobrevivência (ROSSI, 2013). Durante este processo, as enzimas catalisam a liberação de pequenas porções das macromoléculas complexas presentes na parede celular da planta (SU et al., 2018).

Diversos fungos filamentosos, como *Aspergillus spp.*, *Trichoderma spp.*, produzem dois grupos principais de enzimas, que são importantes para a degradação das paredes celulares dos vegetais: enzimas hidrolíticas ou holocelulolíticas (celulases e hemicelulases) e as enzimas oxidativas, que incluem as peroxidases (lignina e peroxidase de manganês) e lacases. Estas enzimas são capazes de oxidar moléculas menores (por exemplo, ácidos orgânicos), e formam intermediários instáveis, ao decompor a matriz de lignina quando estão em contato com os componentes fenólicos e amino-aromáticos da lignina. A remodelagem da estrutura complexa da lignina é um dos processos cruciais para reduzir a recalcitrância das

paredes celulares vegetais, que possibilita o acesso de outras classes de enzimas específicas para a degradação dos carboidratos (TIAN, FANG e GUO., 2012).

1.5.1 Holocelulases

Os microrganismos com capacidade de degradar celulose e hemicelulose são produtores de um complexo enzimático chamado de holocelulases, que é especializado e age em conjunto - sinergismo (BÉGUIN e HUBERT., 1994). As celulasas são um conjunto de enzimas capazes de decompor celulose, assim como hemicelulasas são capazes de desconstruir hemicelulose.

1.5.1.1 Celulasas

As enzimas celulolíticas possuem uma intensa aplicabilidade na indústria, cujo seus maiores potenciais de aplicação são em alimentos, ração animal, indústria química e indústria têxtil. Possuem outras áreas de aplicação, como na indústria de polpa e papel, indústria farmacêutica, gerenciamento de resíduos, engenharia genética e tratamento da poluição (BHAT e BHAT., 1997).

Na maioria dos estudos bioquímicos sobre a decomposição de celulose, é utilizado o complexo enzimático de fungos filamentosos, como *Trichoderma reesei*, no qual a hidrólise da celulose ocorre em conjunto e sinergismo na atuação de três enzimas. A desconstrução inicia pela atuação da enzima endo-1,4- β -glicanases que rompe seletivamente as ligações β -1,4-glicosídica internas da celulose, principalmente em regiões amorfas, formando fragmentos redutores e não redutores que serão hidrolisados pelas exo-1,4- β -glicanases (CBHI e II), também denominadas celobiohidrolases (CBH), formando fragmentos de celobiose, que são degradados pelas β -glicosidases à glicose (Figura 6) (OGEDA e PETRI., 2010).

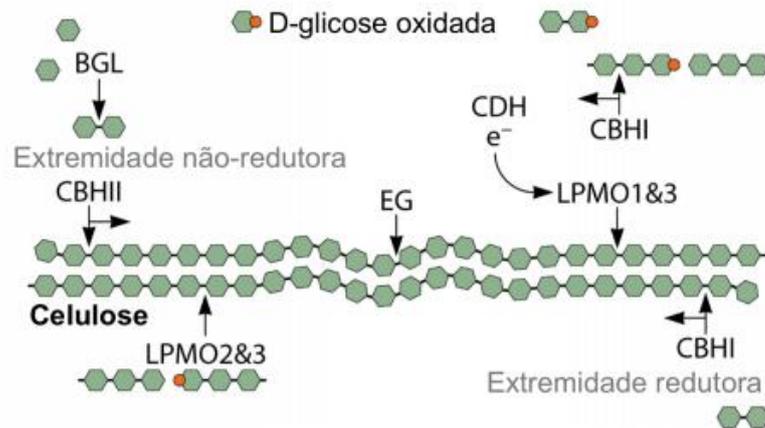


Figura 6. Esquema de degradação da celulose a partir da ação das enzimas endo-1,4- β -D-glucanase (EG), celobiohidrolases (CBHI e CBHII), 1,4- β -Dglucosidase (BGL), celobiose desidrogenase (CDH) e monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMO1, 2 e 3). Fonte: RYTIOJA et al., 2014.

As β -glicosidases possuem a capacidade de romper outros oligossacarídeos a glicose, e liberam diferentes monômeros, como a galactose, a xilose e a manose, pois a xilana e a galactomanana são constituintes da hemicelulose (RYTIOJA et al., 2014).

1.5.1.2 Hemicelulases

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo ramificado de difícil desestabilidade, e para sua desconstrução é necessário um arsenal enzimático mais complexo. Dentre as variedades de enzimas hemicelulolíticas, podem ser citadas: as xilanases (β -1,4-endoxilanase e β -1,4-xilosidase), que são enzimas principais, com ação na degradação da xilana. As β -1,4-endoxilanase hidrolisam as ligações do tipo β -1,4 da cadeia da xilana produzindo oligossacarídeos, os quais são convertidos em xilose pela β -1,4-xilosidase. Xiloglucanase e β -glicosidases para decomposição das xiloglucanas (SOUZA., 2013).

As xilanase possuem um grande potencial na clarificação de sucos e vinhos, extração de óleos vegetais, amido, e também atuam melhorando as texturas de produtos de panificação e na conservação das propriedades nutricionais de grãos armazenados (RYTIOJA et al., 2014).

1.5.2 Ligninases

Os macro-basidiomicetos silvestres são verdadeiras máquinas enzimáticas. Estes fungos têm a capacidade de usar diferentes fontes de carbono-nitrogênio para se desenvolver,

onde várias biomassas podem ser usadas para cultivar esses fungos, que possuem ação oxidante para degradar o material lignocelulolítico para sua sobrevivência. As enzimas lignolíticas que agem diretamente ou indiretamente sobre a estrutura da lignina são denominadas ligninases: lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase (HOFRICHTER., 2002).

1.5.2.1 Peroxidases (Ligninas Peroxidases – LiPs e Manganês Peroxidases - MnPs)

Entre as peroxidases de origem fúngica, estão a lignina peroxidase (LiP) e a manganês peroxidase (MnP). São heme-peroxidases, que requerem a presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e íons manganês (Mn II). São descritas principalmente na degradação de compostos tóxicos por fungos da podridão branca (FPB) ou macro-basidiomicetos. Os fungos selvagens como *Trametes versicolor* e *Phlebiopsis sp.* foram relatados como potencialmente úteis para a degradação da lignina devido às suas atividades oxidativas. Estas enzimas possuem um grande potencial na indústria de papel (DAMIÁN-ROBLES et al., 2017).

Manganês Peroxidases (MnPs) são constituídas por glicoproteínas monoméricas de aproximadamente 50-60 kDa. Sua produção é advinda do metabolismo secundário e são controladas pelas níveis de carbono e nitrogênio. As enzimas MnPs são sintetizadas pelos macro-basidiomicetos e a sua propriedade estrutural, em sua maioria, é semelhante as LiPs (GLEN e GOLD., 1985).

O alto potencial degradativo da MnP faz desta enzima um atrativo na desconstrução e branqueamento de celulose. O sistema enzimático extracelular lignolítico de macro-basidiomicetos é bem conhecido e capaz de degradar xenobióticos tóxicos (BUGG et al., 2011; PAYNE et al., 2015).

1.5.2.2 Lacases

A utilização das enzimas dos macro-basidiomicetos ultrapassa a capacidade de degradar o material lignocelulolítico, pois as enzimas fúngicas são fundamental nas atividades industriais. As lacases são enzimas extracelulares que usam o cobre como cofator e o oxigênio molecular como co-substrato. Estas enzimas são capazes de oxidar a maioria dos compostos fenólicos e não-fenólicos produzidos durante a degradação de pesticidas, e sua atividade tem sido observada 20 vezes maior em fungos pertencentes à subdivisão Basidiomycotina, como *Trametes versicolor*, do que em outros organismos (MARGOT et al., 2013). A natureza não

específica de sua atividade, possibilita o seu uso em uma variedade de substratos e os torna catalisadores ideais para o metabolismo de uma variedade de inseticidas (DONOSO et al., 2008). Na presença de moléculas que atuam como mediadores da transferência de elétrons, as lacases são capazes de oxidar muitos compostos, e alguns desses mediadores são produzidos durante a atividade metabólica normal dos macro-basidiomicetos (ASGHER et al., 2008; ATALLA et al., 2013)

1.6 ENZIMAS: BENEFICIAMENTO DE POLPA DE AÇAÍ

Os frutos de açaí são formado por carboidratos ou “fibras” alimentares insolúveis, que consistem principalmente de substâncias de celulose, hemiceluloses e pectícas. A polpa de açaí é considerada um alimento de alto teor nutricional, apresentando grande quantidade de lipídios (principalmente ácidos graxos insaturados), proteínas e sais minerais. A indústria alimentícia possui um grande problema no processamento de suco industrializado pela liberação de pectina no suco. A pectina é um polissacarídeo estrutural heterogêneo presente nas paredes celulares do mesocarpo, responsável por até 4% do peso total de frutas frescas e até 35% da parede celular. Este carboidrato complexo composto de moléculas de ácido pectíco é conhecido por ser responsável por dar características indesejáveis aos sucos, como alta viscosidade (MACHADO et al., 2012).

A aplicação de enzimas em processos industriais tem sido de grande impacto econômico, pois pode diminuir ou eliminar a utilização de temperaturas elevadas, valor de pH fora do padrão, solventes orgânicos e, concomitantemente, oferecer alta especificidade ao substrato, baixa toxicidade e pureza do produto (SANCHEZ e DEMAIN., 2016). Uma problemática encontrada está no processo de clarificação dos sucos através da membrana pela microfiltração de fluxo cruzado. Uma alternativa aos processos convencionais é afetado negativamente por sua natureza fibrosa, e suas quantidades podem variar de 44% a 71% do peso seco (BOROVIK., 2010; RUFINO et al., 2011). Para otimizar esse processo são utilizadas diversas enzimas para o beneficiamento dos produtos alimentares.

Uma delas é a aplicação das enzimas pectinolíticas utilizadas no processamento de frutos industriais para melhorar a extração de suco. Estas enzimas causam degradação da matriz da parede celular, aumentando assim o rendimento da extração. As Pectinas liases são de particular interesse no processamento de sucos de frutas devido à degradação direta de polímeros de pectina pelo mecanismo de eliminação β , resultando na formação de oligogalacturonídeos 4,5-insaturados, enquanto outras pectinases atuam sequencialmente para

degradar completamente as moléculas de pectina. Isto leva a uma redução na viscosidade dos sucos sem afetar negativamente os grupos ésteres responsáveis por aromas específicos de várias frutas (BENEN et al., 2003; YADAV et al., 2009). Além disso, enzima pectinase quebra a parede celular e libera os complexos metálicos da casca e da polpa da fruta. A extração enzimática da pectinase auxilia na identificação de complexos de cobre responsáveis pela melhor biodisponibilidade de cobre para o corpo humano (WOJCIESZEK e RUZIK., 2016).

Outra enzima que atrai a atenção de pesquisadores e indústrias devido ao seu grande potencial biotecnológico são as lipases. São enzimas responsáveis pela hidrólise de ligações de ésteres de triglicérides em diglicérides, monoglicérides, ácidos graxos e glicerol através do mecanismo complexo de ativação interfacial (TREICHEL et al., 2010; THAKUR., 2012; ALMEIDA, TAUK-TORNISIELO e CARMONA., 2013; SELITEANU et al., 2014). Podem ser produzidas por vários organismos, contudo, os microrganismos são mais promissores para este fim. Estas enzimas tem seu papel importante na produção de produtos farmacêuticos, compostos enantiômeros, agroquímicos, cosméticos e perfumaria, tratamento de água residuais, compostos de sabor, auditivos indústrias e utilização na indústria de alimentos. Esta enzima, na indústria de alimentos, tem sido aplicada para modificar o sabor dos alimentos por síntese de ésteres de ácidos graxos de cadeia curta e alcoóis (aromatizantes) (GURUNG et al., 2013). Os ácidos graxos livres, de acordo com o tamanho da cadeia carbônica e grau de insaturação, proporcionam sabor e aromas peculiares aos alimentos. As lipases tem potencial, por exemplo na melhora da textura da polpa do açaí, proporcionando maior digestibilidade dos nutrientes, levando uma maior eficiência na utilização dos alimentos. Além disso, podem digerir componentes que aparentemente são prejudiciais, indesejáveis ou até mesmo com pouco valor agregado (CHOCT., 2006).

2. JUSTIFICATIVA

A quantidade de biomassa residual, da colheita ao processamento do fruto do açaí em polpa, traz consigo uma oportunidade de exploração deste material para obtenção de enzimas desconstrutoras de parede celular vegetal produzidas por fungos filamentosos, como os macro-basidiomicetos. Estas enzimas podem ser aplicadas como catalizadores biológicos para melhoria da polpa/suco de frutas, como do açaí. Processos de hidrólise enzimática da polpa de açaí traria como vantagens o enriquecimento com monômeros de açúcares (hexoses e pentoses – fibras) e presença de bioativos (antioxidantes, entre outros). Os macro-basidiomicetos isolados da região Norte (quente e úmido) podem ser um precursor na desconstrução e beneficiamento dos resíduos da colheita e despolpamento do açaí. No caso dos cachos, por terem capacidade de desconstruir os mesmos, se tornam interessantes no ponto de vista industrial, podendo assim ser aplicados como biofertilizantes ou na nutrição animal, já que apresentam potencial de deslignificação, e aumentam a digestibilidade do mesmo. O resíduo caroço do fruto do açaí e demais fibras residuais, podem ser fonte de substrato para cultivo de macro-basidiomicetos, que crescem comumente nas regiões mais úmidas. Estes podem ser potenciais fontes de enzimas extracelulares (extratos enzimáticos) com uso na agroindústria do açaí, com intuito de auxiliar para melhores das condições reológicas da polpa e o enriquecimento deste produto, com a liberação de mais bioativos. Deste modo, este trabalho teve como finalidade observar o comportamento de alguns macro-basidiomicetos isolados do bioma Cerrado da região Norte (Tocantins), como potencial desconstrutor de resíduos do processamento de frutos do açaí, que neste primeiro momento possuiu a premissa de saber a capacidade de crescimento em tais biomassas e a dosagem de atividades enzimáticas. As atividades enzimáticas foram avaliadas tanto no cultivo dos basidiomicetos como também sobre estresse biológico, em cocultivo com outro tipo de fungo filamentosos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Coletar e isolar macro-basidiomicetos de fitofisionomias do cerrado tocaninense e cultivá-los em biomassas vegetais residuais da agroindústria do açaí para avaliação da atividade enzimas celulolíticas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e isolar macro-basidiomicetos do cerrado do Estado de Tocantins - Região Norte;
- Cultivar os basidiomicetos por cultivo estado sólido (CES) em substratos lignocelulósicos residuais das agroindústrias açaí;
- Determinar as atividades enzimáticas celulolíticas de macro-basidiomicetos;
- Analisar a interação entre os macro-basidiomicetos e o *Trichoderma asperellum* BC-2 A70882D para potencial cocultivo;
- Determinar as atividades enzimáticas β -glicosidase, lipase e xilanase, de extratos obtidos de cocultivo de macro-basidiomiceto FPB 173 com *Trichoderma asperellum* BC-2 A70882D cultivados por cultivo submerso em meios contendo biomassa de açaí.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA, ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DOS MACRO-BASIDIOMICETOS

As coletas foram realizadas no ano de 2017 em áreas preservadas da Universidade Federal do Tocantins (UFT), campus universitário de Gurupi – TO, Latitude 11°43'45"S e Longitude 49°04'07"W. Pela classificação de KÖPPEN (1948) o clima da região é do tipo B1WA'a' úmido com moderada deficiência hídrica, a temperatura média anual de 29,5 °C, com precipitação anual média de 1804 mm, considerado um verão chuvoso e um inverno seco.

Coletou-se 54 cogumelos (“corpos frutificação” ou basidiocarpos de espécies macro-basidiomicetos) em áreas de mata ciliar, mata de galeria e mata seca, sendo elas fitofisionomias do cerrado tocantinense (ICMBIO, 2019), nas proximidades da UFT nos períodos chuvosos, nas imediações dos pontos geográficos identificados na Figura 7.

O registro da coleta foi feito por fotografia conforme exemplificado na Figura 8. As especificações foram: número de identificação, hora e data da coleta, local (tronco vivo ou morto, serrapilheira ou solo) e característica do macro-basidiomiceto (comprimento, cor, forma). Com um auxílio de estilete foi cortado o corpo de frutificação ainda jovem e armazenado em saco de papel previamente identificado, retirando-se impurezas das amostras.

As coletas foram feitas mediante autorização da direção do campus Universitário da universidade, conforme preconiza a legislação de acesso ao patrimônio genético. A autorização de coleta está devidamente registrada no SISBIO (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico NR. 41346-1), junto ao ICMBIO (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade).



Figura 7. Áreas de coleta dos macro-basidiomicetos. A (Mata de Galeria); B (Mata Ciliar); C (Mata Seca) e D (Mata Ciliar). Fonte: Google Earth Pro (2017)

Em laboratório, os basidiocarpos coletados foram fragmentados (cortes) de forma a obter da parte mais interna uma massa micelial, com menor injúria ou indicio de contaminação por outros microrganismos e sujidades. Esses fragmentos foram inoculados em placas contendo meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar 2%) com Ampicilina ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$), e acondicionados em incubadora B.O.D (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ para observação do crescimento do micélio.



Figura 8. Registro da coleta de macro-basidiomiceto número FPB 173. Fonte: O autor (2017).

Para a certificação do crescimento total do micélio e não contaminação por outros microrganismos, foram realizadas séries de repicagens em placas de BDA (Batata-Dextrose-Ágar 2%) e Ampicilina ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$), adotando o processo de viabilidade e purificação. As linhagens selecionadas foram classificadas quanto ao gênero pela visualização macroscópica e microscópica (microscópio óptico modelo LEICA). Após esse processo os microrganismos foram repicados em tubos inclinados para a conservação. Os isolados foram identificados como FPB (fungos de podridão branca) com número em sequência.

4.2 BIOMASSAS RESIDUAIS DE AÇAÍ: OBTENÇÃO, PREPARO E ARMAZENAMENTO

As biomassas residuais de açaí foram obtidas na Associação dos Agroextrativistas Familiares Solidários, do Povoado Km 1700, Latitude $05^{\circ}31'35''\text{S}$ e Longitude $47^{\circ}29'30''\text{W}$, 116 m de altitude média, no município de Imperatriz - MA.

Coletou-se dois tipos de biomassas residuais, 1) cachos vazios; e 2) sementes do açaí após despulpamento (tipo tradicional). As biomassas foram secas em local aberto (“terreiro” - ar livre) por um período de seis dias. Após a secagem as biomassas foram trituradas em um moinho (tipo Willey) marca Solab. Para obtenção de partículas finas, o material triturado foi passado em peneira com malha e recolhido as partículas $< 2 \text{ mm}$, e armazenados em embalagens plásticas hermeticamente fechadas. Após esse processo obteve-se a Fibra do Cacho do açaí (FC) e Fibra da Semente do açaí (FS) (Figura 9).

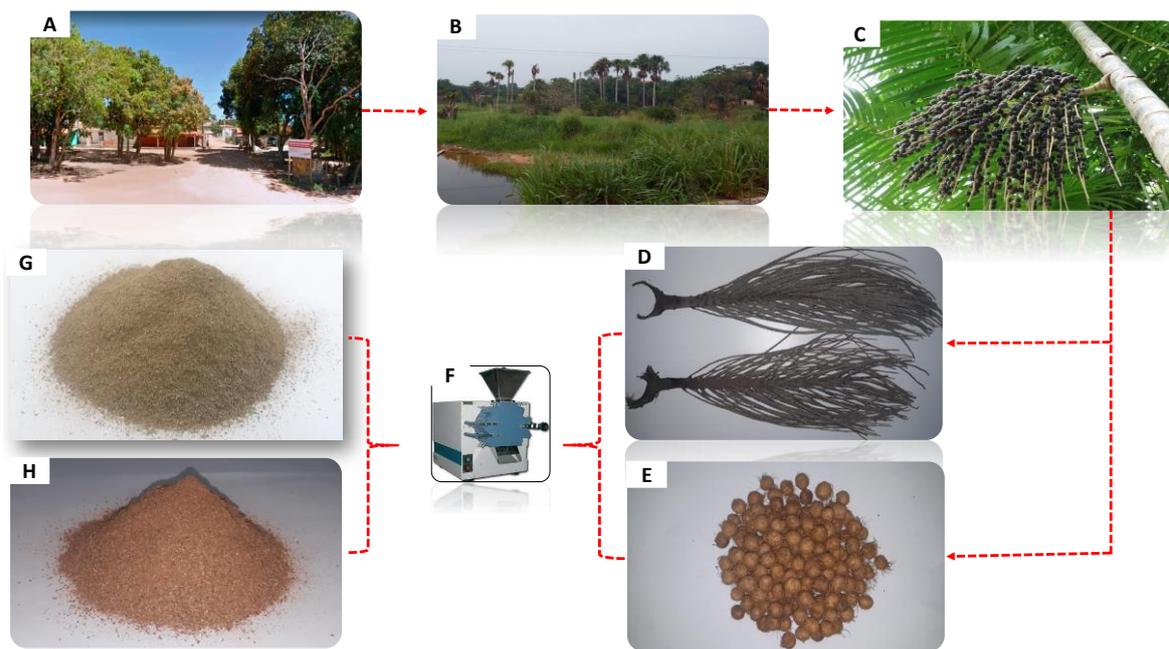


Figura 9. Coleta e tratamento das biomassas. Povoado Km 1700 (A); Área de plantio do açai (B); Palmeira de *Euterpe oleracea* (C); Cacho após secagem ao ar livre (D); Semente após secagem ao ar livre (E); Moinho (tipo Willey) (F); Fibra do Cacho do açai (FC) (G); Fibra da Semente do açai (FS) (H). Fonte: O autor (2018).

4.3 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DOS MACRO-BASIDIOMICETOS POR CES EM SUBSTRATOS ENRIQUECIDOS COM BIOMASSAS DO AÇAÍ

4.3.1 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições em esquema de fatorial duplo (8x6), totalizando 48 tratamentos. O primeiro fator foi constituído de oito macro-basidiomicetos (obtidos pela seleção de viabilidade e purificação) e o segundo fator foi constituído por seis meios de cultura Batata-Dextrose-Ágar com glicose (BDA-C), Ágar Fibra do Cacho do açai com glicose (FC-C) e Ágar Fibra da Semente do açai com glicose (FS-C) e Batata-Dextrose-Ágar sem glicose (BDA-S), Ágar Fibra do Cacho do açai sem glicose (FC-S) e Ágar Fibra da Semente do açai sem glicose (FS-S).

4.3.1.1 Preparo dos meios enriquecidos com biomassas residuais do açaí.

Prepararam-se os meios de cultura ágar (15 g.L⁻¹) enriquecidos com biomassas residuais do açaí, FC ou FS (10 g.L⁻¹). As biomassas e o ágar foram pesados e distribuídos em frascos do tipo Erlenmeyer com capacidade de 1000 mL, com uma quantidade de 500 mL em cada. Os frascos contendo a solução de ágar e biomassas residuais do açaí foram autoclavados por 30 minutos (121 °C 1 Atm.). Após o resfriamento (50 °C) foi adicionado um antibiótico (Ampicilina a 0,1 g.L⁻¹) por filtragem (filtro 0,22 um). Os meios foram vertidos em placas de Petri de 8,5 cm de diâmetro. Também foi realizado o meio de cultura comercial de crescimento contendo BDA (Batata-Dextrose-Ágar 2%) (Figura 10). Os três meios de culturas foram submetidos a dois níveis de suplementação, com 20 g.L⁻¹ de glicose e sem glicose. As biomassas Fibra do Cacho do açaí e Fibra da Semente do açaí, como também a batata inglesa foram submetidas a teste de composição orgânica pelo Laboratório de Análise Agrícolas do Tocantins na cidade de Gurupi.

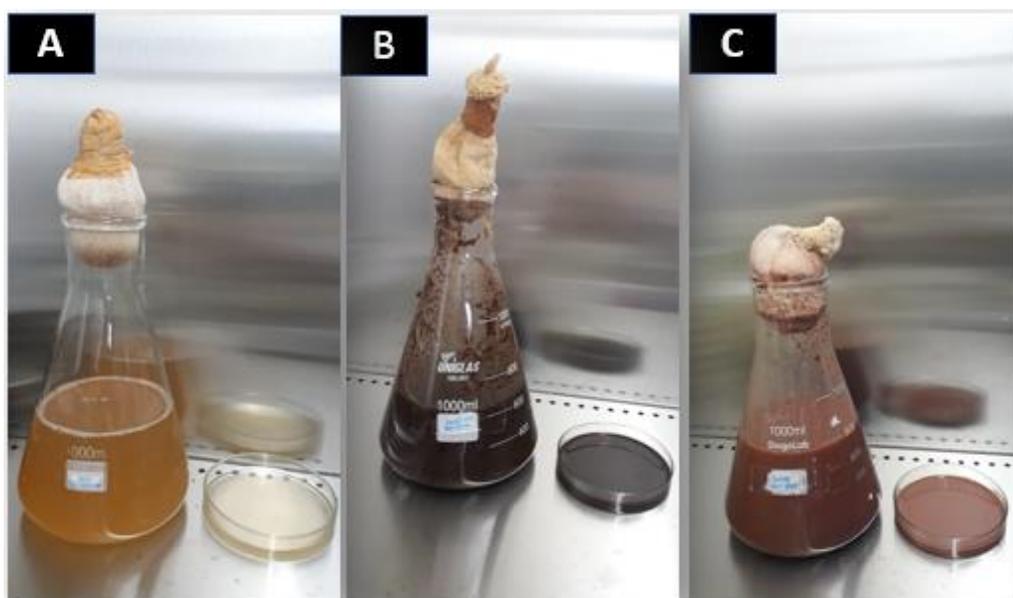


Figura 10. Meios de cultura para o crescimento micelial dos macro-basidiomicetos. Meio BDA (A); Meio Ágar Fibra do Cacho de açaí (B); Meio Ágar Fibra da Semente de açaí (C). Todo os meios com e sem glicose. Fonte: O autor (2018).

4.3.1.2 Inoculação

Foi realizada a inoculação de um disco de 1 cm de diâmetro, com massa micelial ao centro da placa de cada tipo de meio. Procedimento repetido para todos os oito macro-basidiomicetos. Posteriormente as placas foram acondicionadas em estufa incubadora B.O.D

(Demanda Bioquímica de Oxigênio) a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ para observação do crescimento micelial ao longo dos dias.

4.3.1.3 Avaliações do crescimento micelial

As avaliações do crescimento micelial foram realizadas a cada 48 horas após a inoculação, durante um período de 192 horas consecutivas, totalizando quatro medições. Foi aferida a área de diâmetro (cm) das colônias em posição ortogonal com o auxílio de um paquímetro. Nesse experimento foram avaliadas três características sendo:

1) Diâmetro do Crescimento Micelial (DCM): na qual foram comparados o diâmetro do micélio ao oitavo dia entre os tratamentos;

2) Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM): sendo o índice descrita por Oliveira (1991) pela fórmula:

$$\text{IVCM} = \frac{\sum (D - D_a)}{N}$$

Onde:

IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial;

D= diâmetro médio atual da colônia;

D_a = diâmetro médio da colônia do dia anterior;

N= número de dias após a inoculação

3) Taxa de Crescimento: Diâmetro Micelial (cm)/Números de dias

4.4 ENZIMAS CELULOLÍTIICAS DE MACRO-BASIDIOMICETOS CULTIVADOS EM CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO EM BIOMASSAS RESIDUAIS DO AÇAÍ

4.4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os oito macro-basidiomicetos foram avaliados quanto à capacidade celulolíticas quando cultivados nas diferentes condições dos substratos. Os isolados FPB 166, FPB 167, FPB 168, FPB 169, FPB 170, FPB 171, FPB 172 e FPB 173, foram utilizados neste experimento.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições em esquema de fatorial duplo (8x5), totalizando 40 tratamentos. O primeiro fator foi constituído de oito macro-basidiomicetos (obtido pela seleção de viabilidade, purificação, morfologia e microscopia) e o segundo de cinco meios com diferentes formulações entre a Fibra do Cacho de açaí (FC) e Fibra da Semente de açaí (FS): Formulação 1 (F1): contendo 100% de FC; Formulação 2 (F2): contendo 100% de FS; Formulação 3 (F3): contendo 50% de FC e 50% de FS; Formulação 4 (F4): contendo 80% de FC e 20% de FS; Formulação 5 (F5): contendo 20% de FC e 80% de FS.

4.4.1.1 Cultivo em estado sólido

O cultivo em estado sólido (CES) foi conduzido em frascos de vidro com capacidade de 190 g contendo 20 g (peso seco) dos substratos (diferentes misturas das biomassas residuais do açaí). Nas formulações foi adicionada água milli-Q (18,57mL) até completar \cong 65% de umidade, e autoclavado por três vezes a 121 °C por 30 minutos (em intervalos de 24 horas). Os recipientes foram fechados com tampa metálica e selados com filme PVC esticável. Foi aberto um orifício circular de 5 mm no centro da tampa e fechada com fita *micropore* marca Cremer, para facilitar a transferência gasosa.

4.4.1.2 Inoculação

Após o período de esterilização e resfriamento, os fracos foram transferidos para capela de fluxo laminar para serem inoculados. Os meios de cultivos foram inoculados com 5 discos de micélio ($\emptyset = 1$ cm) retirados das placas de Petri com BDA (Batata-Dextrose-Ágar 2%) contendo micélio dos macro-basidiomicetos. Os frascos foram fechados novamente com

a tampa metálica e fixadas com filme PVC esticável, e incubados por 21 dias em uma incubadora B.O.D a $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

4.4.2 Análises enzimáticas

Após o período de cultivo, 21 dias, as amostras foram retiradas da incubação para a extração do extrato bruto total. Cada frasco foi homogeneizado com uma espátula metálica e transferido 10 g (peso úmido) para um Erlenmeyer de 250 mL. Acrescentou-se 40 mL de solução 0,01% (v/v) Triton X-100 diluído em água gelada ($\pm 4^\circ\text{C}$), e transferiu-se para uma incubadora shaker com temperatura de 5°C por agitação de 180 rpm por 40 minutos. Em seguida, as amostras foram filtradas em papel de filtro ($\varnothing = 12,5\text{ cm}$) com auxílio de funil de Büchner, kitassato e bomba de vácuo. O filtrado foi centrifugado a 10000 rpm a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante (considerado extrato enzimático) foi removido do precipitado e transferido para frasco de vidro, frasco tipo penicilina injetável 10 mL com tampa de borracha, e rotulado. Em cada frasco foi acrescentado uma solução de azida sódica com concentração final de 0,02% p/v. Os extratos foram congelados a -20°C para posterior avaliação da atividade enzimática.

4.4.2.1 Determinação de atividade de β -glicosidase

Atividade enzimática da β -glicosidase foi determinada utilizando salicilina (β -glicosil alcoólico que contém D-glicose). A glicose liberada após ação da β -glicosidase foi determinada pela leitura da absorbância 540 nm. A reação foi conduzida em tubos de ensaio contendo 400 μL do meio reacional (solução de salicilina 1% (m/v) em tampão McIlvaine em pH 5,0) e mantidos em banho-maria a 50°C por 5 minutos. Após este prazo acrescentou-se 400 μL do extrato enzimático nos tubos contendo o meio reacional (para iniciar a reação) e em seguida foi retirado 200 μL da reação e pipetados em tubos contendo 200 μL de solução de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) para cessar a reação. Os 200 μL foram retirados em tempos de 0, 5 e 10 minutos após o início da reação. Os tubos contendo DNS mais os açúcares redutores hidrolisados foram fervidos a 100°C por 5 min. Após o período de fervura e aguardado o período de resfriamento em bancada, foram adicionados 2 ml de água milli-Q no tubos de ensaio. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Digital Modelo SP-220, a 540 nm.

Para o cálculo de atividade, foi realizada uma curva analítica de glicose, para cada diluições. O valor da absorvância de cada ponto corresponde ao valor absoluto de glicose (coeficiente extinção molar ϵ : $105,881 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) a ser estimado no cálculo de atividade, a partir do método do ácido dinitrossalicílico (DNS). Uma unidade de β -glicosidase ($\text{UI} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar $1 \mu\text{mol}$ de glicose por mililitro, a cada minuto de reação (MILER, 1959). A atividade enzimática foi calculada a partir da Eq. 1 e Eq. 2 (item 4.4.3).

4.4.2.2 Determinação de atividade de endoglicanase (CMCase)

A atividade enzimática da endoglicanase (CMCase) foi conduzida em tubos de ensaio de 10 mL contendo $400 \mu\text{L}$ da meio reacional (solução de carboximetil celulose 1% (m/v) em tampão McIlvaine em pH 5,0) e mantidos em banho maria a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 minutos. Após este prazo acrescentou-se $400 \mu\text{L}$ do extrato enzimático nos tubos contendo o meio reacional (para iniciar a reação) e em seguida foi retirado $200 \mu\text{L}$ da reação e pipetados em tubos contendo $200 \mu\text{L}$ de solução de DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) para cessar a reação. Os $200 \mu\text{L}$ foram retirados em tempos de 0, 5 e 10 minutos após o início da reação. Os tubos contendo DNS mais os açúcares redutores hidrolisados foram fervidos a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min. Após o período de fervura e aguardado o tempo de resfriamento em bancada, foram adicionados 2 ml de água milli-Q no tubos de ensaio. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Digital Modelo SP-220, a 540 nm .

Para o cálculo de atividade, foi realizada uma curva analítica de glicose para cada diluições. O valor da absorvância de cada ponto corresponde ao valor absoluto de glicose (coeficiente extinção molar ϵ : $105,881 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) a ser estimado no cálculo de atividade, a partir do método do ácido dinitrossalicílico (DNS). Uma unidade de endoglicanase (CMCase) ($\text{UI} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar $1 \mu\text{mol}$ de glicose por mililitro, a cada minuto de reação (MILER, 1959). A atividade enzimática foi calculada a partir da Eq. 1 e Eq. 2 (item 4.4.3).

4.4.2.3 Determinação de atividade de lipase

Para atividade enzimática da lipase foi preparado o meio reacional (solução de 0,5% de Triton X - 100 em tampão McIlvaine em pH 7,0), ou seja, ($500 \mu\text{L}$ para 100mL de tampão)

e mantido em geladeira. Em banho-maria a 40 °C foi dissolvido 3,8 mg de palmitato de *p*-nitrofenila (4-nitrophenyl palmitate) – *p*-NPP em 500 µL de dimetilsulfoxido (DMSO), posteriormente foi adicionado 19,5 mL de tampão McIlvaine pH 7,0 acrescido de 0,5% de Triton X-100 (concentração do substrato de 1 mM).

Para atividade enzimática da lipase, foram adicionados em tubos de ensaio 900 µL do meio reacional e mantidos em banho-maria a 40 °C por 5 minutos. Após este prazo acrescentou-se 100 µL do extrato enzimático nos tubos contendo o meio reacional (para iniciar a reação) em diferentes intervalos de tempo (a cada 1 minuto), retirou-se os tubos do banho-maria, transferindo-os para outro banho-maria a 100 °C e mantendo-os por 1 minuto. Após esse período foi retirado e acrescentado 1mL de solução tetraborato de sódio saturado e aguardado o resfriamento. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Digital Modelo SP-220, a 410 nm.

Para o cálculo de atividade, foi realizada uma curva analítica de *p*-NPP para cada diluições. O valor da absorbância de cada ponto corresponde ao valor absoluto de *p*-NPP (coeficiente extinção molar ϵ : 14220,0 M⁻¹.cm⁻¹) a ser estimado no cálculo de atividade. Uma unidade de *p*-NPP (UI.mL⁻¹) é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de *p*-nitrofenol por mililitro, a cada minuto de reação (MILER, 1959). A atividade enzimática é calculada a partir da Eq. 1 e Eq. 2 (item 4.4.3).

4.4.2.4 Determinação de atividade de pectinase

Para atividade enzimática pectinase, foram adicionados em tubos de ensaio 400 µL da meio reacional (solução de pectina 1% (m/v) em tampão McIlvaine em pH 5,0) e mantidos em banho-maria a 50 °C por 5 minutos. Após este prazo acrescentou-se 400 µL do extrato enzimático nos tubos contendo o meio reacional (para iniciar a reação) e em seguida foi retirado 200 µL da reação e pipetados em tubos contendo 200 µL de solução de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) para cessar a reação. Os 200 µL foram retirados em tempos de 0, 5 e 10 minutos após o início da reação. Os tubos contendo DNS mais os açúcares redutores hidrolisados foram fervidos a 100 °C por 5 min. Após o período de fervura e aguardado o período de resfriamento em bancada, foram adicionados 2 ml de água milli-Q nos tubos de ensaio. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Digital Modelo SP-220, a 540 nm.

Para o cálculo de atividade, foi realizada uma curva analítica de ácido galacturônico para cada diluições. O valor da absorbância de cada ponto corresponde ao valor absoluto de

ácido galacturônico (coeficiente extinção molar ϵ : $176,35 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) a ser estimado no cálculo de atividade, a partir do método do ácido dinitrossalicílico (DNS). Uma unidade de pectinase ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar $1 \mu\text{mol}$ de ácido galacturônico por mililitro, a cada minuto de reação (MILER, 1959). A atividade enzimática foi calculada a partir da Eq. 1 e Eq. 2 (item 4.4.3).

4.4.2.5 Determinação de atividade de xilanase

Atividade enzimática da xilanase, foi conduzido em tubos de ensaio 10 mL contendo $400 \mu\text{L}$ da meio reacional (solução de celulose micro-cristalina xilana 1% (m/v) em tampão McIlvaine em pH 5,0) e mantidos em banho-maria a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 minutos. Após este prazo acrescentou-se $400 \mu\text{L}$ do extrato enzimático nos tubos contendo o meio reacional (para iniciar a reação) e em seguida foi retirado $200 \mu\text{L}$ da reação e pipetados em tubos contendo $200 \mu\text{L}$ de solução de DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) para cessar a reação. Os $200 \mu\text{L}$ foram retirados em tempos de 0, 5 e 10 minutos após o início da reação. Os tubos contendo DNS mais os açúcares redutores hidrolisados foram fervidos a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min. Após o período de fervura e aguardado o período de resfriamento em bancada, foram adicionados 2 ml de água milli-Q no tubos de ensaio. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Digital Modelo SP-220, a 540 nm .

Para o cálculo de atividade, foi realizada uma curva analítica de xilose para cada diluições. O valor da absorbância de cada ponto corresponde ao valor absoluto de xilose (coeficiente extinção molar ϵ : $88,231 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) a ser estimado no cálculo de atividade, a partir do método do ácido dinitrossalicílico (DNS). Uma unidade de xilanase ($\text{UI} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar $1 \mu\text{mol}$ de xilose por mililitro, a cada minuto de reação (MILER, 1959). A atividade enzimática foi calculada a partir da Eq. 1 e Eq. 2 (item 4.4.3).

4.4.3 Análises dos dados

Todos os cultivos foram realizados em triplicata. As atividades enzimáticas em CES foram expressas como unidade internacional (U) por grama de substrato seco (gss). E as atividades enzimáticas em cultivo submerso foram demonstradas em (U) pelo volume final em mL (total) do cultivo. Os resultados da triagem de produção enzimática foram submetidos

ao teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade utilizando o programa SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2011).

Para o cálculo das atividades enzimáticas foi utilizada a seguinte equação Eq (1):

$$\text{Atividade enzimática} \left(\frac{U}{ml} \right) = \frac{Abs_{final}}{\varepsilon} \times \frac{1}{V_i} \times 10^3 \times V_f \times \frac{1}{t \text{ (min)}} \times \text{diluição} \quad \text{Eq (1)}$$

Onde:

ε = coeficiente de extinção molar ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)

Abs = absorvância

V_i = volume inicial (volume de enzima adicionado para iniciar a reação)

V_f = volume final da reação (de acordo com o cálculo da concentração de glicose na curva de calibração)

$t \text{ (min)}$ = tempo da reação em minutos

Para a correção do rendimento para atividade enzimática em estado sólido foi utilizado a equação Eq 2:

O rendimento ($U \cdot g_{SS}^{-1}$) foi calculado com a seguinte equação (Eq 2):

$$U_{/g_{SS}} = \frac{(U_{total}) \times (V)}{g} \quad \text{Eq (2)}$$

Onde,

U_{total} = Média da atividade enzimática

V = Volume final em mL do cultivo

g = Quantidade em grama do substrato seco utilizada

4.5 COCULTIVO DE MACRO-BASIDIOMICETO E *Trichoderma asperellum* BC-2 A70882D EM BIOMASSAS RESIDUAIS DE AÇAÍ.

4.5.1 *Trichoderma asperellum* BC-2 A70882D e macro-basidiomiceto – cocultivo

O experimento foi triado com cultivo de misturas ou cocultivos, a fim de avaliar a interação *in vitro* de macro-basidiomicetos (fungos lignocelulolíticos) e isolado fúngico

(*Trichoderma asperellum* BC-2) com perfil significativo celulolítico na produção de coquetéis enzimáticos com potencial para sacarificação de lignocelulose.

O isolado de *T. asperellum* BC-2 A70882D isolado a partir de resíduos de abacaxi (folhas, coroas e frutos) oriundos da região de Miracema do Tocantins (Latitude 09°34'02" Sul; Longitude 48°23'30" Oeste), depositado no Laboratório de Biotecnologia, Análise de Alimentos e Produtos - Habite - Incubadora de Empresas de Biotecnologia; Universidade Federal do Tocantins - Campus de Gurupi (TEIXEIRA., 2015). A espécie foi mantida em meio ágar extrato de malte, a 4°C, pelo método de Castellani (FIGUEIREDO., 1967). Este fungo foi escolhido em função de resultados prévios como produtores de enzimas celulolíticas e pectinolíticas. Assim, o objetivo do cocultivo foi avaliar se a atividade holocelulolíticas teriam melhores resultados que observados em monocultivos, como também verificar a produção de enzima lipase, pois a matéria seca do fruto do açaí possui cerca de 50% de lipídios em sua composição. Os fungos foram repicados em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar 2%) em placas de Petri, para reativação, e incubados a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ até completa colonização (TEIXEIRA., 2015).

4.5.2 Determinação do crescimento fúngico

Para determinação do tipo de crescimento, um disco de micélio ($\varnothing = 1$ cm) dos fungos analisados foi repicados para o centro da placa de Petri nos meios de cultivo BDA (Batata-Dextrose-Ágar 2%) e MEA (Ágar Extrato de Malte), incubadas a $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Os isolados foram classificados em dois grupos: crescimento lento ou crescimento rápido. Os fungos que ocuparam a placa por completo após 3 dias de cultivo foram considerados de crescimento rápido e os que precisaram mais de 3 dias, de crescimento lento (TEIXEIRA., 2015). Os cultivos foram realizados em triplicatas para os dois meios de cultivos utilizados no experimento.

4.5.3 Cocultivo: tipos de interações entre Macro-basidiomicetos e *Trichoderma asperellum* BC-2 A70882D.

Para analisar o comportamento e a compatibilidade dos macro-basidiomicetos e *T. asperellum* BC-2 A70882D foram cocultivados em dois meios de cultura distintos: 1) BDA (Batata-Dextrose-Ágar 2%); e 2) MEA (Ágar Extrato de Malte). Os macro-basidiomicetos

foram inoculados em cada placas de Petri ($\varnothing = 11$ cm) um disco ($\varnothing = 1$ cm) com distância em aproximadamente 5,5 cm de cada fungo.

Para cada interação, os isolados de crescimento rápido foram inoculados mais tarde que o isolado de crescimento lento, sendo de três dias para o *T. asperellum* BC-2 A70882D e seis dias para o macro-basidiomiceto (TEIXEIRA., 2015). Os cultivos foram mantidos a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ e observados diariamente até ser possível identificar o tipo de interação. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5.3.1 Desenho experimental para cocultivos em meio ágar (placa)

Foram realizados registros fotográficos e descrições dos cocultivos no décimo quinto dia. Os critérios de interações foram realizados por oposição direta entre culturas duplas de micélio, conforme descrito por Molla et al. (2001). Os cinco modos de interações entre fungos filamentosos são mostrados na Tabela 2 e Figura 11. As interações também foram comparadas com as definições de Bertrand et al. (2013a) demonstrada na Tabela 3.

Tabela 2. Modelos de interação entre fungos filamentosos crescidos em placa.

	Interação	Definição
1	Entrelaçamento mútuo	Crescimento em que ambos os fungos crescem sem sinal macroscópico de interconexões.
2	Entrelaçamento mútuo parcial	Crescimento onde o fungo cresce acima ou abaixo do outro sem qualquer zona de inibição.
3	Invasão/substituição	Um micélio cresce sobre o outro e começa consumi-lo, podendo substituí-lo.
4	Inibição (ponto de contato)	Os fungos aproximam-se um do outro até com uma linha de demarcação de 1 a 2 mm, entre as duas colônias claramente visíveis.
5	Inibição (a distância)	Inibição a uma distância > 2 mm.

Fonte. Modificado de Molla et al. (2001).

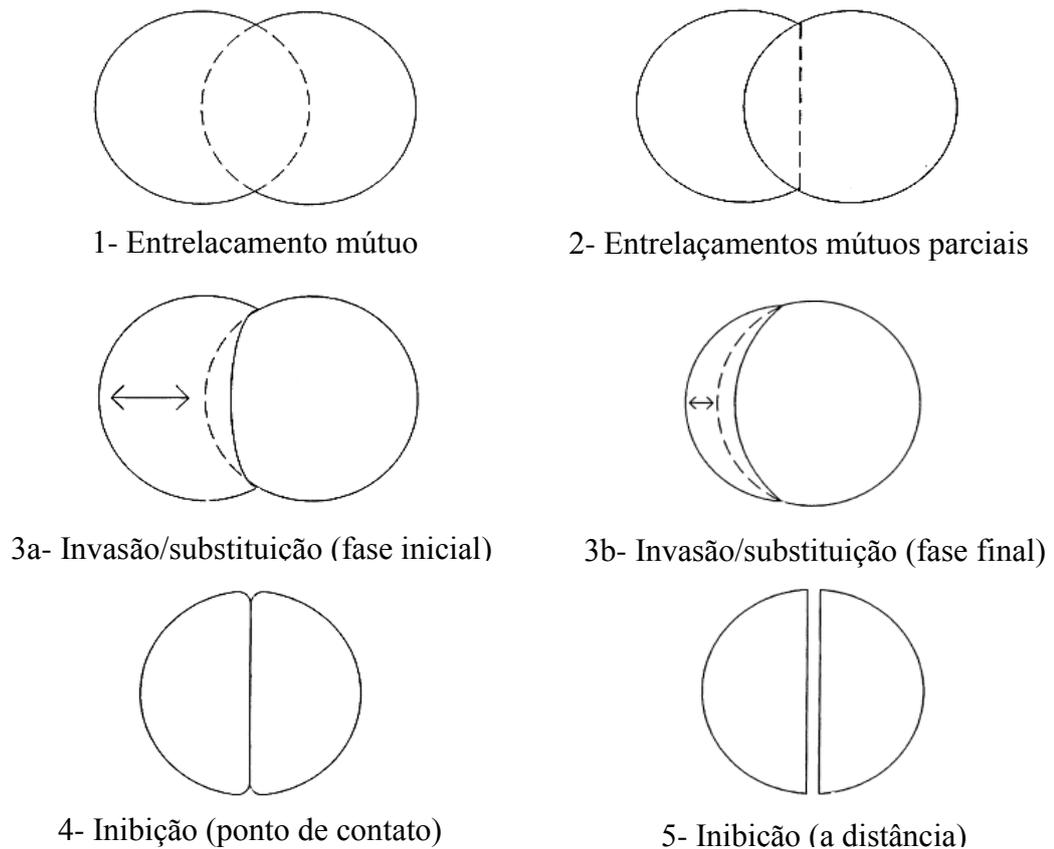


Figura 11. Diagrama esquemático das interações entre duas linhagens diferentes de fungos filamentosos crescidos em batata-dextrose-ágar e ágar extrato de malte. Fonte: de Molla et al. (2001).

Tabela 3. Interação entre fungos filamentosos crescidos em placa.

Interação	Definição
 <p>Inibição a distância</p>	<p>Interrupção do crescimento pelos dois fungos concorrentes, onde é formado uma faixa livre de micélio entre os dois fungos; este tipo de interação tem uma forte tendência para a produção de metabólitos com efeitos antimicrobianos.</p>
 <p>Zona de confronto</p>	<p>É o contato entre os dois fungos e a formação de uma linha escura que os separam; a formação da faixa escura é o indicativo de intensa atividade metabólica com produção de novas substâncias.</p>
 <p>Inibição por contato</p>	<p>As duas espécies se mantêm próximas, mas não há indicação de produção de novos metabólitos.</p>
 <p>Sobreposição</p>	<p>Uma das espécies consegue crescer sobre a outra demonstrando maior adaptação nas condições do cocultivo.</p>

4.5.4 Monocultivo em cultivo submerso.

O isolado que apresentou-se maior zona escura após a interação foi submetido a cultivo submerso. Os cultivos submersos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL, com adição de 1,5 g (3%) de biomassa de açaí (Fibra do Cacho – FC ou Fibra da Semente - FS), usadas como fonte de carbono, 50 mL de meio suplementar basal proposto por Mandel e Weber (1969), composto por: KH_2PO_4 2,0 g.L⁻¹; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,4 g.L⁻¹; Ureia 0,3 g.L⁻¹; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,3 g.L⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3 g.L⁻¹; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5,0 mg.L⁻¹; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,6 mg.L⁻¹; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,4 mg.L⁻¹; CoCl_2 2,0 mg.L⁻¹; Extrato de levedura 250 mg.L⁻¹; Peptona 1,0 g.L⁻¹. Os cultivos foram corrigidos a pH 6 e autoclavados a (121 °C 1 Atm.) por 15 minutos.

Usou-se cinco discos miceliais ($\varnothing = 1$ cm) de ágar totalmente colonizadas. Os cultivos foram incubados por um período de sete dias, 28°C e 150 rpm. Após o período de incubação, o caldo fermentado (sobrenadante) foi separado da biomassa por filtração em papel de filtro ($\varnothing = 12,5$ cm) com auxílio de funil de Büchner, kitassato e bomba de vácuo. O filtrado foi centrifugado a 10000 rpm e 4°C por 10 minutos. O sobrenadante (extrato enzimático) foi removido do precipitado e transferido para frasco de vidro rotulado e, posteriormente, o caldo fermentado foi utilizado para análise da atividade enzimática.

4.5.5 Cocultivo dos fungos filamentosos em cultivo submerso.

Os meios de cultura foram feitos da mesma forma que os monocultivos (item anterior – descrição).

Usou-se como inóculo cinco discos miceliais ($\varnothing = 1$ cm) de ágar totalmente colonizados do macro-basidiomiceto. Transcorridas 48 horas, os meios foram incubados com cinco discos ($\varnothing = 1$ cm) do micélio *T. asperellum* BC-2 A70882D, baseado no método de cocultivo usado por Romero-Peláez (2017). Os cocultivos foram realizados em duplicatas e incubados por um período de sete dias, 28°C e 150 rpm.

4.5.5.1 Obtenção do extrato enzimático e atividades enzimáticas

As amostras para dosagem de atividades enzimáticas foram retiradas nos tempos, dois dias (monocultivo) e 7 dias (cocultivo por cinco dias e monocultivo). Após o período de incubação, o caldo fermentado (sobrenadante) foi separado da biomassa por filtração em

papel de filtro ($\varnothing = 12,5$ cm) com auxílio de funil de Büchner, kitassato e bomba de vácuo. O filtrado foi centrifugado a 10000 rpm e 4°C por 10 minutos. O sobrenadante (considerado extrato enzimático) foi removido do precipitado e transferido para frasco de vidro rotulado, sendo então adicionada azida sódica à concentração final de 0,02% (m/v) para evitar contaminação. As atividades β -glicosidase, xilanase e lipase foram determinadas junto aos extratos brutos.

5. RESULTADOS

5.1 ISOLAMENTO DE MACRO-BASIDIOMICETOS

Dentre os 54 macro-basidiomicetos cultivados em placas, apenas oito desenvolveram maior viabilidade e isolado purificado (sem contaminação). De acordo com as características morfológicas da colônia e microscópicas, com longos filamentos de hifas e estruturas reprodutivas, as linhagens foram classificadas dentro do filo Basidiomycota. Sendo identificados como: FPB 166, FPB 167, FPB 168, FPB 169, FPB 170, FPB 171, FPB 172 e FPB 173 (Figura 12). A contaminação das placas de Petri por outros microrganismos, como ácaro, foi motivo pela qual os demais macro-basidiomicetos coletados não foram selecionados.

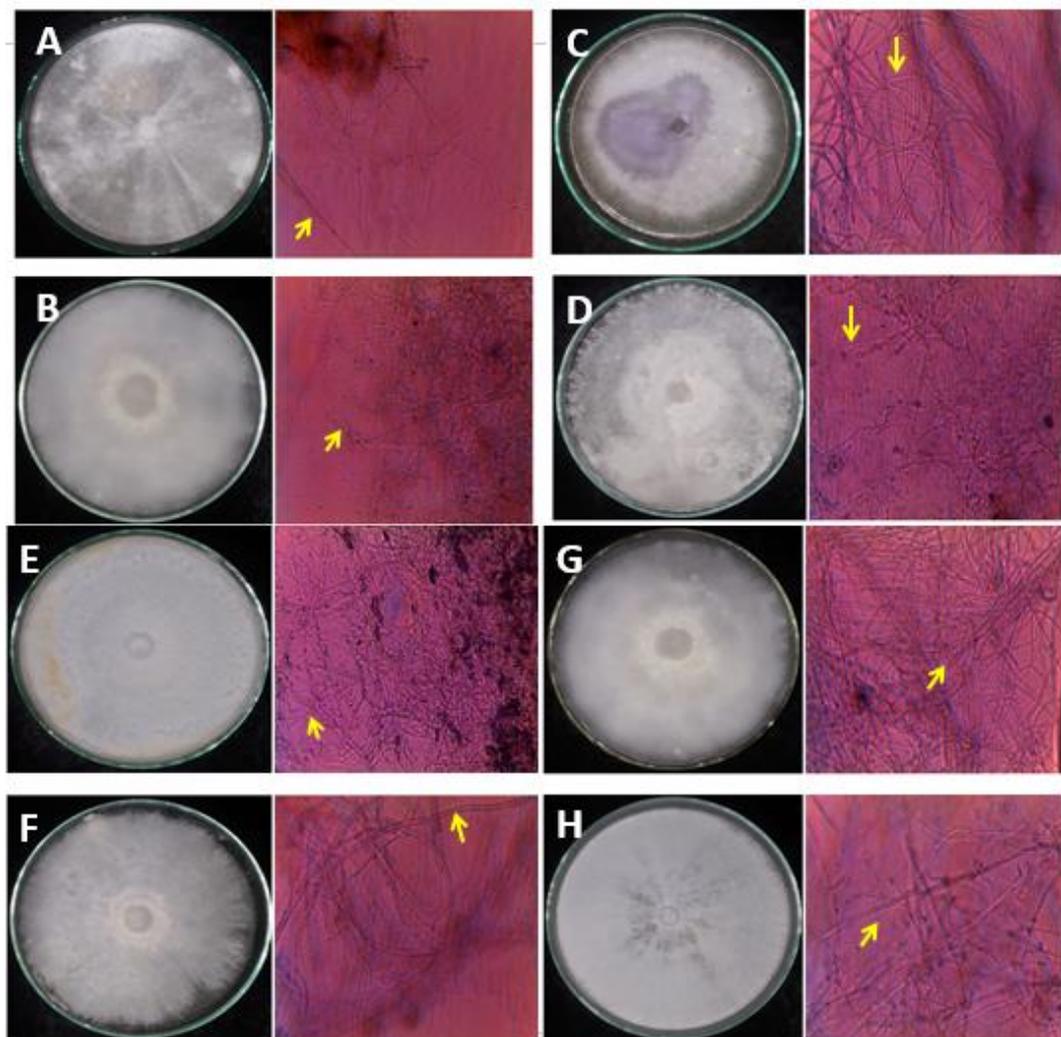


Figura 12. Crescimento micelial dos macro-basidiomicetos quando cultivados em placa de Petri em meio de cultura com BDA (Batata-Dextrose-Agar 2%) e estruturas microscópicas das hifas 20 μ m em microscópio óptico modelo LEICA. (A) FPB 166; (B) FPB 167; (C) FPB 168; (D) FPB 169; (E) FBP 170; (F) FPB 171; (G) FPB 172 e (H) FPB 173. Setas amarelas: hifas miceliais. Fonte: O autor (2019).

5.2. MACRO-BASIDIOMICETOS: CRESCIMENTO MICELIAL

Foram avaliadas as taxas de crescimento micelial e o índice de velocidade de crescimento dos oito macro-basidiomicetos nos dois meios de cultivo contendo resíduos vegetais do açaí. O experimento foi comparado com o meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar 2%), meio para crescimento e preservação fúngica. Nos três meios foram comparados a taxa de crescimento na presença e ausência da glicose. Nesta etapa do trabalho, buscou-se compreender se as formulações preparadas com as distintas biomassas como fontes nutritivas poderiam ser eficazes para o crescimento radial dos macro-basidiomicetos, como também avaliar a influência da glicose no crescimento micelial, comparando com o meio tradicional BDA.

Na avaliação quanto a capacidade de crescimento dos macro-basidiomicetos no meio Batata-Dextrose-Ágar com glicose (BDA-C) dois fungos se destacaram, o FPB 166 e o FPB 173 (Figura 13). Para o meio Batata-Dextrose-Ágar sem glicose (BDA-S) (Figura 14), os mesmos fungos e o FPB 168 se destacaram, e em ambos os meios com 8 dias obtiveram uma taxa de crescimento de $1,06 \text{ cm.dia}^{-1}$. Nos tratamentos, BDA-C e BDA-S, não houve nenhum fungo que colonizou completamente a placa em menos de oito dias.

No cultivo em meio Ágar Fibra do Cacho do açaí com glicose (FC-C) (Figura 15) observou que ao sexto dia os macro-basidiomicetos FPB 166, FPB 167, FPB 171, FPB 172 e FPB 173 obtiveram o máximo crescimento, colonizando toda a placa e chegando a uma taxa de crescimento de $1,41 \text{ cm.dia}^{-1}$. No oitavo dia apenas o fungo FPB 170 não havia colonizado a placa por completo e possuía uma taxa de crescimento de $0,77 \text{ cm.dia}^{-1}$, ao contrário dos demais que conseguiram $1,06 \text{ cm.dia}^{-1}$.

Para o cultivo em meio Ágar Fibra do Cacho do açaí sem glicose (FC-S) os fungos FPB 166 e FPB 173 obtiveram o máximo crescimento ao sexto dia, com taxa de crescimento de $1,41 \text{ cm.dia}^{-1}$ (Figura 16). No oitavo dia somente o FPB 168, FPB 170 e FPB 172 não haviam conseguido a colonização completa da placa, e obtiveram uma taxa de crescimento de $0,98$; $0,90$; $1,05 \text{ cm.dia}^{-1}$, respectivamente, contra $1,06 \text{ cm.dia}^{-1}$ dos demais.

Nas Figuras 17 e 18 os meios Ágar Fibra da Semente do açaí com glicose (FS-C) e Ágar Fibra da Semente do açaí sem glicose (FS-S), é possível perceber que nenhum dos fungos conseguiram colonizar o máximo diâmetro da placa nos tempos avaliados, com a máxima taxa de crescimento para o FPB 166 no meio com glicose e para o FPB 173 no meio sem glicose, sendo estas $1,02 \text{ cm.dia}^{-1}$ e $0,95 \text{ cm.dia}^{-1}$, respectivamente.

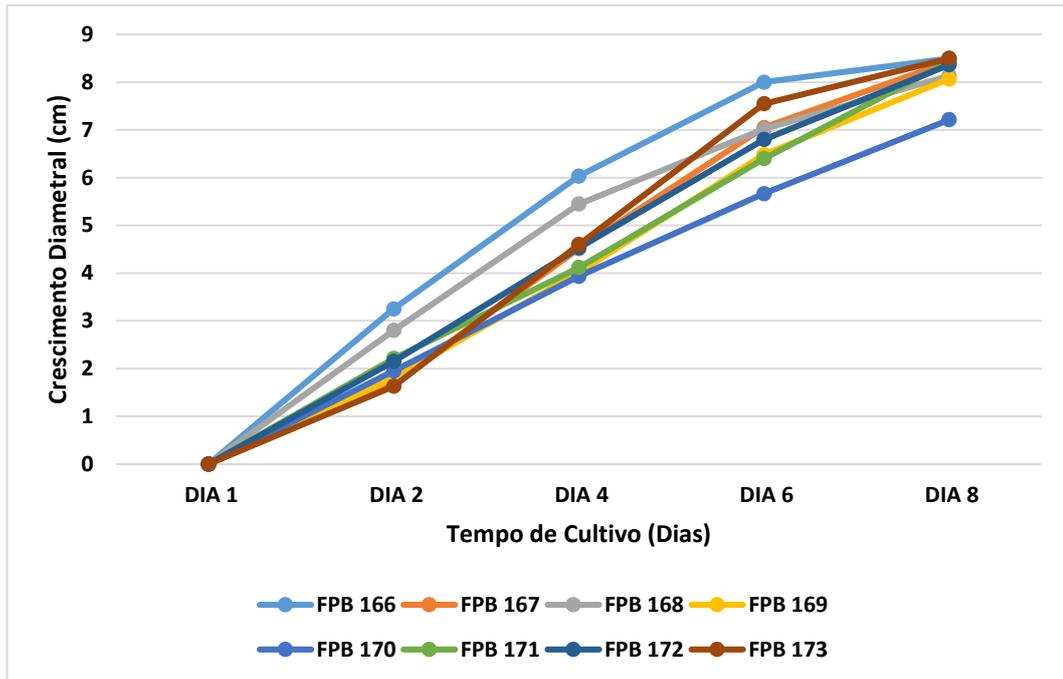


Figura 13. Crescimento micelial dos macro-basidiomicetos quando cultivados em placa de Petri em meio de cultura com Batata-Dextrose-Ágar – com glicose (BDA-C). Fonte: O autor (2019).

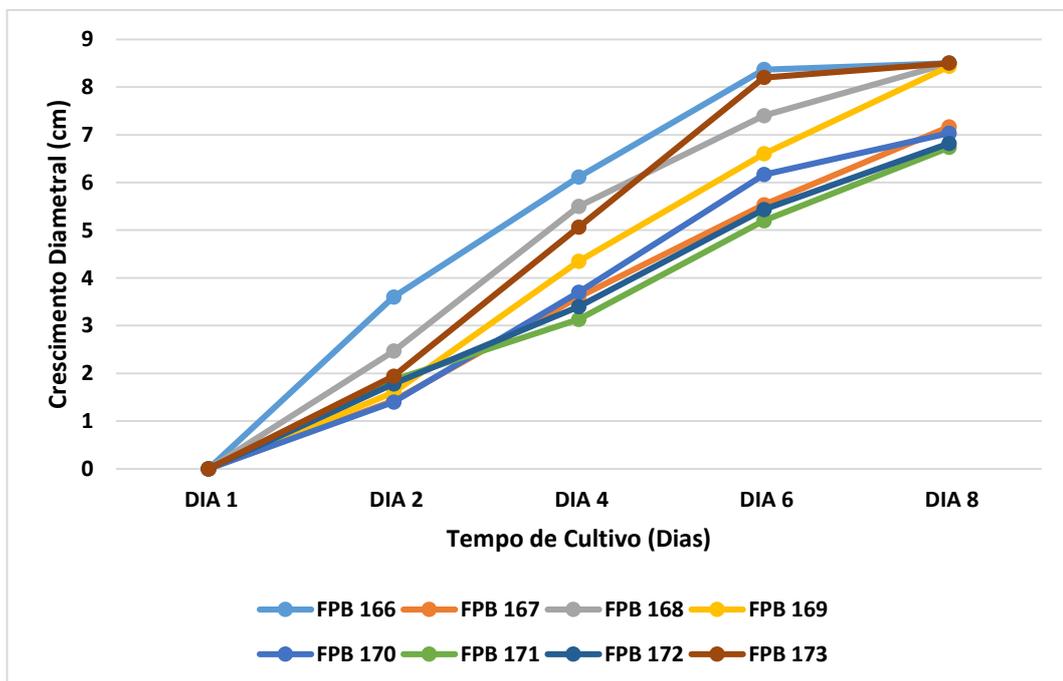


Figura 14. Crescimento micelial dos macro-basidiomicetos quando cultivados em placa de Petri em meio de cultura com Batata-Dextrose-Ágar – sem glicose (BDA-S). Fonte: O autor (2019).

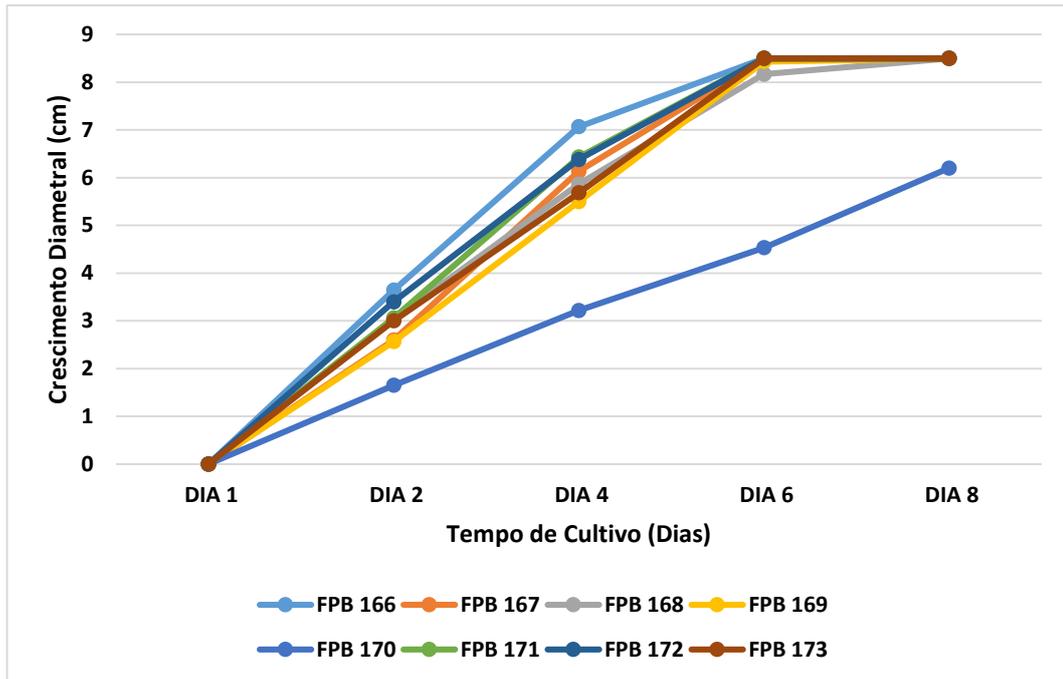


Figura 15. Crescimento micelial dos macro-basidiomicetos quando cultivados em placa de Petri em meio de cultura com Ágar Fibra do Cacho do açai com glicose (FC-C). Fonte: O autor (2019).

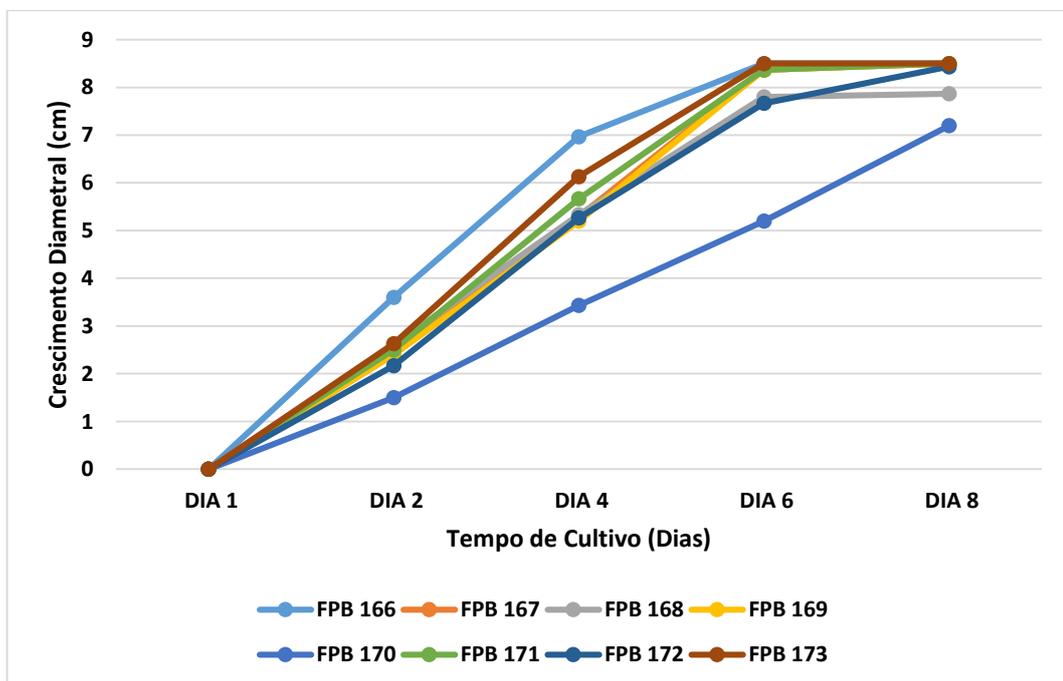


Figura 16. Crescimento micelial dos macro-basidiomicetos quando cultivados em placa de Petri em meio de cultura com Ágar Fibra do Cacho do açai sem glicose (FC-S). Fonte: O autor (2019).

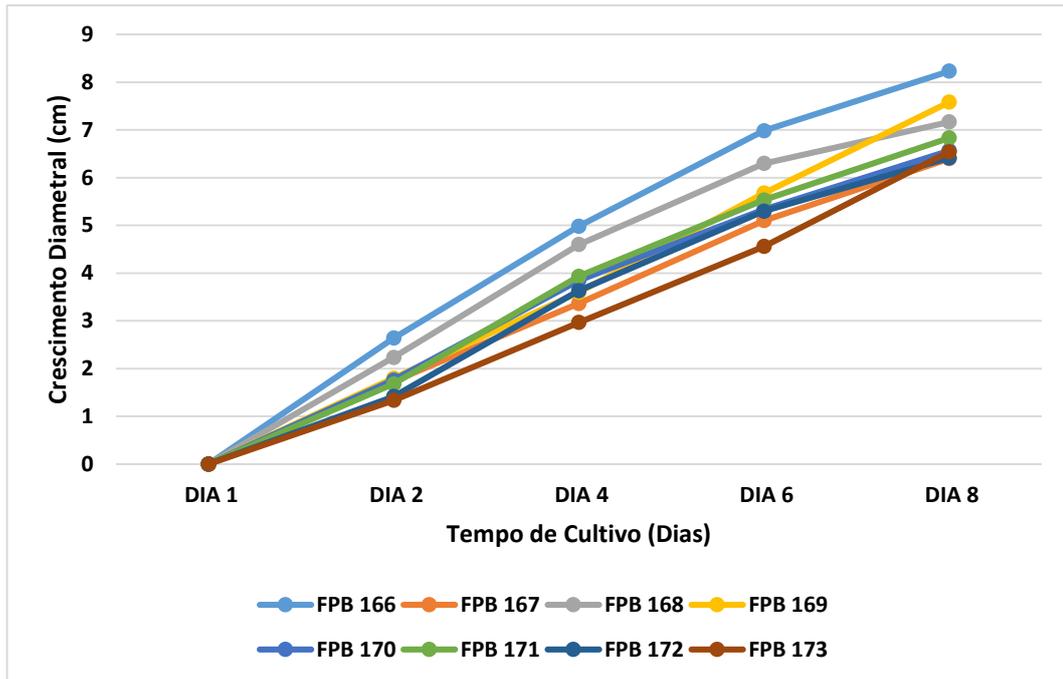


Figura 17. Crescimento micelial dos macro-basidiomicetos quando cultivados em placa de Petri em meio de cultura com Ágar Fibra da Semente do açaí com glicose (FS-C). Fonte: O autor (2019).

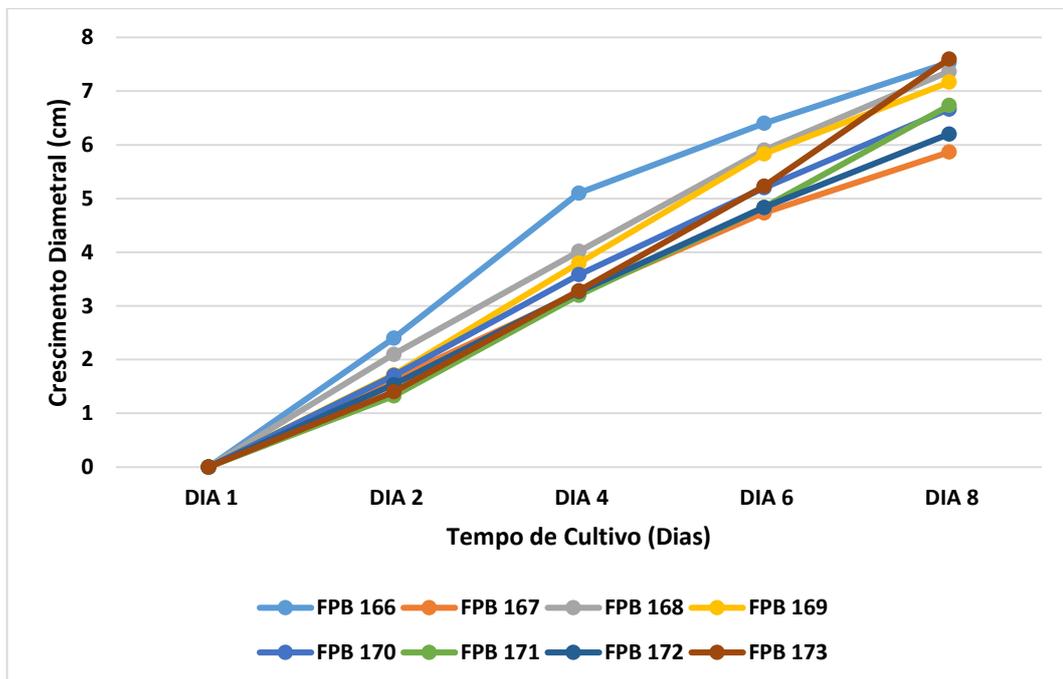


Figura 18. Crescimento micelial dos macro-basidiomicetos quando cultivados em placa de Petri em meio de cultura com Ágar Fibra da Semente do açaí sem glicose (FS-S). Fonte: O autor (2019).

A tabela 4 demonstra resumidamente o comportamento dos macro-basidiomicetos nos diferentes meios utilizados, nos dias 6 e 8 após a inoculação, na presença e ausência de glicose, para três meios distintos. Para o meio feito com Ágar Fibra do Cacho do açaí com

glicose (FC-C) apenas o fungo FPB 170 não colonizou totalmente a placa nas datas avaliadas, já para o meio Ágar Fibra do Cacho do açaí sem glicose (FC-S), três fungos não conseguiram colonizar todo o meio, sendo eles FPB 168, FPB 170 e FPB 172. Para o meio feito com a semente do açaí, Ágar Fibra da Semente do açaí com glicose (FS-C) e Ágar Fibra da Semente do açaí sem glicose (FS-S), não houve crescimento completo dos fungos nas duas datas avaliadas. No meio Batata-Dextrose-Ágar com glicose (BDA-C), apenas os fungos FPB 166 e FPB 173 colonizaram toda a placa após os 8 dias de cultivo, e para o meio Batata-Dextrose-Ágar sem glicose (BDA-S), os mesmos fungos, e o fungo FPB 168, colonizaram toda a placa no mesmo intervalo de tempo.

Tabela 4. Tempo (dias) de colonização Máximo em placa de Petri em diferentes meio de cultura.

Fungos/Meios	Tempo	Fungos/Meios	Tempo
FPB 166/ FC-C	Sexto	FPB 166/ FC-S	Sexto
FPB 167/ FC-C	Sexto	FPB 167/ FC-S	Oitavo
FPB 168/ FC-C	Oitavo	FPB 168/ FC-S	Incompleto
FPB 169/ FC-C	Oitavo	FPB 169/ FC-S	Oitavo
FPB 170/ FC-C	Incompleta	FPB 170/ FC-S	Incompleto
FPB 171/ FC-C	Sexto	FPB 171/ FC-S	Oitavo
FPB 172/ FC-C	Sexto	FPB 172/ FC-S	Incompleto
FPB 173/ FC-C	Sexto	FPB 173/ FC-S	Sexto
FPB 166/ FS-C	Incompleta	FPB 166/ FS-S	Incompleta
FPB 167/ FS-C	Incompleta	FPB 167/ FS-S	Incompleta
FPB 168/ FS-C	Incompleta	FPB 168/ FS-S	Incompleta
FPB 169/ FS-C	Incompleta	FPB 169/ FS-S	Incompleta
FPB 170/ FS-C	Incompleta	FPB 170/ FS-S	Incompleta
FPB 171/ FS-C	Incompleta	FPB 171/ FS-S	Incompleta
FPB 172/ FS-C	Incompleta	FPB 172/ FS-S	Incompleta
FPB 173/ FS-C	Incompleta	FPB 173/ FS-S	Incompleta
FPB 166/ BDA-C	Oitavo	FPB 166/ BDA-S	Oitavo
FPB 167/ BDA-C	Incompleta	FPB 167/ BDA-S	Incompleta
FPB 168/ BDA-C	Incompleta	FPB 168/ BDA-S	Oitavo
FPB 169/ BDA-C	Incompleta	FPB 169/ BDA-S	Incompleta
FPB 170/ BDA-C	Incompleta	FPB 170/ BDA-S	Incompleta
FPB 171/ BDA-C	Incompleta	FPB 171/ BDA-S	Incompleta
FPB 172/ BDA-C	Incompleta	FPB 172/ BDA-S	Incompleta
FPB 173/ BDA-C	Oitavo	FPB 173/ BDA-S	Oitavo

Ágar Fibra do Cacho de açaí com glicose (FC-C); Ágar Fibra do Cacho do açaí sem glicose (FC-S); Ágar Fibra da Semente com glicose (FS-C); Ágar Fibra da Semente do açaí sem glicose (FS-S); Batata-Dextrose-Ágar – com glicose (BDA-C); Batata-Dextrose-Ágar – sem glicose (BDA-S). Oitavo: colonização completa da placa ao oitavo dia; Sexto: colonização da placa ao sexto dia; Incompleta: não houve colonização completa da placa até o final do cultivo.

Os valores da análise de variância foram determinados para avaliar a capacidade de crescimento dos macro-basidiomicetos nos diferentes meios ágar. Nota-se que houve diferença estatística para as fontes de variação, macro-basidiomicetos e meios, assim como para a interação dupla, macro-basidiomicetos x meios, a 5% de probabilidade pelo teste F, para as características de Diâmetro de Crescimento Micelial, quanto para a característica Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (Tabela 5).

De forma geral, a presença de diferença significativa para o desdobramento na análise de variância demonstra a importância dos fatores no desenvolvimento do macro-basidiomiceto, ficando evidente que os fatores estudados podem influenciar de forma negativa ou positiva quanto ao crescimento micelial ao longo dos dias. Desta forma, foi feito um teste de médias para identificar quais fatores influenciam no desenvolvimento dos macro-basidiomicetos nas condições testadas.

Tabela 5. Resumo da análise da variância para Diâmetro de Crescimento do Micélio (DCM) e Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) de Macro-basidiomicetos (MB) em função da composição do Meio de Cultura (M). Gurupi-TO, 2019.

F.V.	G.L.	Q.M.	
		DCM	IVCM
Macro-basidiomiceto (MB)	7	3,916054**	0,156216**
Meio (M)	5	9,592498**	0,470952**
Int. MB x M	35	0,775884**	0,043624**
Erro	96	0,104829	0,003052
C.V. (%)		4,20	6,24

F.V.: Fonte de Variação; G.L.: Grau de Liberdade; Q.M.: Quadrado Médio; DCM: Diâmetro Crescimento Micelial; IVCM: Índice de Velocidade de Crescimento Micelial; C.V.: Coeficiente de Variação. ** significativo a 5% ao teste F.

Analisando as médias apresentadas pelo teste de Scott-Knott para a característica Diâmetro do Crescimento Micelial (Figura 19), pode-se observar que a fonte variação macro-basidiomiceto, quando analisada isoladamente, formou quatro grupos estatísticos, no qual o macro-basidiomiceto FPB 166 diferiu dos demais com maior média e o FPB 170 com a menor média, com diâmetros de 8,29 cm e 6,81 cm, respectivamente,

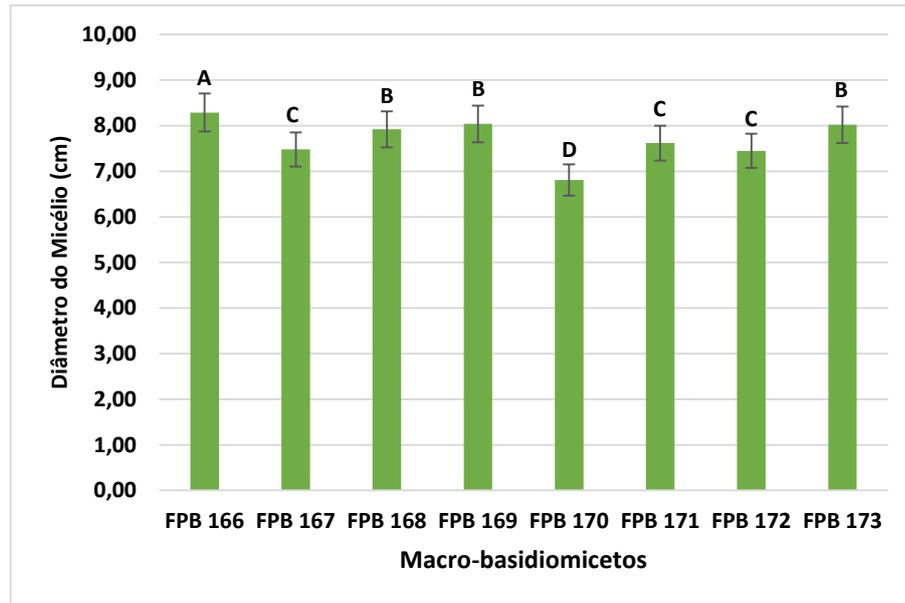


Figura 19: Diâmetro de Crescimento do Micélio (DCM) ao oitavo dia de macro-basidiomicetos: FPB 166, FPB 167, FPB 168, FPB 169, FPB 170, FPB 171, FPB 172, FPB 173. Letras diferentes sobre as barras são significativamente diferentes ($p < 0.05$) no teste Scott-Knott. Fonte: O autor (2019).

Para os meios (Figura 20) foi observado que não houve diferença significativa para os cultivos de BDA-C, FC-C e FC-S com médias respectivas de 8,20 cm, 8,21 cm e 8,25 cm. Nesta análise foram formados três grupos estatísticos, e os meios FS-C e FS-S apresentaram as menores médias, 6,97 cm e 6,89 cm, respectivamente.

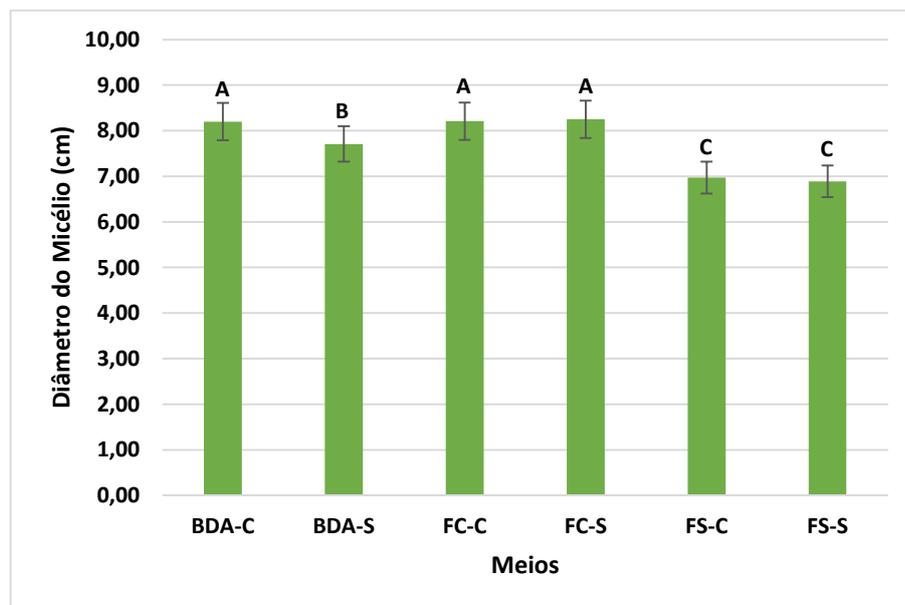


Figura 20. Diâmetro de Crescimento do Micélio (DCM) ao oitavo dia em diferentes meios: BDA-C, BDA-S, FC-C, FC-S, FS-C e FS-S. Letras diferentes sobre as barras são significativamente diferentes ($p < 0.05$) no teste Scott-Knott. Fonte: O autor (2019).

Observando as médias do crescimento dos macro-basidiomicetos em função dos meios de cultura (Figura 21) nota-se que para os meios BDA-C e FC-C apenas o fungo FPB 170 diferiu significativamente dos demais fungos, tendo uma média inferior de 7,21 cm e 6,20 cm, respectivamente. O meio BDA-S obteve suas maiores médias para os fungos FPB 166, FPB 168 e FPB 173, com média de 8,50 cm; e FPB 169 com média de 8,43 cm. Da mesma maneira, no meio FS-S as maiores médias foram para os fungos FPB 166, FPB 168, FPB 169 e FPB 173 com 7,53 cm, 7,36 cm, 7,16 cm e 7,60 cm, respectivamente.

O meio FC-S obteve médias entre 8,43 e 8,50 cm para os fungos FPB 166, FPB 167, FPB 169, FPB 171, FPB 172 e FPB 173 diferindo estatisticamente das demais. Já para o meio FS-C o fungo FPB 166 obteve a maior média (8,23 cm) e se diferiu estatisticamente dos demais fungos.

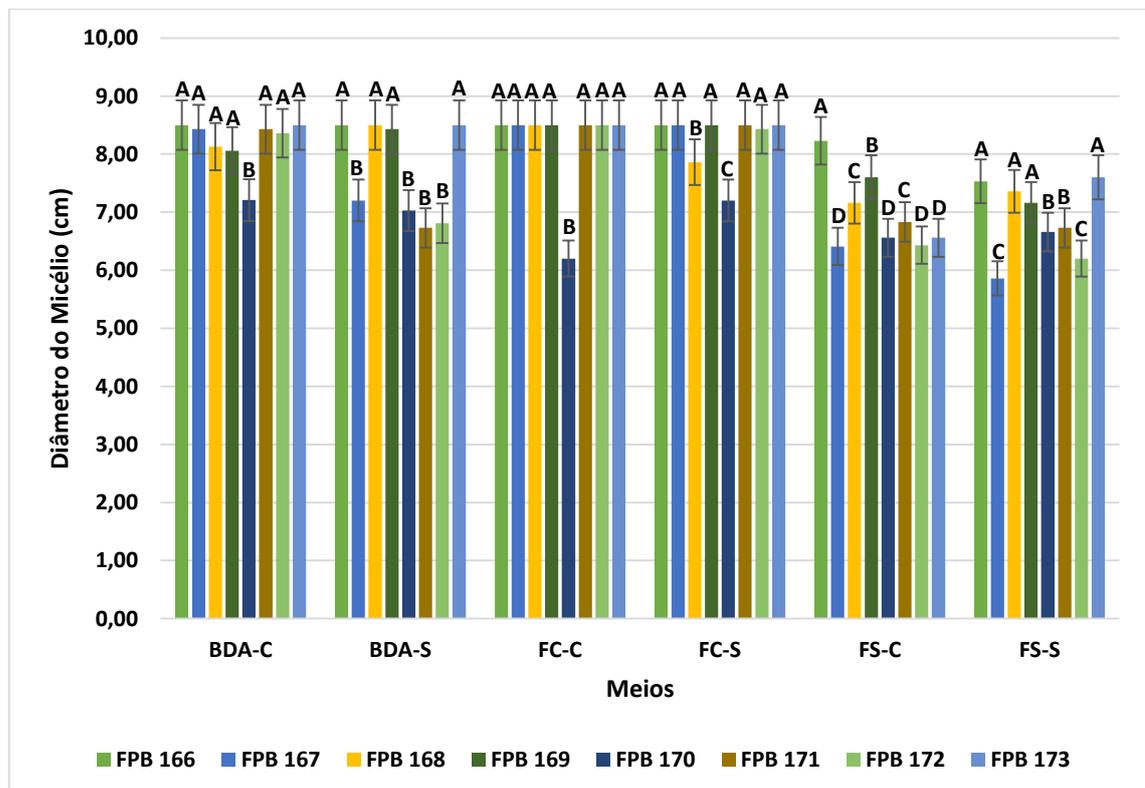


Figura 21. Diâmetro de Crescimento do Micélio (DCM) ao oitavo dia macro-basidiomicetos: FPB 166, FPB 167, FPB 168, FPB 169, FPB 170, FPB 171, FPB 172, FPB 173, em função dos meios: BDA-C, BDA-S, FC-C, FC-S, FS-C e FS-S. Letras diferentes sobre as barras são significativamente diferentes ($p < 0,05$) no teste Scott-Knott. Fonte: O autor (2019).

Na característica Índice de Velocidade de Crescimento do Micélio (Figura 22) constatou-se que, ao analisar isoladamente a fonte de variação macro-basidiomiceto, houveram diferenças estatísticas, sendo que o macro-basidiomiceto FPB 166 e FPB 173

obtiveram as melhores médias, 0,99 e 1,02, respectivamente. Houve a formação de três grupos estatísticos, e o FPB 170 obteve o menor índice (0,72 cm).

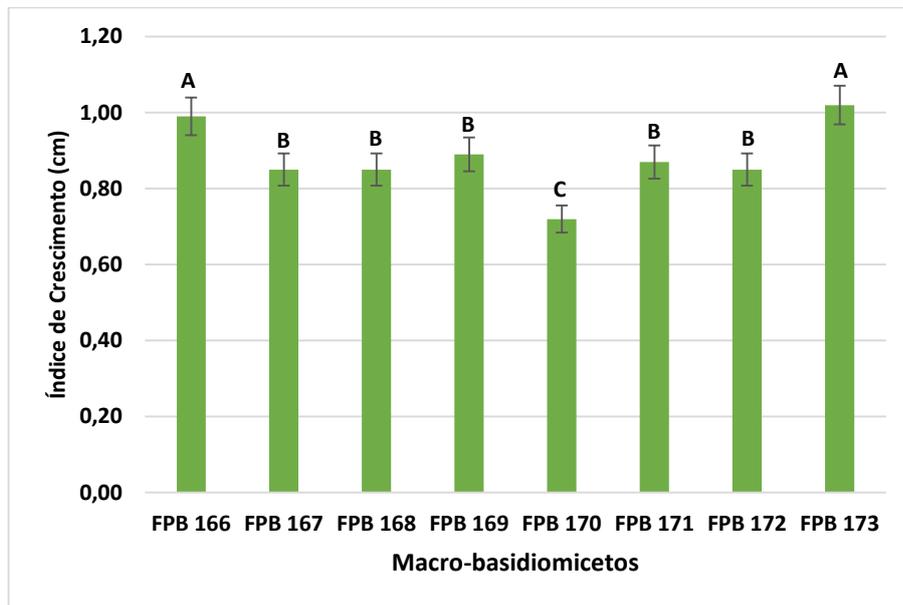


Figura 22. Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) de macro-basidiomicetos: FPB 166, FPB 167, FPB 168, FPB 169, FPB 170, FPB 171, FPB 172, FPB 173. Letras diferentes sobre as barras são significativamente diferentes ($p < 0.05$) no teste Scott-Knott. Fonte: O autor (2019).

Em relação aos meios de cultura, isoladamente, pode-se observar que o meio FC-C apresentou a melhor média de 1,09 cm, sendo superior aos demais meios. Notou-se também que foi formado quatro grupos estatísticos, e os meios FS-C e FS-S apresentaram médias inferiores, de 0,73 cm (Figura 23).

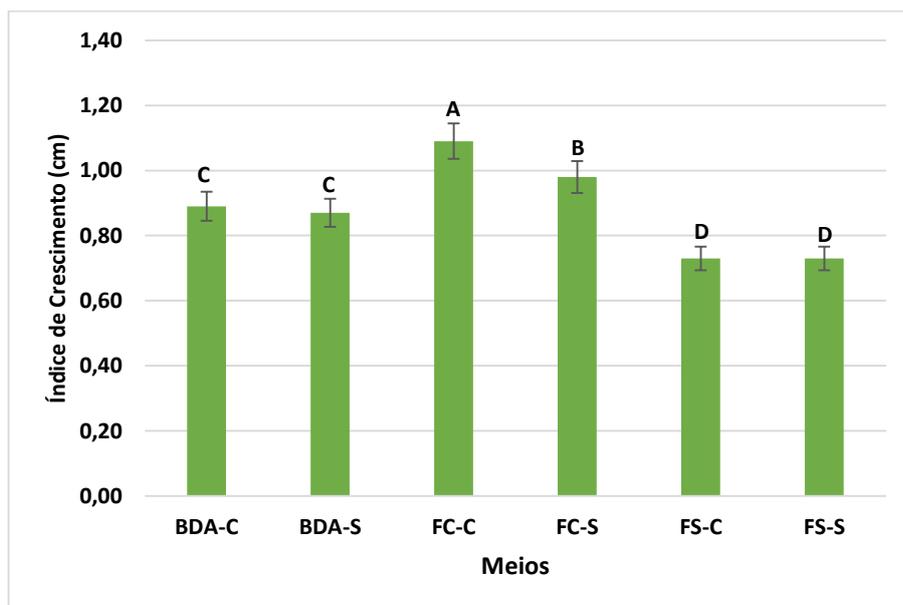


Figura 23. Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) em diferentes meios: BDA-C, BDA-S, FC-C, FC-S, FS-C e FS-S. Letras diferentes sobre as barras são significativamente diferentes ($p < 0.05$) no teste Scott-Knott. Fonte: O autor (2019).

Analisando as médias da interação entre os fungos em função dos meios (Figura 24), nota-se que para o meio BDA-C apenas o macro-basidiomiceto FPB 170 (0,77 cm) foi inferior e diferiu dos demais. Para este meio, a média dos demais variou entre 0,88 cm a 0,93 cm. Já para o BDA-S somente o FPB 173 foi superior aos demais, com média de 1,25 cm. No meio FC-C quatro fungos se destacaram, o FPB 167, FPB 171, FPB 172 e FPB 173, e no meio FC-S os fungos FPB 166 e FPB 173 foram superiores, todos com 1,25 cm de índice.

No meio FS-C dois macro-basidiomicetos foram superiores, o FPB 166 e FPB 169 com médias de 0,89 cm e 0,81 cm, respectivamente. No meio FS-S quatro macro-basidiomicetos foram superiores aos demais, o FPB 166, FPB 168, FPB 169 e FPB 173 com médias de 0,81 cm, 0,79 cm, 0,77 cm e 0,81 cm, respectivamente.

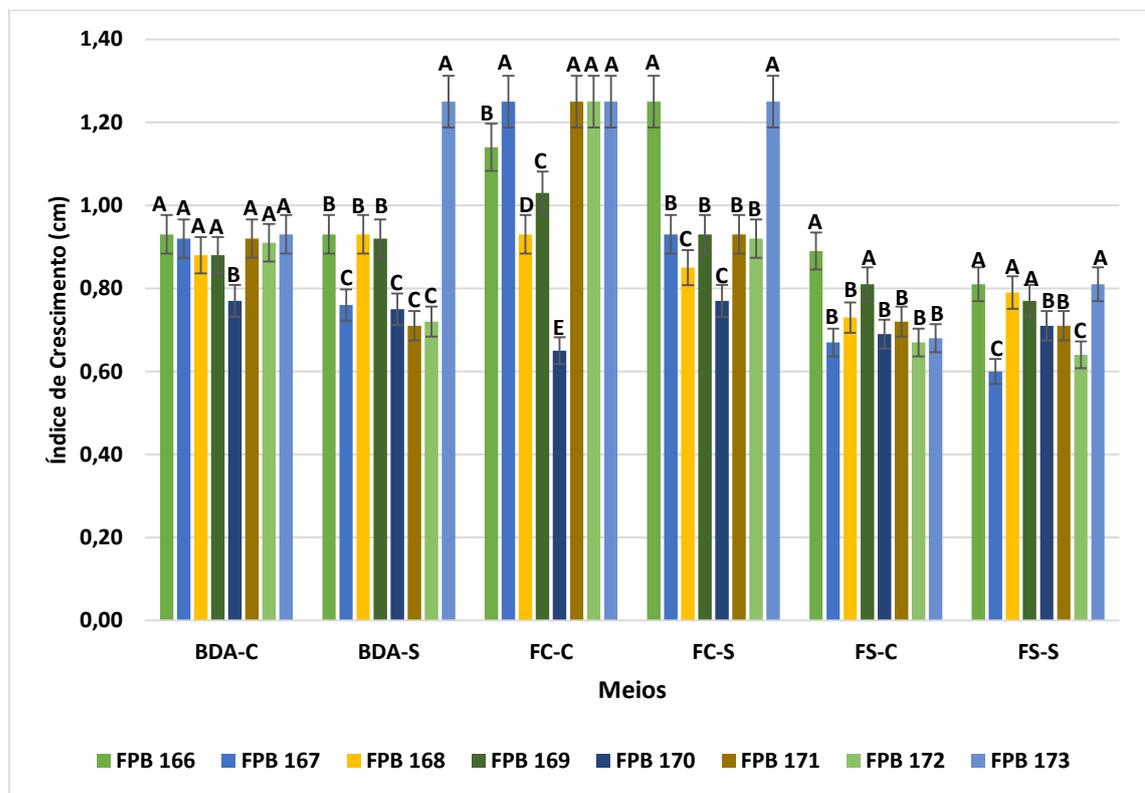


Figura 24. Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) ao oitavo dia macro-basidiomicetos: FPB 166, FPB 167, FPB 168, FPB 169, FPB 170, FPB 171, FPB 172, FPB 173, em função dos meios: BDA-C, BDA-S, FC-C, FC-S, FS-C e FS-S. Letras diferentes sobre as barras são significativamente diferentes ($p < 0,05$) no teste Scott-Knott. Fonte: O autor (2019).

Os resultados para os valores nutricionais e de componentes orgânicos das biomassas do açaí (Tabela 6), como também em BDA, tiveram como destaque em maior concentração de nutrientes: a fibra do cacho do açaí para os macronutrientes cálcio (0,47%) e enxofre (0,10%); e para os micronutrientes cobre (13 mg.kg^{-1}), ferro (171 mg.kg^{-1}), manganês (1117 mg.kg^{-1}), zinco (101 mg.kg^{-1}) e boro (18 mg.kg^{-1}). Para a fibra da semente do açaí obteve

maior relevância os macronutrientes potássio (0,49%) e fósforo (0,27%). O pH para batata, fibra do cacho do açaí e fibra da semente do açaí foram, 6,40, 5,70 e 4,90, respectivamente.

Tabela 6. Valores nutricionais e de componentes orgânicos da Batata inglesa (BDA), Fibra do Cacho do açaí (FC) e Fibra da Semente do açaí (FS).

Analises	Unidade	Batata Dextrose Agar (BDA)	Fibra do Cacho do açaí (FC)	Fibra da Semente do açaí (FS)
pH (CaCl ₂ 0,01M)	pH	6,40	5,70	4,90
Densidade	g.cm ⁻³	0,54	0,21	0,44
Umidade Perdida a 60-65 °C	%	88,18	5,25	8,86
Umidade Perdida entre 65 e 110 °C	%	1,05	5,43	4,47
Umidade Total	%	89,23	10,68	13,32
Materiais Inertes	%	0,00	0,00	0,00
Nitrogênio Total	%	0,08	0,39	0,38
Mat. Orgânica Total (Combustão)	%	10,34	85,32	87,83
Mat. Orgânica Compostável	%	7,03	55,93	64,26
Mat. Orgânica Resistente a Compostagem	%	3,31	29,39	23,57
Carbono Total (Orgânico e Mineral)	%	5,74	47,40	48,79
Carbono Orgânico	%	3,91	31,07	35,70
Resíduo Mineral Total	%	0,43	4,23	3,00
Resíduo Mineral Insolúvel	%	0,03	1,27	2,01
Resíduo Mineral Solúvel	%	0,40	2,96	0,99
Relação C/N (C Total e N Total)	----	72/1	122/1	128/1
Relação C/N (C Orgânico e N Total)	----	49/1	80/1	94/1
Fósforo Total	%	0,06	0,21	0,27
Potássio Total	%	0,25	0,34	0,49
Cálcio Total	%	0,01	0,47	0,09

Magnésio Total	%	0,01	0,07	0,07
Enxofre Total	%	0,02	0,10	0,08
Boro Total	mg.kg ⁻¹	1	18	8
Cobre Total	mg.kg ⁻¹	1	13	9
Ferro Total	mg.kg ⁻¹	8	171	70
Manganês Total	mg.kg ⁻¹	1	1117	190
Zinco Total	mg.kg ⁻¹	2	101	11
Sódio Total	mg.kg ⁻¹	4	3	3

Fonte: Laboratório de Análise Agrícolas do Tocantins (2019).

5.3 CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DOS MACRO-BASIDIOMICETOS EM BIOMASSAS RESIDUAIS DO AÇAÍ.

O estudo foi mensurado partindo da hipótese que os fungos decompositores de madeira produzem enzimas lignocelulolíticas capazes de desconstruir a parede celular vegetal para a obtenção de nutrientes e consequente metabolismo celular. Deste modo, os oito macro-basidiomicetos, previamente avaliados quanto a capacidade de crescimento em meio ágar (enriquecido), foram avaliados quanto a capacidade de crescimento micelial e atividades enzimáticas, quando submetidos a cultivo em estado sólido contendo biomassas residuais do açaí, individuais ou combinadas, como fonte de carbono/nitrogênio (Figura 25).

De modo geral, o substrato que melhor proporcionou crescimento aos macro-basidiomicetos avaliados foi a formulação da fibra do cacho 100%, enquanto que o menor resultado foi a formulação fibra da semente 100%. A capacidade de degradação pode variar entre espécie e isolados fúngicos de mesma espécie, quando crescidos em CES contendo substratos com diferentes características bromatológicas (MEYSAMI e BAHERI, 2003).

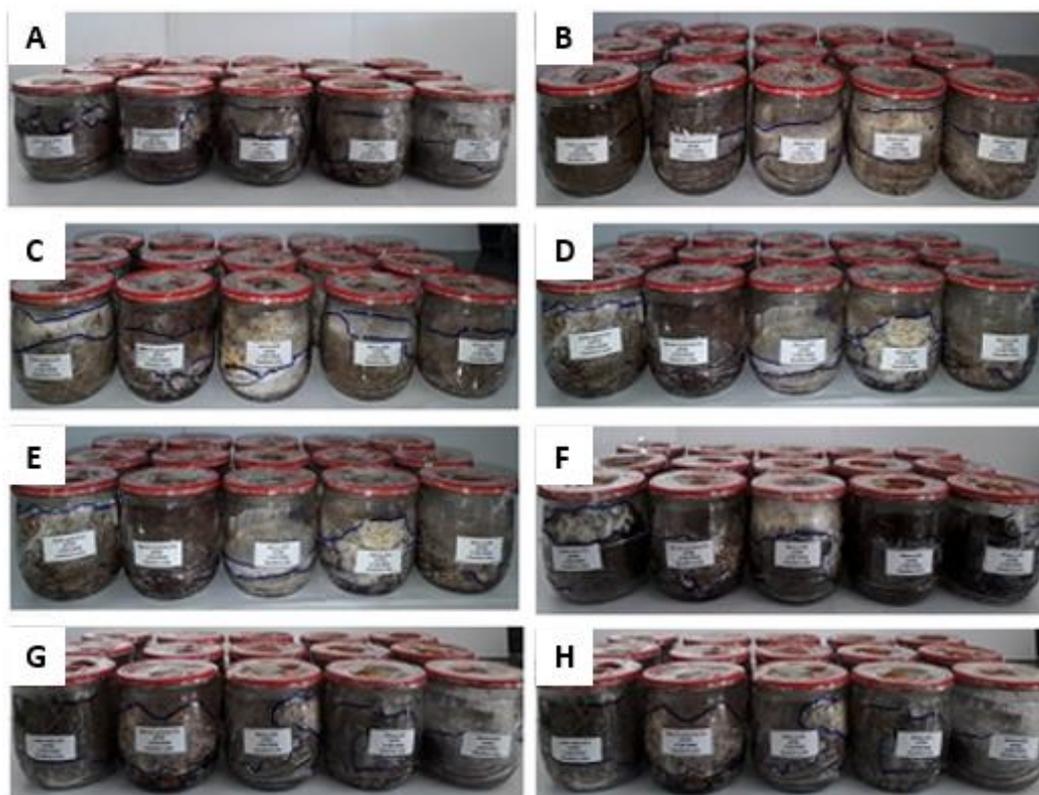


Figura 25. Macro-basidiomicetos após 21 dias de incubação em B.O.D sob cultivo em estado sólido usando cinco formulações a base de biomassa lignocelulósica da agroindústria do açaí (Fibra do Cacho do açaí, Fibra da Semente do açaí e mistura: Cacho+semente nas proporções: (50:50), (80:20) (20:80). Macro-basidiomicetos: FPB 166 (A); FPB 167 (B); FPB 168 (C); FPB 169 (D); FPB 170 (E); FPB 171 (F); FPB 172 (G); FPB 173 (H). Fonte: O autor (2018).

Os valores da análise de variância (Tabela 7), mostraram que houve diferença estatística para as fontes de variação, macro-basidiomicetos e formulações, assim como para a interação dupla, macro-basidiomicetos x formulações, a 5% de probabilidade pelo teste F, para as enzimas β -glicosidase, CMCase, pectinase e xilanase.

A presença de diferença significativa para o desdobramento na análise de variância demonstra a importância dos fatores nos resultados enzimáticos, e fica evidente que os fatores estudados podem influenciar de forma negativa ou positiva a produção enzimática. Assim, foi feito um teste de médias para identificar quais fatores influenciam e quais enzimas são influenciadas.

Tabela 7. Resumo da análise da variância para as enzimas β -glicosidase, CMCase, pectinase e xilanase de Macro-basidiomicetos (MB) cultivados em diferentes Formulações de meios (F). Gurupi-TO, 2019.

F.V.	G.L.	Q.M.			
		β -glicosidade	CMCase	Pectinase	Xilanase
Macro-basidiomicetos (MB)	7	0,025431**	0,073713**	0,962787**	1,099334**
Formulações (F)	4	0,080946**	0,152813**	0,569776**	0,704430**
Int. F x MB	28	0,004360**	0,010912**	0,029376**	0,036404**
erro	80	0,000702	0,001052	0,002967	0,005799
C.V. (%)		27,05	25,80	14,80	17,42

F.V.: Fonte de Variação; G.L.: Grau de Liberdade; Q.M.: Quadrado Médio; C.V.: Coeficiente de Variação; ** significativo a 5% ao teste F;

Analisando isoladamente a fonte de variação macro-basidiomicetos observou-se que, para a produção da enzima β -glicosidase (Figura 26), foram formados quatro grupos estatísticos em que o macro-basidiomiceto FPB 167 obteve maior produção de enzimas diferenciando estatisticamente dos demais ($0,167 \text{ U.gss}^{-1}$) e o macro-basidiomiceto FPB 170 obteve a menor média ($0,023 \text{ U.gss}^{-1}$).

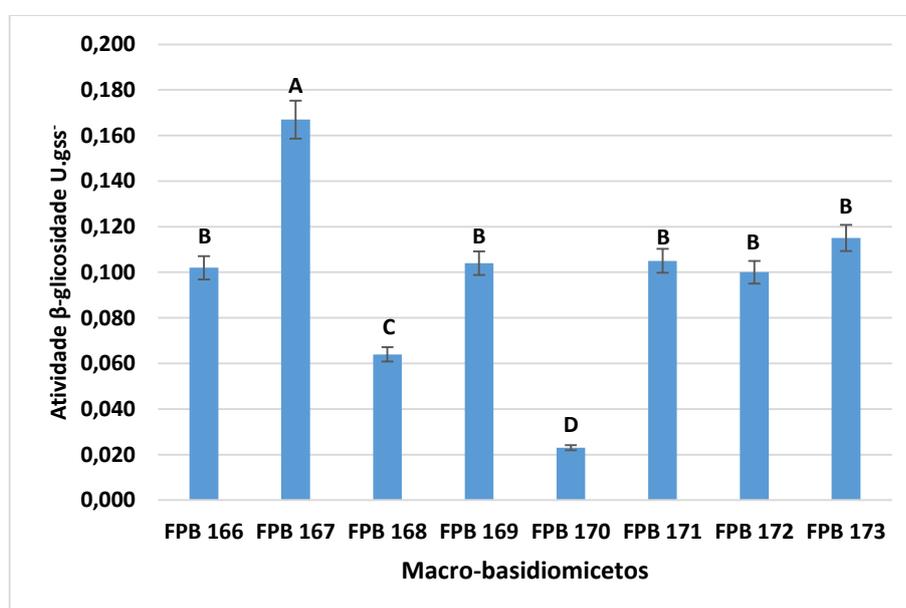


Figura 26. Atividade β -glicosidase dos extratos obtidos em CES de macro-basidiomicetos cultivados nos substratos lignocelulolíficos da agroindústria do açaí. Macro-basidiomicetos: FPB 166, FPB 167, FPB 168, FPB 169, FPB 170, FPB 171, FPB 172, FPB 173. Letras diferentes sobre as barras são significativamente diferentes ($p < 0,05$) no teste Scott-Knott. Fonte: O autor (2019).

Observando isoladamente as formulações (Figura 27), para a produção da enzima β -glicosidase, percebe-se que houve a formação de cinco grupos estatísticos, no qual a formulação F1 obteve maior média e se diferiu das demais ($0,187 \text{ U.gss}^{-1}$), seguido pela

formulação F4 com média de $0,118 \text{ U.gss}^{-1}$. A menor média foi observada para a formulação de substrato F2, com valor de $0,038 \text{ U.gss}^{-1}$.

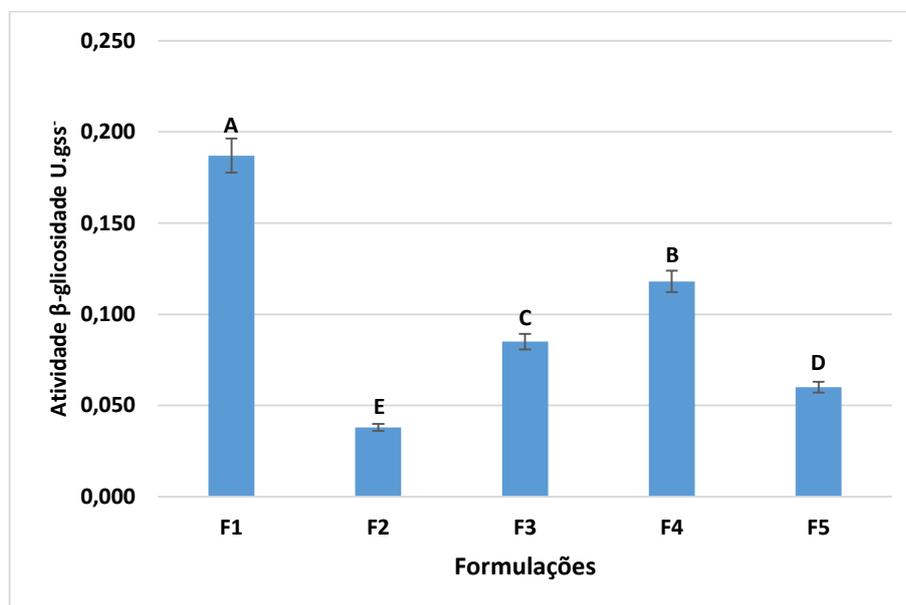


Figura 27. Atividade β-glicosidase dos extratos obtidos em CES de macro-basidiomicetos cultivados nas Formulações da agroindústria do açaí. Formulações: F1 (100%FC), F2 (100%FS), F3 (50%FC e 50%FS), F4 (80%FC e 20%FS) e F5 (20%FC e 80%FS). Letras diferentes sobre as barras são significativamente diferentes ($p < 0,05$) no teste Scott-Knott. Fonte: O autor (2019).

Com o desdobramento da variável macro-basidiomiceto dentro da formulação (Figura 28) foi possível observar o comportamento da atividade β-glicosidase de cada fungo dentro das diferentes formulações. Para a formulação F1 foi observado a formação de 5 grupos estatísticos, cujo os fungos FPB 166 e FPB 167 diferiram significativamente dos demais, com médias de $0,319 \text{ U.gss}^{-1}$ e $0,281 \text{ U.gss}^{-1}$ respectivamente. O fungo de menor atividade enzimática para esta formulação foi o FPB 170, que apresentou uma média de $0,033 \text{ U.gss}^{-1}$.

Para as formulações F2 e F5 ocorreu o arranjo de dois grupos estatísticos, já nas formulações F3 e F4 ocorreram três grupos distintos significativamente. O macro-basidiomiceto FPB 167 diferiu significativamente dos demais fungos nas formulações F2, F3 e F5, com médias de, respectivamente, $0,107 \text{ U.gss}^{-1}$, $0,149 \text{ U.gss}^{-1}$ e $0,119 \text{ U.gss}^{-1}$. Já na formulação F4, cinco macro-basidiomicetos foram superiores aos demais estatisticamente, os FPB 167, FPB 169, FPB 171, FPB 172 e FPB 173 com médias de $0,180 \text{ U.gss}^{-1}$, $0,150 \text{ U.gss}^{-1}$, $0,136 \text{ U.gss}^{-1}$, $0,130 \text{ U.gss}^{-1}$ e $0,141 \text{ U.gss}^{-1}$, respectivamente.

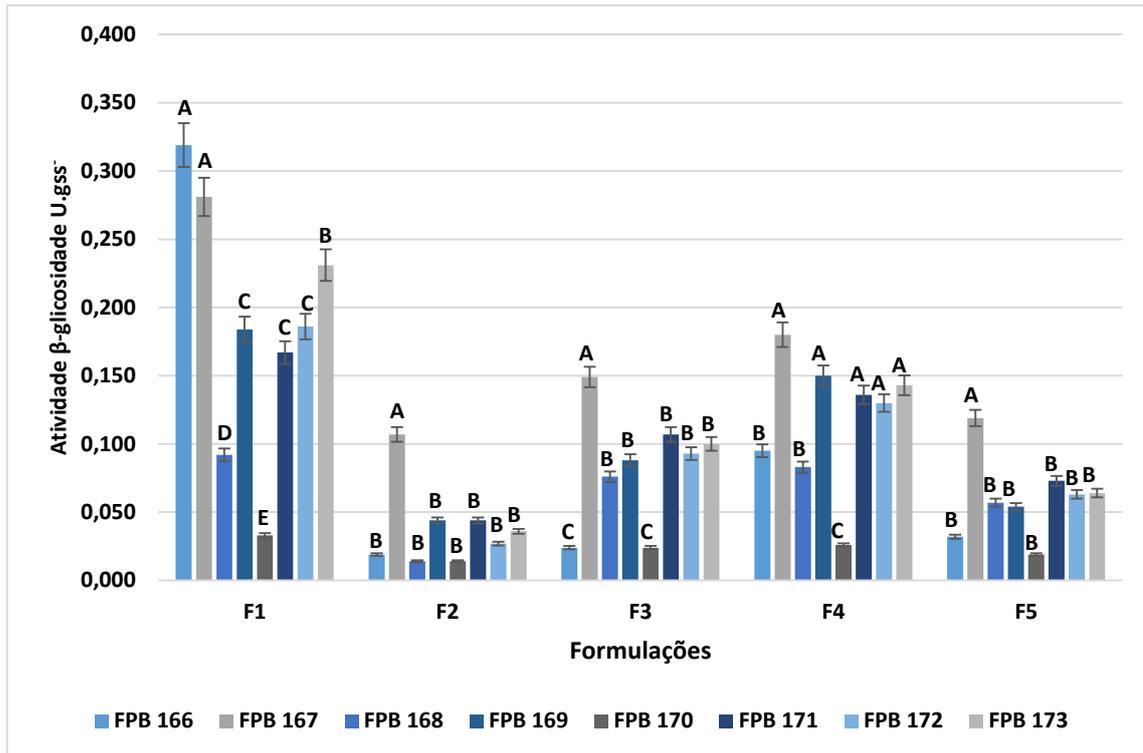


Figura 28. Atividade β-glicosidase dos extratos obtidos em CES dos macro-basidiomicetos: FPB 166, FPB 167, FPB 168, FPB 169, FPB 170, FPB 171, FPB 172, FPB 173; em função das Formulações: F1 (100%FC), F2 (100%FS), F3 (50%FC e 50%FS), F4 (80%FC e 20%FS) e F5 (20%FC e 80%FS). Letras diferentes sobre as barras são significativamente diferentes ($p < 0,05$) no teste Scott-Knott. Fonte: O autor (2019).

Avaliando a enzima CMCCase (Figura 29), é possível observar que houve diferença entre os macro-basidiomicetos quando comparadas isoladamente, onde o FPB 167 diferiu significativamente dos demais com a maior média de $0,260 \text{ U.gss}^{-1}$, enquanto o FPB 170 apresentou a menor média com $0,019 \text{ U.gss}^{-1}$.

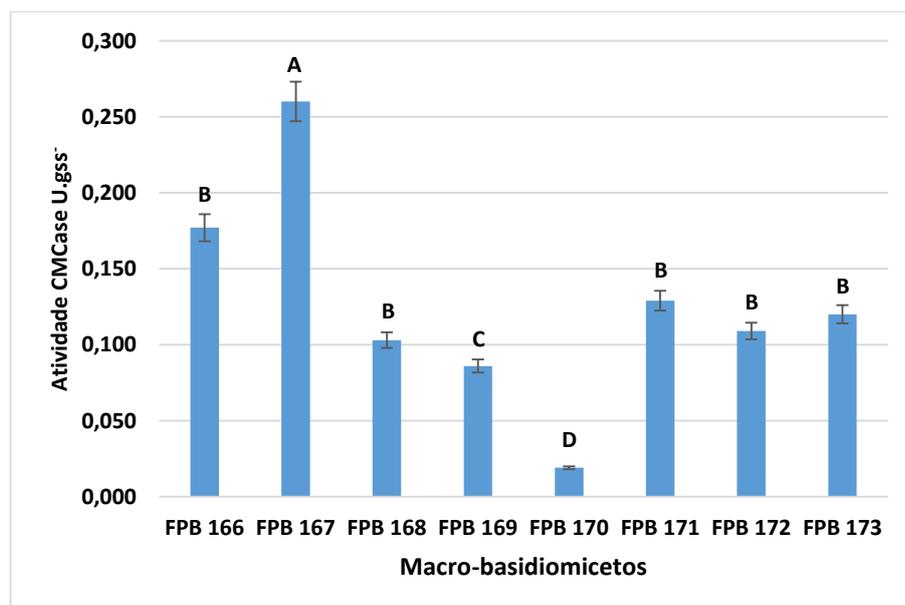


Figura 29. Atividade CMCCase dos extratos obtidos em CES de macro-basidiomicetos cultivados nos substratos lignocelulolíticos da agroindústria do açúcar. Macro-basidiomicetos: FPB 166, FPB 167, FPB 168, FPB 169, FPB

170, FPB 171, FPB 172, FPB 173. Letras diferentes sobre as barras são significativamente diferentes ($p < 0.05$) no teste Scott-Knott. Fonte: O autor (2019).

A atividade da enzima CMCase, analisada somente para as formulações, (Figura 30) mostrou diferença significativa para todas as formulações, e verifica-se que a formulação F1 diferiu das demais, com a maior média, $0,245 \text{ U.gss}^{-1}$, e a formulação F2 com $0,038 \text{ U.gss}^{-1}$, foi observada como a menor média.

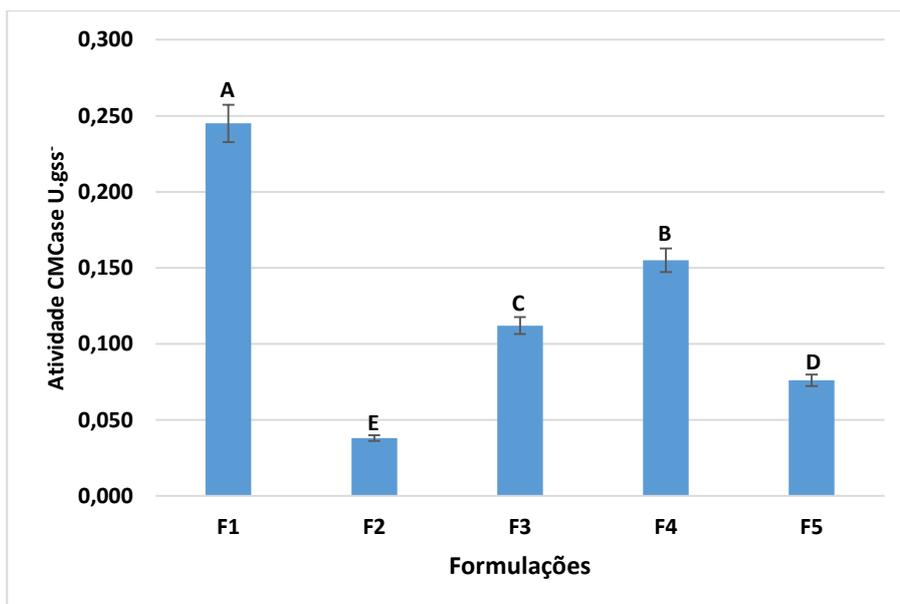


Figura 30: Atividade CMCase dos extratos obtidos em CES de macro-basidiomicetos cultivados nas Formulações da agroindústria do açaí. Formulações: F1 (100%FC), F2 (100%FS), F3 (50%FC e 50%FS), F4 (80%FC e 20%FS) e F5 (20%FC e 80%FS). Letras diferentes sobre as barras são significativamente diferentes ($p < 0.05$) no teste Scott-Knott. Fonte: O autor (2019).

A interação dos fungos em função das formulações para a enzima CMCase (Figura 31) demonstrou que o macro-basidiomiceto FPB 167 teve maiores médias nas formulações F3 ($0,305 \text{ U.gss}^{-1}$), F4 ($0,360 \text{ U.gss}^{-1}$) e F5 ($0,190 \text{ U.gss}^{-1}$), e houve a formação de três, quatro e dois grupos estatísticos, respectivamente. Para a F1, originou-se cinco grupos estatísticos, e identifica-se a diferença significativa para o FPB 166, com média $0,486 \text{ U.gss}^{-1}$, seguido do FPB 167, média de $0,386 \text{ U.gss}^{-1}$.

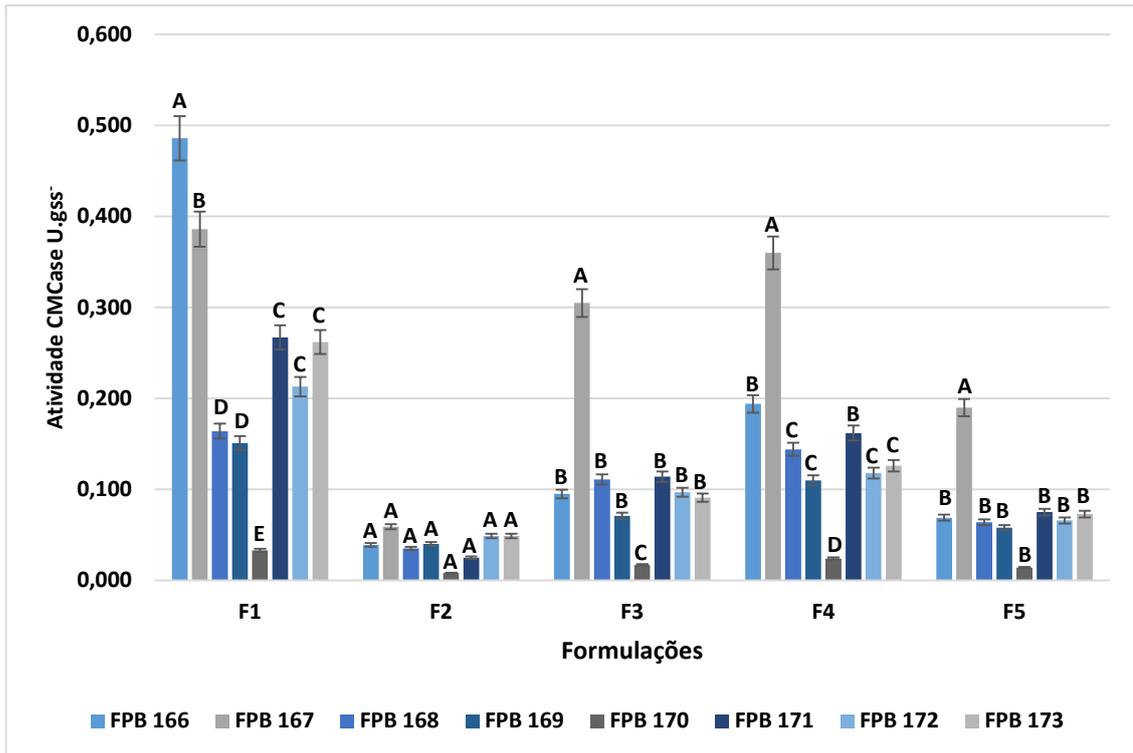


Figura 31. Atividade CMCase dos extratos obtidos em CES dos macro-basidiomicetos: FPB 166, FPB 167, FPB 168, FPB 169, FPB 170, FPB 171, FPB 172, FPB 173; em função das Formulações: F1 (100%FC), F2 (100%FS), F3 (50%FC e 50%FS), F4 (80%FC e 20%FS) e F5 (20%FC e 80%FS). Letras diferentes sobre as barras são significativamente diferentes ($p < 0.05$) no teste Scott-Knott. Fonte: O autor (2019).

A enzima envolvida na degradação da pectina (carboidratos de parede celular vegetal) – pectinase – foi avaliada nos extratos enzimáticos obtido após a CES de biomassa de açaí (Figura 32). Os resultados mensuram a formação de seis grupos estatísticos, e o maior destaque para os fungos FPB 166 e FPB 173, com as médias de $0,664 \text{ U.gss}^{-1}$ e $0,615 \text{ U.gss}^{-1}$ respectivamente. O FPB 170 obteve a menor média, com $0,049 \text{ U.gss}^{-1}$.

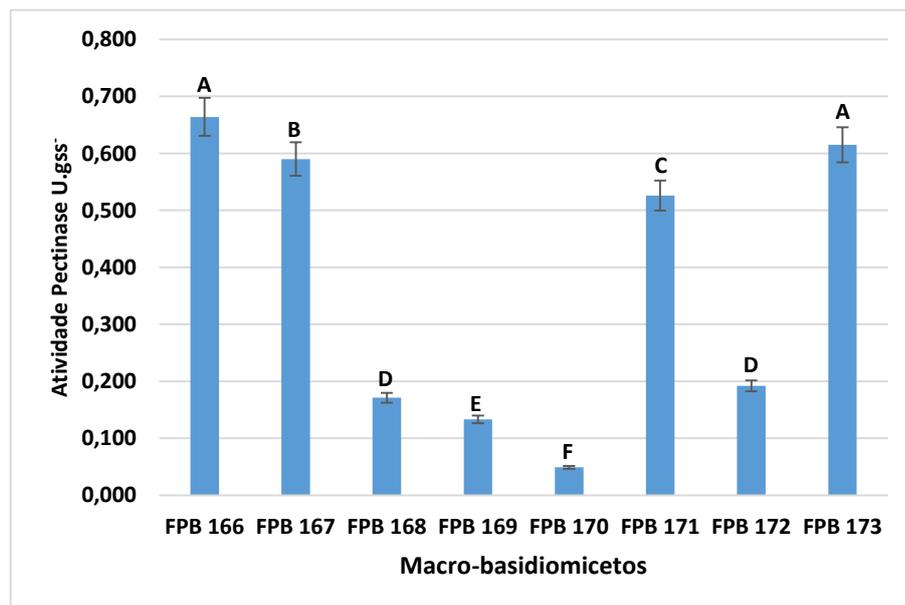


Figura: 32. Atividade pectinase dos extratos obtidos em CES de macro-basidiomicetos cultivados nos substratos lignocelulolíticos da agroindústria do açaí. Macro-basidiomicetos: FPB 166, FPB 167, FPB 168, FPB 169, FPB

170, FPB 171, FPB 172, FPB 173. Letras diferentes sobre as barras são significativamente diferentes ($p < 0.05$) no teste Scott-Knott. Fonte: O autor (2019).

Para os resultados da pectinase, exclusivamente das formulações, constata-se que houve a formação de cinco grupos estatísticos, onde todas as formulações se diferiram estatisticamente uma das outras, e que a formulação F1 ($0,565 \text{ U.gss}^{-1}$) obteve maior atividade, seguido pela F4 ($0,459 \text{ U.gss}^{-1}$). A menor média foi da F2 ($0,169 \text{ U.gss}^{-1}$) (Figura 33).

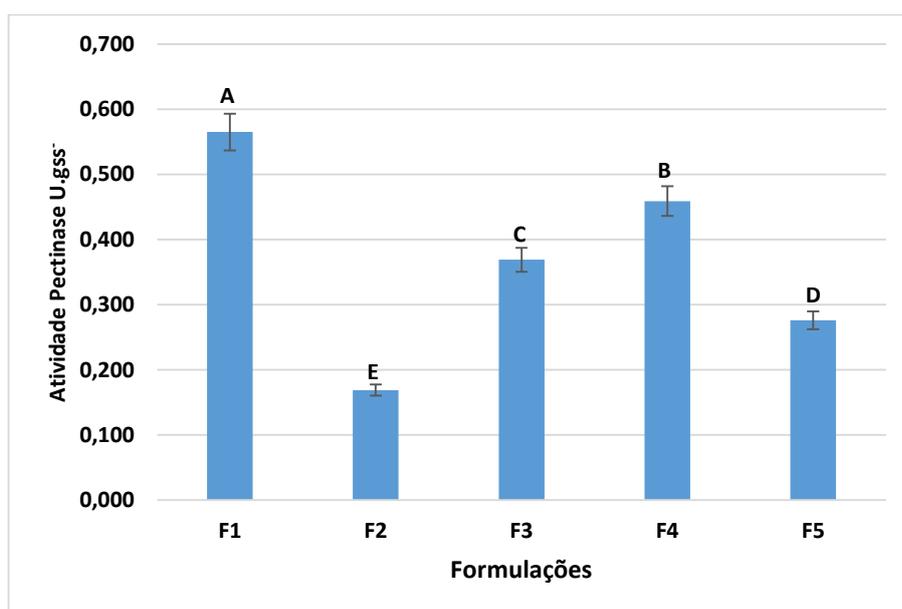


Figura 33. Atividade pectinase dos extratos obtidos em CES de macro-basidiomicetos cultivados nas Formulações da agroindústria do açaí. Formulações: F1 (100%FC), F2 (100%FS), F3 (50%FC e 50%FS), F4 (80%FC e 20%FS) e F5 (20%FC e 80%FS). Letras diferentes sobre as barras são significativamente diferentes ($p < 0.05$) no teste Scott-Knott. Fonte: O autor (2019).

Analisando a interação entre os macro-basidiomicetos em função das formulações (Figura 34), os macro-basidiomicetos FPB 166, FPB 167 e FPB 173 diferenciaram estatisticamente dos demais nas formulações F1, F3 e F4. Os valores médios de FPB 166 observados para F1, F3 e F4 foram de $0,956 \text{ U.gss}^{-1}$, $0,646 \text{ U.gss}^{-1}$ e $0,757 \text{ U.gss}^{-1}$, para o FPB 167 nas formulações F1, F3 e F4, os valores foram de $0,896 \text{ U.gss}^{-1}$, $0,594 \text{ U.gss}^{-1}$ e $0,747 \text{ U.gss}^{-1}$ e para o FPB 173 nas formulações F1, F3 e F4, os valores observados foram de $0,938 \text{ U.gss}^{-1}$, $0,665 \text{ U.gss}^{-1}$ e $0,829 \text{ U.gss}^{-1}$, respectivamente. Em F1 e F4 foi observado cinco grupos estatísticos e em F3 quatro grupos.

Para F2 e F5 apenas o macro-basidiomiceto FPB 166 diferiu dos demais, com médias de $0,416 \text{ U.gss}^{-1}$ e $0,544 \text{ U.gss}^{-1}$, respectivamente, apresentando os melhores resultados para

esta enzima nestas condições específicas, e ambas as formulações houve a formação de três grupos estatísticos.

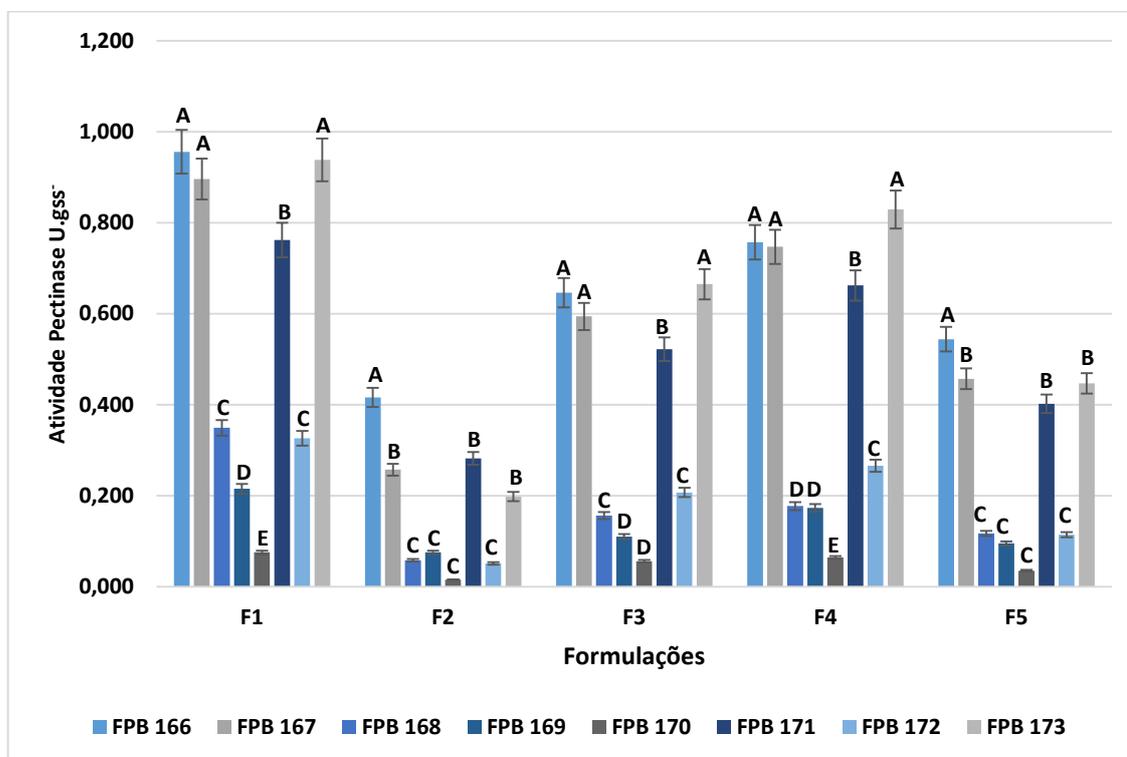


Figura 34. Atividade pectinase dos extratos obtidos em CES das Formulações: F1 (100%FC), F2 (100%FS), F3 (50%FC e 50%FS), F4 (80%FC e 20%FS) e F5 (20%FC e 80%FS); em função dos macro-basidiomicetos: FPB 166, FPB 167, FPB 168, FPB 169, FPB 170, FPB 171, FPB 172, FPB 173. Letras diferentes sobre as barras são significativamente diferentes ($p < 0.05$) no teste Scott-Knott. Fonte: O autor (2019).

A capacidade de degradação de hemicelulose dos fungos neste trabalho foi determinada em função da atividade xilanase (endo-1,4- β -xilanase). Observou individualmente os valores da atividade enzimática xilanase para os macro-basidiomicetos (Figura 35), e notou-se que houve diferença significativa para o FPB 169, sendo superior aos demais fungos, seguido pelo FPB 166 com valores médios de $0,766 \text{ U.gss}^{-1}$ e $0,708 \text{ U.gss}^{-1}$, respectivamente. O FPB 170 teve menor média, $0,058 \text{ U.gss}^{-1}$, e originaram-se seis grupos estatísticos.

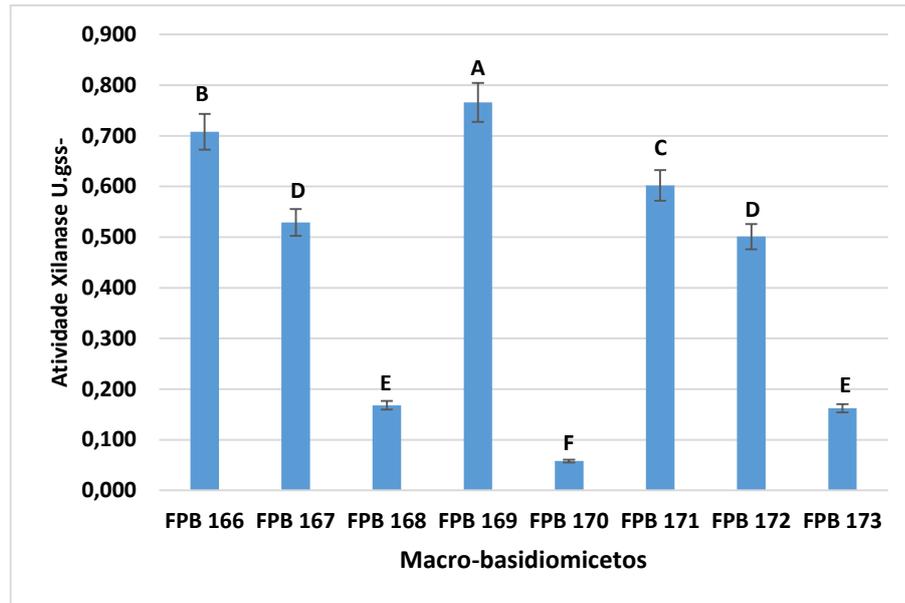


Figura 35. Atividade xilanase dos extratos obtidos em CES de macro-basidiomicetos cultivados nos substratos lignocelulolíticos da agroindústria do açaí. Macro-basidiomicetos: FPB 166, FPB 167, FPB 168, FPB 169, FPB 170, FPB 171, FPB 172, FPB 173. Letras diferentes sobre as barras são significativamente diferentes ($p < 0,05$) no teste Scott-Knott. Fonte: O autor (2019).

Para as formulações (Figura 36), houve diferença significativa entre todas, e originou a formação de cinco grupos estatísticos. A formulação F1 foi estatisticamente superior aos demais, seguida pela F4 com médias de $0,649 \text{ U.gss}^{-1}$ e $0,540 \text{ U.gss}^{-1}$, respectivamente. A F2 obteve a menor média entre todos $0,204 \text{ U.gss}^{-1}$.

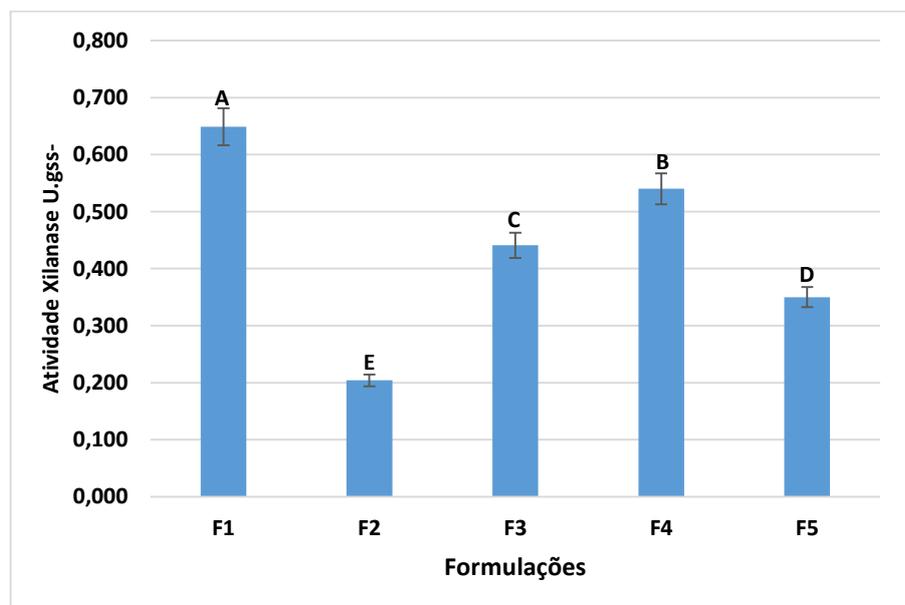


Figura 36. Atividade xilanase dos extratos obtidos em CES de macro-basidiomicetos cultivados nas Formulações da agroindústria do açaí. Formulações: F1 (100%FC), F2 (100%FS), F3 (50%FC e 50%FS), F4 (80%FC e 20%FS) e F5 (20%FC e 80%FS). Letras diferentes sobre as barras são significativamente diferentes ($p < 0,05$) no teste Scott-Knott. Fonte: O autor (2019).

A atividade enzimática da xilanase dos fungos em função das formulações (Figura 37) demonstra que para as formulações F3, F4 e F5, os macro-basidiomicetos FPB 166 e FPB 169 foram superiores estatisticamente em relação aos demais. Na F3 os valores de FPB 166 e FPB 169 foram de 0,811 U.gss⁻¹ e 0,833 U.gss⁻¹, para a F4 os valores de FPB 166 e FPB 169 foram de 0,906 U.gss⁻¹ e 0,915 U.gss⁻¹, já na F5 os valores de FPB 166 e FPB 169 foram de 0,610 U.gss⁻¹ e 0,719 U.gss⁻¹, respectivamente. Houve a formação de quatro grupos estatísticos para F4 e F5, e três grupos para F3.

Na F1, os macro-basidiomicetos FPB 166, FPB 169, FPB 171 e FPB 172 foram superiores aos demais com médias de 0,948 U.gss⁻¹, 0,950 U.gss⁻¹, 0,887 U.gss⁻¹ e 0,916 U.gss⁻¹, respectivamente, com a formação de quatro grupos estatísticos. Na F2 o FPB 166, FPB 167, FPB 169 e FPB 171 foram superiores estatisticamente apresentando médias de 0,267 U.gss⁻¹, 0,311 U.gss⁻¹, 0,415 U.gss⁻¹ e 0,354 U.gss⁻¹, respectivamente formando dois grupos estatísticos.

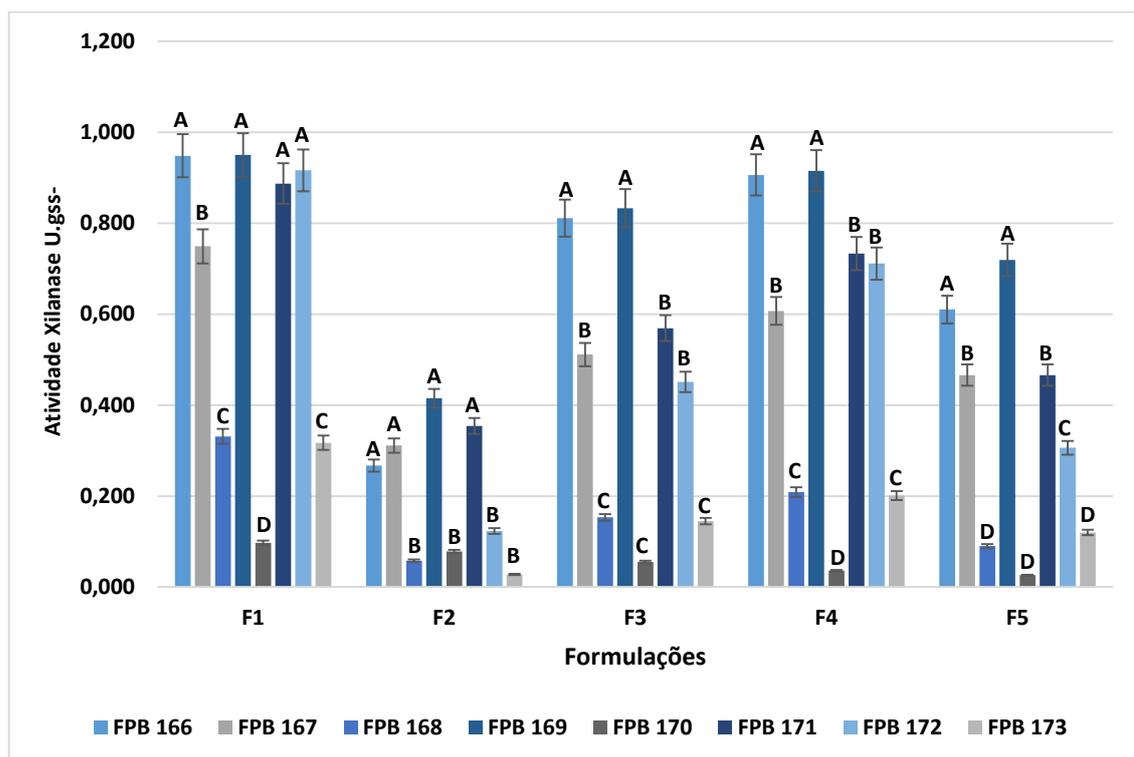


Figura 37. Atividade xilanase dos extratos obtidos em CES das Formulações: F1 (100%FC), F2 (100%FS), F3 (50%FC e 50%FS), F4 (80%FC e 20%FS) e F5 (20%FC e 80%FS); em função dos macro-basidiomicetos: FPB 166, FPB 167, FPB 168, FPB 169, FPB 170, FPB 171, FPB 172, FPB 173. Letras diferentes sobre as barras são significativamente diferentes ($p < 0,05$) no teste Scott-Knott. Fonte: O autor (2019).

5.4 COCULTIVO E ATIVIDADES ENZIMÁTICAS: MACRO-BASIDIOMICETO e *Trichoderma asperellum* BC-2 A70882D

5.4.1 Cocultivo macro-basidiomicetos e *T. asperellum* BC-2 A70882D em meio ágar-enriquecido

O comportamento e a compatibilidade entre os oitos macro-basidiomicetos com o *T. asperellum* BC-2 A70882D pode ser visualizada em placas de Petri com meios BDA e MEA após 15 dias de inoculação. Foram testados simultaneamente com a cultura mista (cocultivo), com registro das características morfológicas visíveis nas margens dos micélios durante o crescimento, considerando a velocidade de crescimento entre os fungos. O isolado de *T. asperellum* BC-2 A70882D foi designado como de crescimento rápido e os macro-basidiomicetos como de crescimento lento. Nas Figuras 38, 39, 40 e 41 são apresentadas as interações entre os fungos durante o cocultivo em placa. A situação de interação mais comum nestes cocultivos foi a inibição por zona de confronto, demonstrados nas Figuras: (38B-MEA), (40E-BDA), (40E-MEA), (40F-MEA), (41G-BDA), (41G-MEA), (41H-BDA) e (41H-MEA). As Figuras (38A-BDA), (38A-MEA), (39C-BDA) e (39C-MEA), demonstraram o desenvolvimento de uma sobreposição entre os fungos envolvidos. Os fungos das figuras (38B-BDA) e (39D-BDA), apresentaram inibição por contato, e a inibição a distância ocorreu nas com os fungos representados nas figuras (40F-BDA) e (39D-MEA).

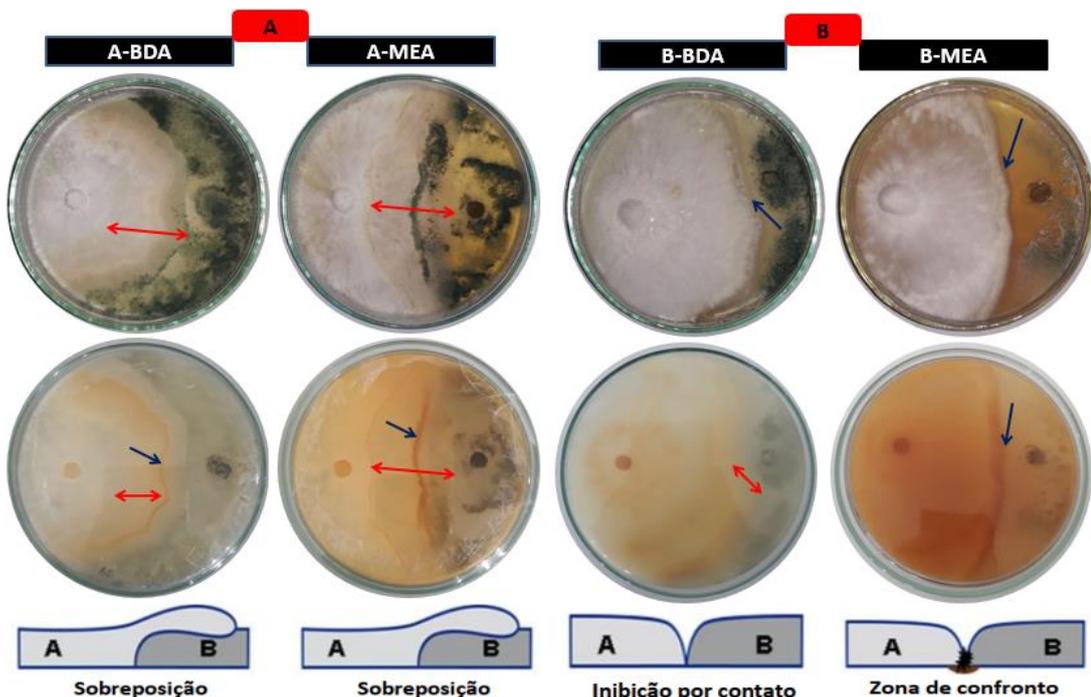


Figura 38. Cocultivo em placas entre macro-basidiomicetos e *T. asperellum* BC-2 A70882D em meio BDA e MEA: (A) (FPB 166+*Trichoderma asperellum* BC-2 A70882D); (B) (FPB 167+*Trichoderma asperellum* BC-2

A70882D; Seta azul demonstra a linha que divide os fungos; Seta vermelha indica a interação entre os fungos.
Fonte. O autor (2019).

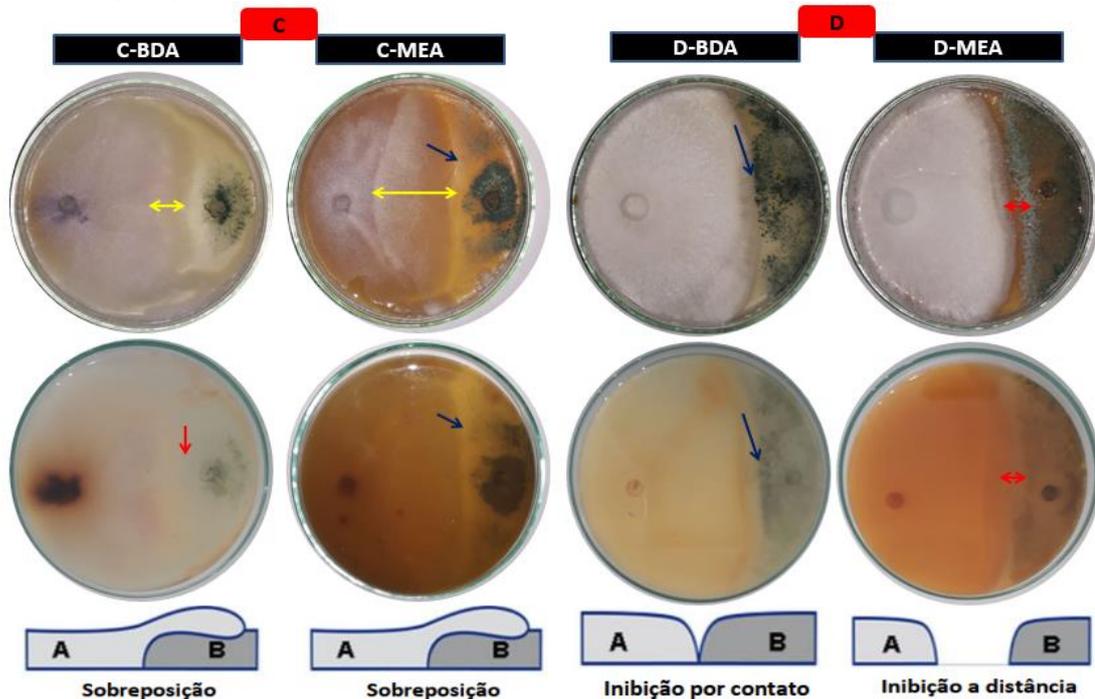


Figura 39. Cocultivo em placas entre macro-basidiomicetos e *T. asperellum* BC-2 A70882D em meio BDA e MEA: (C) FPB 168+*Trichoderma asperellum* BC-2 A70882D; (D) FPB 169+*Trichoderma asperellum* BC-2 A70882D; Seta azul demonstra a linha que divide os fungos; Seta vermelha indica a distância entre os fungos.
Fonte. O autor (2019).

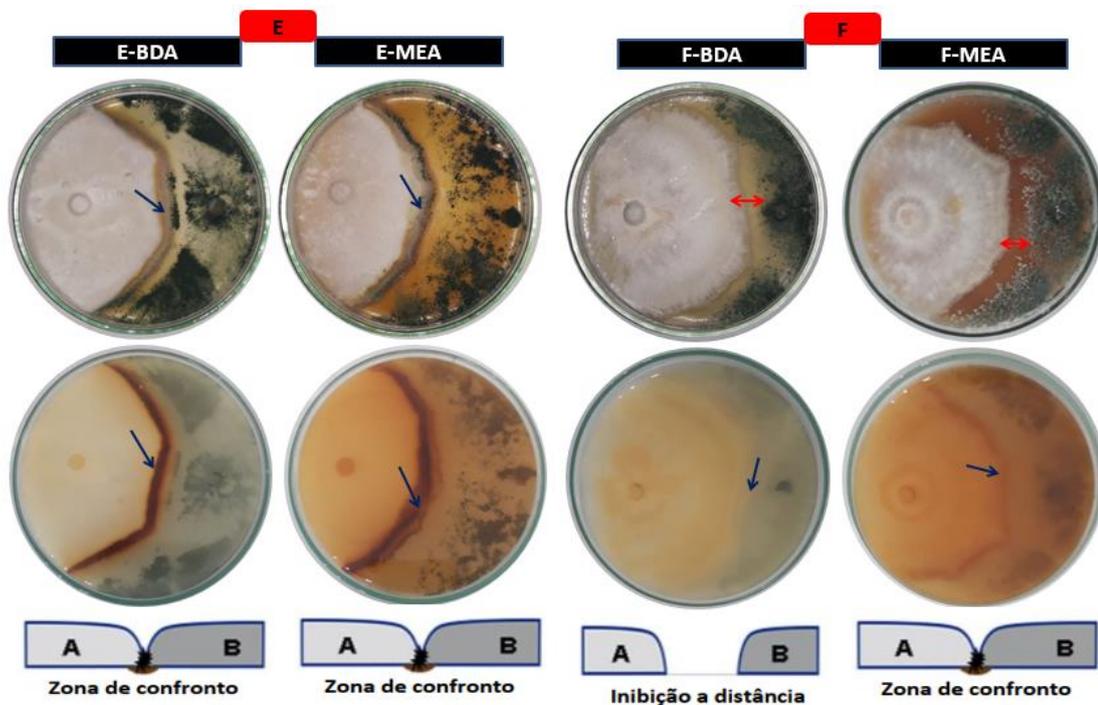


Figura 40. Cocultivo em placas entre macro-basidiomicetos e *T. asperellum* BC-2 A70882D em meio BDA e MEA: (E) FPB 170+*Trichoderma asperellum* BC-2 A70882D; (F) FPB 171+ *Trichoderma asperellum* BC-2 A70882D; Seta azul demonstra a linha que divide os fungos; Seta vermelha indica a distância entre os fungos.
Fonte. O autor (2019).

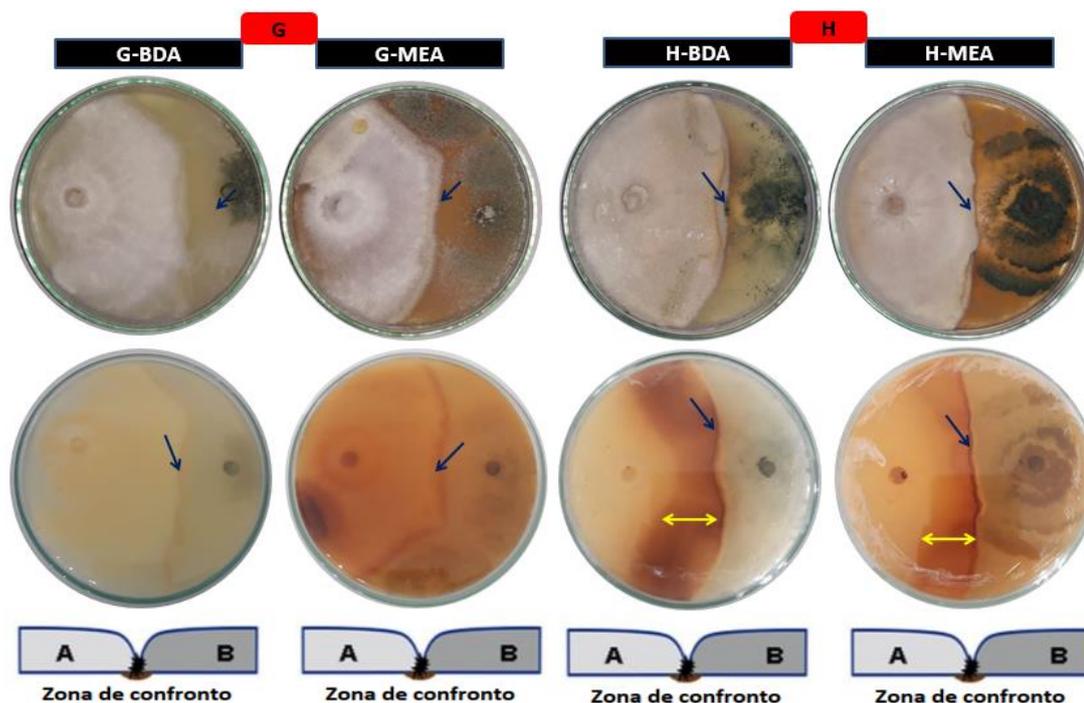


Figura 41. Cocultivo em placas entre macro-basidiomicetos e *T. asperellum* BC-2 A70882D em meio BDA e MEA: (G) FPB 172+*Trichoderma asperellum* BC-2 A70882D; (H) FPB 173+*Trichoderma asperellum* BC-2 A70882D. Seta amarela indica a extensão da liberação de metabólitos; Seta azul demonstra a linha que divide os fungos. Fonte. O autor (2019).

5.4.2 Cocultivo macro-basidiomicetos e *T. asperellum* BC-2 A70882D em cultivo submerso, enriquecido com FC e FS

Na Tabela 8, é possível perceber que houve diferença significativa a 5% de probabilidade, para as diferentes inoculações, para as enzimas β -glicosidase, lipase e xilanase. De maneira geral os resultados enzimáticos das diferentes inoculações, variando entre os fungos, meios e dias, são diferentes entre si necessitando de um teste média para verificar qual a melhor inoculação realizada.

Tabela 8. Resumo da análise da variância para as enzimas β -glicosidase, lipase e xilanase de diferentes inoculações e cocultivos. Gurupi-TO, 2019.

F.V.	G.L.	β -glicosidade	Q.M.	
			Lipase	Xilanase
Inoculações	9	0,029084**	0,094873**	0,945834**
erro	10	0,000159	0,000810	0,019595
C.V. (%)		7,55	9,81	28,06

F.V.: Fonte de Variação; G.L.: Grau de Liberdade; Q.M.: Quadrado Médio; C.V.: Coeficiente de Variação. ** significativo a 5% ao teste F.

O sistema de cocultivo foi utilizado para avaliar o comportamento de macro-basidiomicetos quando estressado biologicamente na presença (cultivo) de *T. asperellum* BC-2 A70882D, com objetivo de avaliar as atividades enzimáticas para β -glicosidase, xilanase e lipase nestas condições. O cultivo submerso foi utilizado como estratégia para o cocultivo dos fungos utilizando dois tipos de biomassa de açaí, a Fibra do Cacho (FC) e a Fibra da Semente (FS), como fontes de carbono. O macro-basidiomiceto FPB 173 foi selecionado para avaliação por desempenhar melhor inibição na zona de contato em placa com *T. asperellum* BC-2 A70882D (Figura 41H), formando um maior complexo escuro. Segundo Bertrand et al. (2013a) esse complexo produzido é indicativo de intensa atividade metabólica com a produção de metabolitos primários (enzimas) e secundários (pigmentos, antibióticos, compostos químicos de defesa). Também foi escolhido o FPB 173 (Figura 42A) por possuir maior crescimento e vigor micelial quando cultivados em meios-ágar enriquecidos com biomassas do açaí, com relação aos outros macro-basidiomicetos. O *T. Asperellum* BC-2 A70882D (Figura 42B), foi selecionado pelo seu potencial biotecnológico na produção de enzimas celulolíticas e pectinolíticas (TEIXEIRA., 2015).

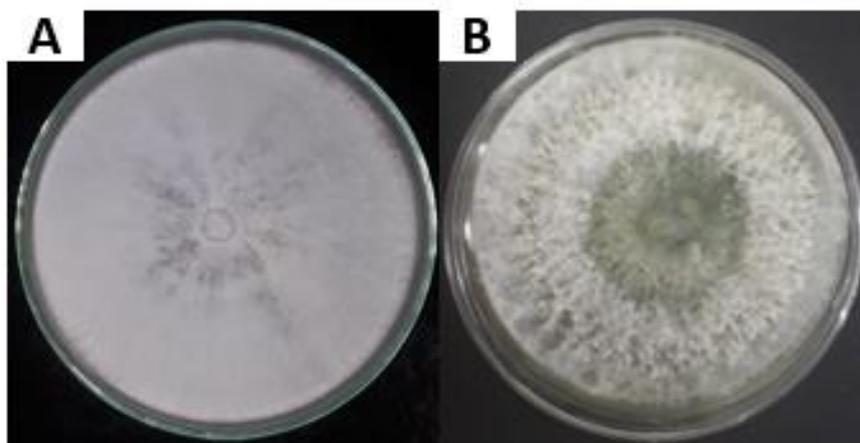


Figura 42. Fungos selecionados para o cultivo submerso: A) Macro-basidiomiceto FPB 173; B) *T. Asperellum* BC-2 A70882D. Fonte: O autor (2019).

A atividade enzimática da β -glicosidase quantificada nos extratos está apresentada na Figura 43. Foi detectada a atividade em todas as formulações e em todos os tempos de cultivo, onde os maiores valores de atividade foram observados no cocultivo com substrato FC e FS, após 168 horas de cultivo, e se diferenciaram estatisticamente dos demais, atingindo $0,384 \text{ U.mL}^{-1}$ e $0,366 \text{ U.mL}^{-1}$, respectivamente. Ao analisar os cultivos separadamente, se observou que no monocultivo a formulação Fibra do Cacho do açaí (FC) com *T. asperellum* BC-2 A70882D obteve melhor desempenho. Nos dois tempos de cultivo, foram formados quatro

grupos estatísticos e os valores observados em 48 horas de cultivo foram os menores para esta enzima.

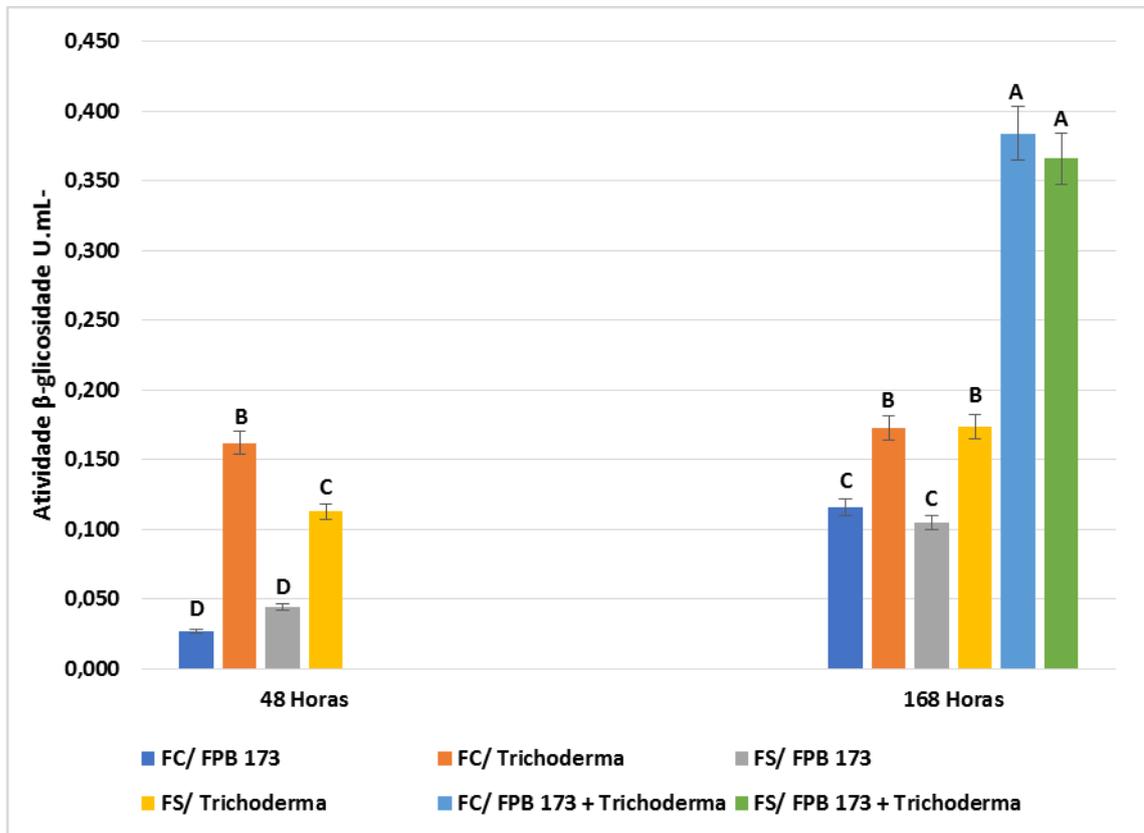


Figura 43. Atividade enzimática da β -glicosidase em cultivo submerso entre o FPB 173 e *T. asperellum* BC-2 A70882D nos monocultivos e cocultivos, tem como fonte de carbono, Fibra do Cacho do açaí (FC) e Fibra da Semente do açaí (FS): FC/FPB 173, FC/ *T. asperellum* BC-2 A70882D, FS/FPB 173 e FS/*T. asperellum* BC-2 A70882D após 48 horas; e FC/FPB 173, FC/ *T. asperellum* BC-2 A70882D, FS/FPB 173, FS/*T. asperellum* BC-2 A70882D, FC/FPB 173 + *T. asperellum* BC-2 A70882D e FS/FPB 173 + *T. asperellum* BC-2 A70882D após 168 horas. Letras diferentes sobre as barras são significativamente diferentes ($p < 0,05$) no teste Scott-Knott.

Para os resultados da atividade enzimática da lipase (Figura 44), verificou-se que o monocultivo de *T. asperellum* BC-2 A70882D no meio contendo FS, desempenhou maior resultado, seguido pelo cocultivo, também na formulação que continha FS (FPB 173 + *T. asperellum* BC-2 A70882D), após 168 horas, e diferiram dos demais atingindo uma atividade enzimática de $0,747 \text{ U.mL}^{-1}$ e $0,632 \text{ U.mL}^{-1}$, respectivamente. Com avaliação do monocultivo individual, observa-se a manutenção da produção basal entre os fungos. Foram formados quatro grupos estatísticos, e no cultivo realizado por 48h não houve diferença significativa entre os resultados para os monocultivos de macrofungos e *T. asperellum*.

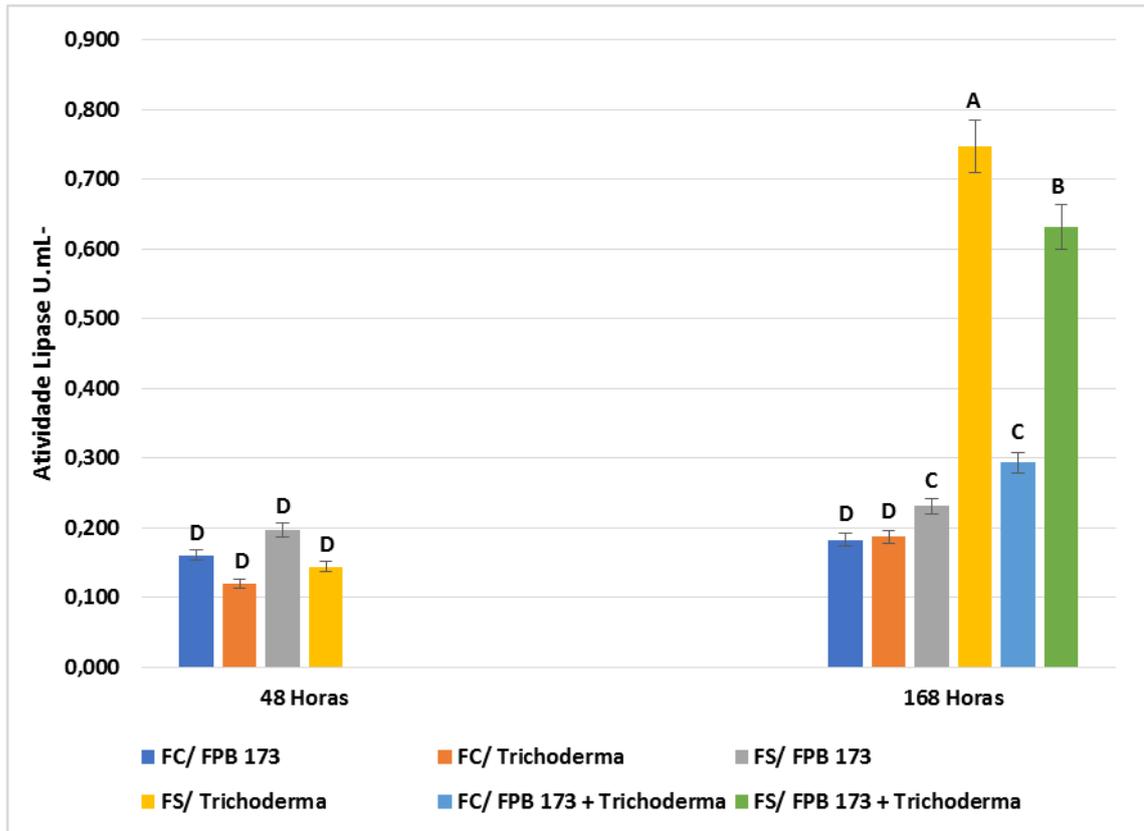


Figura 44. Atividade enzimática da lipase em cultivo submerso entre o FPB 173 e *T. asperellum* BC-2 A70882D nos monocultivos e cocultivos, tem como fonte de carbono, Fibra do Cacho do açaí (FC) e Fibra da Semente do açaí (FS): FC/ FPB 173, FC/*T. asperellum* BC-2 A70882D, FS/ FPB 173 e FS/*T. asperellum* BC-2 A70882D após 48 horas; e FC/FPB 173, FC/ *T. asperellum* BC-2 A70882D, FS/ FPB 173, FS/ *T. asperellum* BC-2 A70882D, FC/ FPB 173 + *T. asperellum* BC-2 A70882D e FS/ FPB 173 + *T. asperellum* BC-2 A70882D após 168 horas. Letras diferentes sobre as barras são significativamente diferentes ($p < 0,05$) no teste Scott-Knott.

Para os resultados da atividade enzimática da xilanase (Figura 45), foi notado que o monocultivo no substrato FC, com o fungo *T. asperellum* BC-2 A70882D, após 48 e 168 horas, mostraram diferenças significativas dos demais cultivos, atingindo $1,824 \text{ U.mL}^{-1}$ e $1,732 \text{ U.mL}^{-1}$, respectivamente. Os demais tratamentos mantiveram a manutenção da produção enzimática basal em ambos os tempos de cultivo. Para o estudo desta enzima, formou-se dois grupos estatísticos distintos.

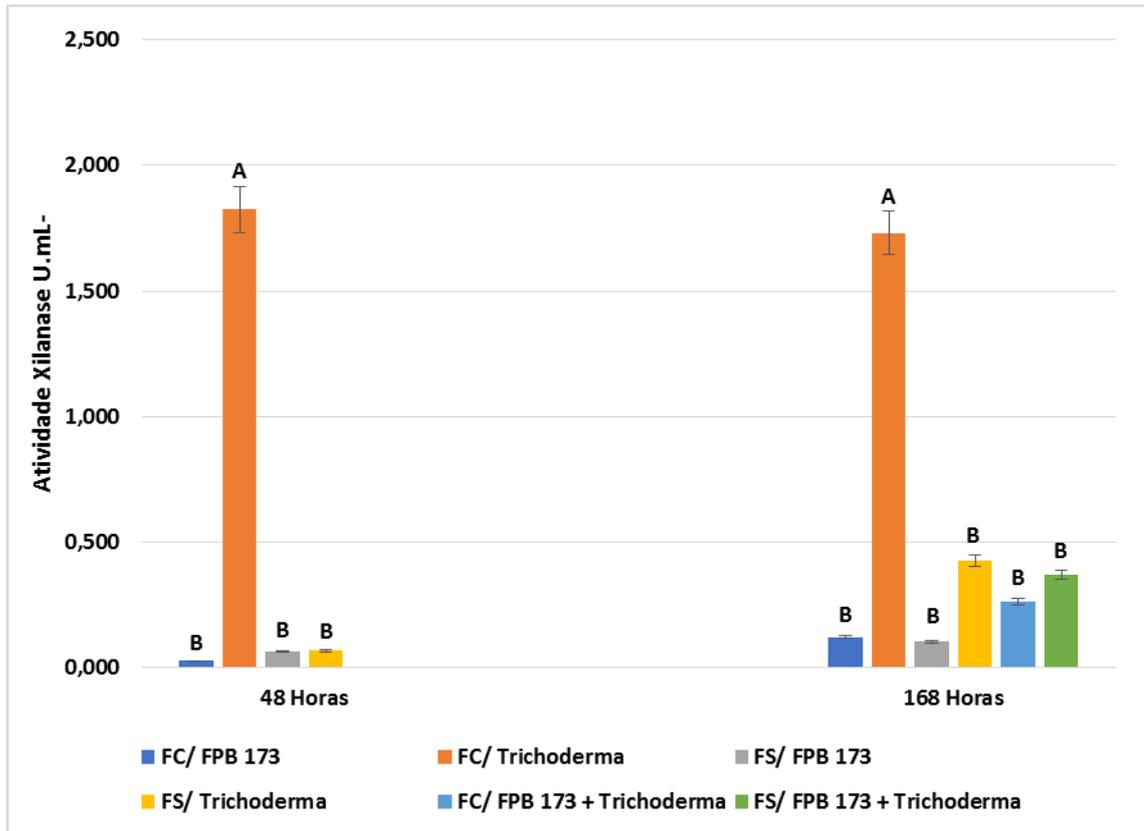


Figura 45. Atividade enzimática da xilanase em cultivo submerso entre o FPB 173 e *Trichoderma asperellum* BC-2 A70882D nos monocultivos e cocultivos, tem como fonte de carbono, Fibra do Cacho do açaí (FC) e Fibra da Semente do açaí (FS): FC/ FPB 173, FC/ *T. asperellum* BC-2 A70882D, FS/ FPB 173 e FS/*T. asperellum* BC-2 A70882D após 48 horas; e FC/ FPB 173, FC/*T. asperellum* BC-2 A70882D, FS/ FPB 173, FS/*T. asperellum* BC-2 A70882D, FC/ FPB 173 + *T. asperellum* BC-2 A70882D e FS/ FPB 173 + *T. asperellum* BC-2 A70882D após 168 horas. Letras diferentes sobre as barras são significativamente diferentes ($p < 0.05$) no teste Scott-Knott.

6. DISCUSSÃO

6.1 MACRO-BASIDIOMICETOS: CRESCIMENTO MICELIAL

Vários materiais vegetais têm sido empregados em substituição ao meio tradicional BDA (Batata-Dextrose-Ágar 2%), na produção de meios de cultura. Muitos macrofungos ou macro-basidiomicetos silvestres, que ainda não são cultivados comercialmente, são de grande importância etnomicológica, em termos de alimentos ou para fins medicinais, e devem ter seu potencial avaliado (CHANG e MILES, 2004). No entanto, a domesticação de espécies nativas de macrofungos é sempre um desafio, pois muitos fatores afetam o sucesso da produção, entre eles, as matérias-primas utilizadas para a composição dos meios de produção, que são de grande importância (LOMASCOLO et al., 2011).

Fernandes et al. (2005) atribuíram que os fungos basidiomicetos de ordens Agaricales e Polyporales são mais eficiente na decomposição da matéria orgânica, devido a produção de enzimas oxidativas. Em um trabalho cultivando fungos basidiomicetos, Abreu et al. (2007) observaram que isolados da ordem Polyporales possuíam maior capacidade de crescimento micelial. No presente estudo foi observado que o FPB 166 para o crescimento micelial, e o FPB 166 e FPB 173, para o Índice de Crescimento Micelial, apresentaram os melhores resultados. Possivelmente estes fungos pertencem a ordem de basidiomicetos, com maior capacidade seletividade a celulose e a hemicelulose, pois mostraram atividades de holocelulases nos monocultivos CES e CS como também no cocultivo, para o caso do FPB 173. A identificação molecular destes macro-basidiomicetos e dosagem de enzimas oxidativas poderão auxiliar na caracterização destes fungos como potenciais agentes biológicos de transformação de biomassa vegetal e geração de enzimas para aplicação industrial.

Com relação à composição dos meios de cultura, Flegg, Spencer e Wood (1985) citam que os macronutrientes (P, K, Mg e S) e os micronutrientes (Cu, Fe, Mn, Mo e Zn) são necessário para o crescimento de macrofungos, além de Ca, Mg e Na, para a frutificação (KURTZMAN e ZADRAZIL, 1982). O presente trabalho demonstrou que a fibra do cacho do açaí obteve os melhores resultados para crescimento micelial e atividades enzimáticas, ou seja, este substrato favoreceu o metabolismo celular para carbohidrases. A análise centesimal da FC apresentou diferença para alguns componentes (Tabela 6), principalmente para micronutrientes, B (18 mg.kg⁻¹), Cu (13 mg.kg⁻¹), Fe (171 mg.kg⁻¹), Mn (1117 mg.kg⁻¹) e Zn (101 m.kg⁻¹) além de possuir os macronutrientes Ca (0,47%) e Mg (0,07%).

Eira (2004) cita que a relação C/N ideal para cultivo axênico de macro-basidiomicetos formadores de cogumelos comestíveis é entre 20 a 50/1, que vai de acordo com os resultados observados no presente estudo, onde o meio BDA, que obteve os maiores resultados no Diâmetro Micelial, e possui uma relação C/N de 49/1 (Tabela 6). A fibra do cacho do açaí também se destacou entre as melhores resultados, e possui uma relação C/N acima 80/1. Os meios de cultivo para formação micelial não são necessariamente os mesmos quando o intuito é fazer com que os macro-basidiomicetos formem corpos de frutificação, ou seja, formação de cogumelos. A faixa de C/N é muito variável para cada fase da vida dos macrofungos, tanto os selvagens como os comerciais (EIRA., 2004).

A fibra do cacho do açaí suplementado com glicose proporcionou um melhor crescimento micelial, pois a adição da glicose disponibilizou açúcares, que podem ser facilmente metabolizados pelos macro-basidiomicetos (REGINA et al., 2001). Donini et al. (2005), testando meio de cultura com diferentes substratos, suplementado ou não com glicose, observaram um aumento no crescimento micelial de macrofungos do gênero *Pleurotus*.

6.2 CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DOS MACRO-BASIDIOMICETOS EM BIOMASSAS RESIDUAIS DO AÇAÍ.

Avaliando os resultados de atividade de celulases [β -glicosidase e endoglucanase (CMCase)], observou-se que a formulação com a fibra do cacho do açaí obteve melhores resultados quando comparado com a fibra da semente do açaí. Possivelmente o teor de lignina pode ser menor na fibra do cacho do que na fibra da semente. Alguns autores observaram altas concentrações de lignina na composição de alguns substratos como, fibra do dendê (32%) (SOUZA et al., 2013) e coco verde (37%) (CORRADINI et al., 2009). De acordo com Aguiar (2010) as ações enzimáticas no substrato dependem das propriedades físicas dos materiais, incluindo a natureza cristalina ou amorfa, área acessível, área superficial, porosidade e principalmente tamanho de partícula. No entanto, não há relatos sobre indução específica de enzimas lignocelulósicas como resposta geométrica das partículas em fibra do cacho do açaí e fibra da semente do açaí.

Nas regiões amorfas da celulose, a água e as enzimas têm mais acesso e ficam com maior facilidade para realizar a hidrólise deste composto. Já na região cristalina, os átomos são altamente compactados e dificulta a penetração de moléculas no interior das microfibrilas, e impede sua degradação por microrganismos. Vale ressaltar que o processo de degradação da celulose pode ser facilitado, porque além de regiões amorfas, estas fibras apresentam

irregularidades, falhas e microporos, que aumentam a superfície de contato da celulose com outras moléculas (LYND et al., 2002; ARANTES e SADDLER, 2010). Provavelmente a fibra do cacho do açaí possui maior microporosidade, e possui mais regiões amorfas em sua estrutura, em comparação com a fibra da semente do açaí.

Os resíduos do dendê cacho vazio, fibra do mesocarpo e mistura (cachos+fibras+borra) foi utilizado em FSS com fungos da podridão-branca por Romero-Peláez (2017), que apresentou atividade para CMCase na formulação (mistura) ($0,08 \text{ U.mL}^{-1}$), e para β -glicosidase, não detectou atividade. Reddy et al. (2003), avaliaram a atividade enzimática celulolítica de fungos *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju*, com substrato de resíduos lignocelulósicos, e utilizaram a banana em CES, e observaram baixa atividade celulolítica, como nos resultados deste trabalho.

O principal polissacarídeo componente da hemicelulose é a xilana, e as enzimas xilanases são responsáveis por hidrolisá-las. A presença das xilanases no extrato enzimático é de fundamental importância para desestruturar o entrelaçamento da hemicelulose constituinte da parede celular vegetal. Esta ramificação de grupos de polissacarídeos, são ligados fortemente entre si e à superfície das microfibrilas de celulose, cobrindo-as e mantendo ligações cruzadas, via pontes de hidrogênio, e dificulta a ação das celulases durante o processo de sacarificação.

Para determinar a degradação de hemicelulose em função da atividade de xilanase (endo-1,4- β -xilanase), Romero-Peláez (2017) utilizou fungo da podridão-branca em meio FSS com resíduo da agroindústria do dendê, Fibra do cacho (formulação F1), Fibra do mesocarpo (formulação F2) e Mistura (cachos+fibras+borra F3). Neste estudo, foi detectada atividade em todas as linhagens, com maior destaque no cultivo F3 ($0,16 \text{ U.mL}^{-1}$) e F1 ($0,079 \text{ U.mL}^{-1}$), com o fungo *T. versicolor* CC124. Os resultados de Romero-Peláez (2017) ficaram abaixo dos obtidos pelo presente estudo na formulação fibra do cacho do açaí (F1), com o fungo FPB 166 ($0,649 \text{ U.gss}^{-1}$).

Menezes et al. (2009) avaliaram a produção de xilanase pelas linhagens de *Pleurotus taiandia* e *Pleurotus sajor-caju* nos substratos de bagaço de cana em cultivo submerso (CS), com melhores resultados de atividade, nos dias 10 e 20 de cultivo, conseguindo, em ambos os dias, $0,11 \text{ U.mL}^{-1}$. Qinnghé et al. (2004), utilizaram para produção da xilanase sabugo de milho e aveia como substrato para cultivar o fungo *Pleurotus ostreatus*-CY012 em CS, sob condições otimizadas, e conseguiram $24,98 \text{ U.mL}^{-1}$, superando os resultados obtido neste trabalho, que não foi otimizado nenhuma das variáveis para melhor produção de enzimas.

Para a enzima pectinase, observou-se que o melhor desempenho dos fungos para a sua produção foi no meio contendo fibra do cacho do açaí, comparados com os demais tratamentos, visto que o pH ideal para a produção desta enzima está na faixa de 3,0 a 5,50 (UEDA, FUJIO e LIM., 1982). Em estudos realizados por Sinitsyna et al. (2007) foi constatado que a maior produção da enzima pectinase ocorreu em pH ácido (5,50), para o fungo *P. canescens*, se assemelhando com os resultados obtidos no presente trabalho, onde pH da formulação com fibra do cacho do açaí foi de 5,7 (Tabela 6). Nos trabalhos de, Piccoli-Valle et al. (2001), com fungo *Penicillium griseoroseum* e Maciel (2009), com o fungo *Aspergillus niger*, foi observado que o pH próximo a 7,0 proporcionou maior produção da enzima pectinase.

6.3 COCULTIVOS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA: MACRO-BASIDIOMICETOS E *Trichoderma asperellum* BC-2 A70882D

6.3.1 Cocultivo macro-basidiomicetos e *Trichoderma asperellum* BC-2 A70882D em meio distintos

As características sinérgicas ou antagônicas, assim como o crescimento dos micélios foram analisadas de acordo com vários estudos (MOLLA et al., 2001; BERTRAND et al., 2013a). No comportamento dos fungos, utilizando os dois meios tradicionais para o crescimento fúngico, BDA e MEA, foi possível observar pouca diferença significativa de interação entre eles, que em sua maioria ocorreu a inibição pela zona de confronto. Segundo Bertrand et al. (2013a), a inibição por zona de confronto é o contato entre os dois fungos com a formação de uma linha escura entre eles; esse complexo escuro induzido pela união dos dois fungos é advindo do estresse competitivo, sendo um indicativo de intensa atividade metabólica com a produção de substâncias químicas diversas, tais como enzimas, alcaloides, pigmentos e etc. Esta ação pode ser desencadeada por ativação de genes antes inativos, levando também a alteração morfológica visível no meio de cultura. Molla et al. (2001), enfatiza que inibição (ponto de contato), que para Bertrand et al. (2013a) é definida por zona de confronto, ocorre quando os fungos se aproximam um do outro até formar uma linha de demarcação de 1 a 2 mm entre as duas colônias, claramente visíveis. A interação por sobreposição é definida pelas espécies que melhor se adaptam ao meio nas condições de cocultivo (BERTRAND et al., 2013a). Para Molla et al. (2001) a inibição por entrelaçamento

parcial, mesmo para sobreposição de Bertrand et al. (2013a), é quando o fungo cresce sobre o outro oposto tocando um ao outro sem fazer qualquer zona de inibição.

6.3.2 Atividade enzimática de cocultivo submerso de macro-basidiomicetos e *Trichoderma asperellum* BC-2 A70882D em meio enriquecido.

São usados diversos resíduos lignocelulósicos para a produção de celulases por fungos. Enzimas degradadoras de polissacarídeos de plantas, tais como endo-1,4- β -D-glucanase (EC 3.2.1.4), exo-1,4- β -D-glucanase (EC 3.2.1.91), e xilanase (EC 3.2.1.8), são de importância fundamental para a eficiente despolimerização de polímeros de carboidratos vegetais em açúcares fermentáveis e são essenciais para as indústrias de alimentos, têxteis, papel e celulose, agricultura e biorrefinarias lignocelulósicas (PHITSUWAN et al., 2013; JUTURU e WU, 2014).

Com esse arsenal tecnológico, os fungos da podridão branca, tais como macro-basidiomicetos, estão sendo inseridos em modulações enzimáticas em cocultivo com outros microrganismos, como os ascomicetos. Resultados experimentais recentes indicaram que a introdução de interações microbianas distintas é uma estratégia promissora para aumentar a produção de proteína fúngica. Ma e Ruan (2015), buscando melhorar a eficiência de um sistema enzimático lignocelulolítico para simultânea bio-deslignificação e sacarificação de palha de milho, analisaram a co-cultura do fungo da podridão branca *Coprinus comatus* com o *Trichoderma reesei*. Constataram que as atividades enzimáticas lignocelulolíticas da co-cultura ultrapassou o da monocultura, sugerindo interação sinérgica entre os dois fungos.

É importante ressaltar que a interação entre os microrganismos não são o único fator interferente no aumento na produção de enzimas. Segundo Wen, Liao e Chen (2005), o nível de enzima produzido pela cultura pura comparados ao da cultura mista, depende da espécie fúngica e do substrato utilizado, que pode justificar a diferença do tipo de interação da mesma combinação em substratos diferentes (MEA e BDA).

No estudo realizado por Hu et al. (2011), o cocultivo do ascomiceto *Aspergillus oryzae* com fungos da podridão branca, *Phanerochaete chrysosporium*, propiciou altas atividades de β -glicosidase, α -celobiohidrolase, β -galactosidase e lacase. Adav et al. (2012), estudaram o cocultivo de *P. chrysosporium* com *Trichoderma reesei*, que induziu a produção de proteínas celulolíticas e estimulou a expressão de enzimas hemicelulolíticas, confirmando o resultado do presente estudo, com o aumento significativo da atividade enzimática da β -glicosidase e lipase.

Para a produção da atividade enzimática de xilanase, no presente estudo, não houve diferença evidente no cocultivo na presença do *T. asperellum* BC-2 A70882D, que manteve sua maior atividade no monocultivo de 48h e 168h. Na fermentação do monocultivo de Romero-Peláez (2017) usando fibra do cacho do mesocarpo de dendê, o *T. reesei* ATCC®60787, em comparação com fungos da podridão-branca, para atividade xilanase, destacou-se com maior atividade enzimática o *T. reesei* ($0,65 \pm 0,05 \text{ U.mL}^{-1}$), seguida do macrofungos *L. arvalis* ATCC®52088 ($0,59 \pm 0,05 \text{ U.mL}^{-1}$); e com menor valor nos extratos de fungos da podridão-branca, incluindo o isolado *Coprinus sp.* FPB 125. Romero-Peláez (2017) também realizou o cocultivo com *T. reesei* ATCC®60787 e fungos da podridão-branca, obtendo maior atividade de xilanase, comparando ao monocultivo de *P. lecomtei* CC40, porém menor que o monocultivo de *T. reesei*.

Kalyani et al. (2013) relataram que a interação sinérgica de *Agaricus arvensis* e *Sistotrema brinkmannii* levou a uma atividade de celulase total 2,3 a 3 vezes maior do que a produzida por monocultivo. Metreveli et al. (2017) cultivaram basidiomicetos *Irpex lacteus* e *Schizophyllum commune* em monocultura, e constatou um aumento gradual da atividade enzimática CMCCase (76 e 33 U.mL^{-1}) e xilanase (70 e 381 U.mL^{-1}), respectivamente, após 11 dias de fermentação. No cocultivo de *I. lacteus* e *S. commune*, observou-se um aumento de 75% de CMCCase e 36% celulase total (FPase) em comparação ao monocultivo de *I. lacteus*, observado após 8 dias de co-cultivo. Comparando a atividade da xilanase nota-se que o cocultivo foi maior 34% em relação ao monocultura do *I. lacteus*. Foi observado também um efeito sinérgico na secreção de celulase e xilanase por *I. lacteus* e *S. commune* em meio otimizado, utilizando 1% de celulose cristalina e 2% de cascas de tangerina, com atividade de CMCCase ($118,0 \pm 13,2 \text{ U.mL}^{-1}$) e xilanase ($121,0 \pm 22,5 \text{ U.mL}^{-1}$).

A vantagem em usar diferentes espécies fúngicas na produção de coquetéis enzimáticos de interesse biotecnológico é a obtenção da diversidade de enzimas tanto hidrolíticas, quanto oxidativas. É uma estratégia que poderia ser aplicada em processos de biorremediação, destoxificação de resíduos, nutrição animal, melhoria da qualidade de alimentos-insumos ou bebidas-sucos, entre outras aplicações. Sobretudo, é fundamental analisar a compatibilidade do microrganismo de interesse, como fora feito neste trabalho entre o *T. asperellum* BC-2 A70882D e FPB 173.

7. CONCLUSÃO

Os resíduos agroindustriais ou coprodutos da produção da polpa do açaí possuem um grande potencial biotecnológico e podem ser utilizados como fonte carbono/nitrogênio de baixo custo em processos de cultivo de fungos da podridão-branca (macro-basidiomicetos). É de grande importância a exploração da biodiversidade do bioma Cerrado tocantinense, um vez que os basidiomicetos são pouco estudados como agentes biológicos para pré-tratamento de resíduos agroindustriais de alta recalcitrância.

No presente trabalho foi possível cultivar oito macro-basidiomicetos selvagens, capazes de crescer em meio de cultura enriquecidos ou somente com fibra cacho do açaí ou fibra semente do açaí, apresentando diferenças significativas para o crescimento micelial e produção enzimática por cultivo sólida e submersa.

A fibra cacho do açaí se destacou quanto ao crescimento micelial, onde na ausência de glicose, sendo a única fonte de carbono e nitrogênio, os fungos FPB 166 e FPB 173 colonizaram toda a placa com apenas 6 dias de cultivo, e os fungos FPB 167, FPB 169 e FPB 171, colonizaram totalmente a placa com 8 dias de cultivo, e demonstram a possibilidade da inserção destas biomassas lignocelulósicas na manutenção ou formação de meios para preservação e cultivo de espécies de fungos macro-basidiomicetos.

Os meios de cocultivos entre espécies de basidiomicetos silvestres e ascomiceto (*T. asperellum* BC-2 A70882D) demonstram efeito positivo quando submetidos em inoculação em placa de Petri.

As biomassas lignocelulósicas da agroindústria do açaí, quando inserida como fonte de carbono única ou como fator de enriquecimento de meio de cultivo para basidiomicetos (fungos da podridão-branca e ascomicetos), em cultivo estado sólido ou submerso, apresentaram resultados favoráveis para as enzimas hidrolíticas, β -glicosidase, CMCase, xilanase, pectinase e lipase. No cultivo sólido, a formulação F1, que era composta por fibra do cacho do açaí, se destacou para a produção de todas as enzimas. Os fungos FPB 166 e FPB 167 se destacaram para a produção da β -glicosidase, com $0,319 \text{ U.gss}^{-1}$ e $0,281 \text{ U.gss}^{-1}$, respectivamente, e para a produção da CMCase, com $0,486 \text{ U.gss}^{-1}$ e $0,245 \text{ U.gss}^{-1}$, respectivamente. Para a xilanase, os fungos FPB 166, FPB 169, FPB 171 e FPB 172 foram superiores aos demais, com médias de $0,948 \text{ U.gss}^{-1}$, $0,950 \text{ U.gss}^{-1}$, $0,887 \text{ U.gss}^{-1}$ e $0,916 \text{ U.gss}^{-1}$. Para a pectinase, o FPB 166, FPB 167 e FPB 173, demonstraram maior atividade, com $0,956 \text{ U.gss}^{-1}$, $0,938 \text{ U.gss}^{-1}$ e $0,896 \text{ U.gss}^{-1}$, respectivamente.

No cultivo submerso, o cocultivo de FPB 173 e *T. asperellum*, teve a maior atividade para a β -glicosidase nos substratos FC e FS, com 0.384 U.mL^{-1} e 0.366 U.mL^{-1} , respectivamente. Para a lipase, o melhor meio de cultivo foi o substrato FS, sendo observadas diferenças entre o monocultivo de *T. Asperellum* e o cocultivo de FPB 173 e *T. asperellum* (0.747 U.mL^{-1} e 0.632 U.mL^{-1} , respectivamente). Nos resultados da atividade enzimática da xilanase, o monocultivo de *T. asperellum* no substrato FC, após 48 e 168 horas, atingiu $1,824 \text{ U.mL}^{-1}$ e $1,732 \text{ U.mL}^{-1}$. Estes resultados demonstram que estas biomassas são relevantes fontes de nutrientes no cultivo em estado sólido e submerso para monocultivos com macrobasidiomicetos e para cultivos com de *T. asperellum* BC-2 A70882D, em cocultivos, de maneira a produzir um maior extrato enzimático com celulases e hemicelulases (holocelulases).

Este cenário de produção enzimática se assemelha, de forma parcial, a um habitat natural dos fungos da podridão-branca e ascomicetos, deste modo, interagindo de maneira sinérgica, com bioconversão de biomassas lignocelulósicas, proporcionando benefício simultâneos. Potencializando a produção de celulases, xilanases, pectinases e lipases com possibilidade de uso em processos industriais e melhoria de polpas-sucos, tal como polpa-suco de açaí.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L. D. et al. Degradação da madeira de eucalyptus sp. por basidiomicetos de podridão branca. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.74, n.4, p.321-328, out./dez. 2007.

ADAV et al. Quantitative proteomic analysis of secretome of microbial consortium during saw dust utilization. **J. Proteomics**, 75 (2012), p. 5590-5603, 2012.

AGUIAR, C. M. Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger*. **Dissertação** (Engenharia Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Centro de Engenharia e Ciências Exatas, Toledo – PR, p. 118, 2010.

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos Envolvidos na Biodegradação de Materiais Lignocelulósicos e Aplicações Tecnológicas Correlatas. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729 – 1738, 2011.

ALMEIDA, A. F.; TAUKE-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Acid Lipase from *Candida viswanathii*: Production, Biochemical Properties, and Potential Application. **BioMed Research International**, 2013.

ALMEIDA, A. V. C. et al. Appreciation of acai core of a pulp producer from Ananindeua/PA: proposal of reverse channel structure oriented by NPSW and reverse logistics. **Rev. Gestão da Produção Operações e Sistemas**, v. 12, n. 4, p.59-83, 1 jul. 2017.

AM. 2003. SEFA/PA - Secretaria da Fazenda do Estado do Pará. Disponível em: <http://www.sefa.pa.gov.br/index.php/contencioso/93-orientacoes/icms-orientacoes/12442-boletim-2017>. Acesso em: 08 mar. 2018.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to Cellulose Limits the Efficiency of Enzymatic Hydrolysis: The Role of Amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, Vancouver, Canada, 2010. Disponível em: <<http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/3/1/4>>. Acesso em: 10 mar. 2019.

ASGHER, M. et al. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. **Biodegradation** 19(6):771–783. <https://doi.org/10.1007/s10532-008-9185-3>, 2008.

ATALLA, M. M. et al. Characterization and kinetic properties of the purified *Trematosphaeria mangrovei* laccase enzyme. **Saudi J Biol Sci** 20(4):373–381. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.04.001>, 2013.

BÉGUIN, P. E.; HUBERT, J. P. The Biological Degradation of Cellulose. **FEMS Microbiol. Rev.** Vol. 13, p. 25-28, 1994.

BENEN, J.A.E., et al. Pectic enzymes. (Eds.), Handbook of Food Enzymology. Marcel Dekker, Inc., New York, p. 1079, 2003.

BERTRAND, S. et al. Detection of metabolite induction in fungal co-cultures on solid media by high-throughput differential ultra-high pressure liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. **Journal of Chromatography A**, v. 1292, p. 219–228, 2013a.

BERTRAND, S. et al. Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnology Advances*, v. 32, n. 6, p. 1180–1204, 2014b.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their Potencial Industrial Applications. **Biotechnology Advances** 15 (3/4): 583-620, 1997.

BICHARA, C.M.; ROGEZ, H. Açai (*Euterpe oleracea* Martius). **Postharvest Biology And Technology Of Tropical And Subtropical Fruits**, p.1-27, 2011.

BOROVNIK, C.P.B. Fracionamento de Polpa de Açai e Concentração de Antocianinas utilizando Membranas Poliméricas. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, p. 89, 2010.

BRASIL. **Política Nacional de Resíduos Sólidos** (Lei nº 12.305/2010). Brasília: Diário Oficial da União, 2010.

BUSSMANN, R. W.; ZAMBRANA, N. Y. P. Facing global markets – usage changes in Western Amazonian plants: the example of *Euterpe precatoria* Mart. and *E. oleracea* Mart.. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 81, n. 4, p.257-261, 2012.

BUCKERIDGE, M. S.; CAVALARI, A. A.; SILVA, G. B. DA. Parede celular. In: Gilberto Barbante Kerbauy. (Org.). *Fisiologia Vegetal*. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p. 165-181, 2008.

BUGG, Timothy DH et al. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. **Natural product reports**, v. 28, n. 12, p. 1883-1896, 2011.

CARVALHO, W. et al. Uma Visão Sobre a Estrutura, Composição e Biodegradação da Madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2191 –2195, 2009.

CHANG, S.; MILES, G. P. *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effects and Environmental Impact*. p. 436. Boca Raton, FL: CRC Press. <http://dx.doi.org/10.1201/9780203492086>, 2004.

CHEN, S.; CHIU, M. Evaluation of white-rot fungi for treatment of organic wastes without environmental impact. In: **The 2005 world sustainable building conference**, Tokyo, pp 27–29, 2005.

CHOCT, M. Enzymes for the feed industry: Past, present and future. *World's Poultry Science Journal*, v. 62, p. 5-15, 2006.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Boletim da Sociobiodiversidade**, v. 2, n. 1, p. 1-48, 2018.

CONCEIÇÃO, A. A. et al. Bioconversion and Biotransformation Efficiencies of Wild Macrofungi. In: Singh B. P. et al. *Biology of Macrofungi*, Fungal Biology. (Ed.) Springer Nature Switzerland. cap. 18, p. 362-373. https://doi.org/10.1007/978-3-030-02622-6_18, 2018.

CORRADINI, E. et al. Composição química, propriedades mecânicas e térmicas da fibra de frutos de cultivares de coco verde. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 31, n. 3, p.837-846, 2009.

COSTA, W. A. et al. Açai (*Euterpe oleracea*) and Bacaba (*Oenocarpus bacaba*) as Functional Food. **Superfood And Functional Food - An Overview Of Their Processing And Utilization**, p.155-170, 2017.

CUPUL, W. C. et al. Enhancement of ligninolytic enzyme activities in a *Trametes maxima*-*Paecilomyces carneus* co-culture: Key factors revealed after screening using a Plackett-Burman experimental design. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 17, n. 3, p. 114–121, 2014.

DAMIÁN-ROBLES, R. M., et al. Characterization of ligninolytic enzyme production in white-rot wild fungal strains suitable for kraft pulp bleaching. 3 **Biotech** 7(5):319. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0968-2>, 2017.

DASHTBAN, M. et al. “Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin” *International journal of biochemistry and molecular biology* vol. 1,1 (2010): 36-50. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3180040/>. Acesso em: 14 mar. 2019.

DONINI, L. P. et al. Desenvolvimento in vitro de pleurotus spp. sob a influência de diferentes substratos e dextrose. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.72, n.3, p.331-338, jul./set. 2005.

DONOSO, C. et al. Degradative ability of 2,4,6-tribromophenol by saprophytic fungi *Trametes versicolor* and *Agaricus augustus* isolated from chilean forestry. **World J Microbiol Biotechnol** 24(7):961–968. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9559-4>, 2008.

DUENAS, R.; TENGEDY, R. P.; GUTIERREZ-CORREA, M. **Cellulase production by mixed fungi in solid-substrate fermentation of bagasse**. *World J Micro Biotechnol*, 11, p. 333–337, 1995.

EIRA, A. F. Fungos comestíveis. In: ESPÓSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). Fungos uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia. **Caxias do Sul: Educ.** Cap.12, p.379-448, 2004.

EMBRAPA – Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária. Sistema brasileiro de classificação dos solos. **EMBRAPA/CNPS**, 412p. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 2006.

FARINAS, C. S. et al. Aproveitamento do caroço do açaí como substrato para produção de enzimas por fermentação em estado sólido. **EMBRAPA**. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento 30), 2009a.

FARINAS, C. S. et al. Resíduos da agroindústria do açaí para a produção de celulases. In: Tecnologias para inovação nas cadeias de Euterpe. Or:Pessoa, J. D. C. e Teixeira, G.H. A. **EMBRAPA**, p. 343, 2012b.

FERNANDES, L. et al. In vitro wood decay of Eucalyptus grandis by the basidiomycete fungus Phellinus flavomarginatus. **International Biodeterioration end Biodegradation**, v.55, p.187-193, 2005.

FIGUEIREDO, M. B. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. **O Biológico**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 9-13, 1967.

FLEGG, P. B.; SPENCER, D. M.; WOOD, D. A. The biology and Thechnology of the Cultivate Mushrooms. New York: John Wiley, p. 347, 1985.

FONSECA, T. R. B. et al. Production in solid matrix and proteases partial characterization of edible mushroom from amazon rain forest. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 8, n. 1, p.45-52, 7 jan. 2014a.

FONSECA, T. R. B. et al. Cultivation and nutritional studies of an edible mushroom from North Brazil. **African Journal Of Microbiology Research**, v. 9, n. 30, p.1814-1822, 29 jul. 2015b.

FUTURE MARKET INSIGHTS – FMI. Açaí Berry’s Effective Application in Cosmetics will Boost its Global Sales during 2016-2026. Disponível em: < <https://www.futuremarketinsights.com/press-release/acai-berry-market> >. Acesso em: 08 mar. 2018.

GLEN, J. K.; GOLD, M. H. Purification and Characterization of na extracellular Mn(II) – dependent Peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, Phanerochaete chrysosporium. **Arch. Biochem. Biophys**, v.242, p.329-341, 1985.

GURUNG, N. et al. Review Article A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. **BioMed Research International**, 2013.

HASIN, Y.; SELDIN, M.; LUSIS, A. Multi-omics approaches to disease. **Genome Biol** 18(1):1–15. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1215-1>, 2017.

HOA, H. T.; WANG, C. L. Effects of temperature and nutritional conditions on mycelium growth of two oyster mushrooms (*Pleurotud ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). **Mycobiology**. n. 43 p. 14-23, 2015.

HOFRICHTER, M. **Review**: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP) Enzyme and Microbial Technology 30, 454-466, 2002.

HOMMA, A. K. O. et al. Açaí: novos desafios e tendências. **Amazônia: Ciência e Desenvolvimento**. v. 1, n. 2, p. 7-23, 2006.

HU, H. L. et al. Improved enzyme production by co-cultivation of Aspergillus niger and Aspergillus oryzae and with other fungi. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, 65, pp. 248-252, 2011.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Safra de açaí foi de 1,1 milhão de toneladas em 2016. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/16821-safra-de-acai-foi-de-1-1-milhao-de-toneladas-em-2016>>. Acesso em: 08 mar. 2018.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2018. Pesquisa Agrícola Municipal 2017. [online]. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2017_v44_br_informativo.pdf>. Acesso em: 16 mar. 2019.

ICMBIO. Fitofisionomias: Mata ripária. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/projetojalapao/pt/biodiversidade-3/fitofisionomias.html?showall=e+start=6>> Acesso em: 21 mar. 2019.

JUTURU, V.; WU, J. C. Wu Microbial cellulases: engineering, production and applications *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 33, pp. 188-203, 2014.

KALYANI, D. et al. Microbial consortia for saccharification of woody biomass and ethanol fermentation. **Fuel**, v. 107, p. 815-822, 5// 2013. ISSN 0016-2361. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001623611300046X>>. Acesso em: 20 fev. 2019.

KURTZMAN, R. H e ZADRAZIL, F. Physiological and taxonomic considerations for cultivation of *Pleurotus* mushrooms. In: CHANG, S.T, QUIMIO, T.H. (Eds). *Tropical mushrooms: biological nature and cultivation methods*. Hong Kong: **Chinese University**, p.299-348, 1982.

LOMASCOLO, A. et al. Peculiarities of *Pycnoporus* species for applications in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 92, n. 6, p.1129- 1149, 2011.

LIMA, A. C. P. et al. Fungi isolation and production of hydrolytic enzymes by Solid-state fermentation of *Euterpe oleracea* residues. **SINAFERM**, 2017.

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

MA, K. e RUAN, Z. Production of a lignocellulolytic enzyme system for simultaneous biodelignification and saccharification of corn stover employing co-culture of fungi. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 586-593, 1// 2015. ISSN 0960-8524. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414016009>>. Acesso em: 20 fev. 2019.

MACHADO, R. M. D. et al. Effect of enzymatic treatment on the cross-flow microfiltration of açaí pulp: Analysis of the fouling and recovery of phytochemicals. **Journal of Food Engineering**. v. 113. p. 442–452, 2012.

MACIEL, M. H. C. Produção e caracterização parcial de pectinases de *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido da palma forrageira e da casca do maracujá. **Dissertação**, 2009.

MANDELS, M. e WEBER, J. The Production of Cellulases. In: (Ed.). **Cellulases and Their Applications**: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, v.95, cap. 23, p.391-414. (Advances in Chemistry). ISBN 0-8412-0095-5, 1969.

MARGOT, J. et al. Influence of treatment conditions on the oxidation of micropollutants by *Trametes versicolor* laccase. **New Biotechnol.** 30(6):803–813. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.06.004>, 2013.

MENDONÇA, V. C. M. et al. Agronegócio do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) no município de Pinheiro-MA. **SODEBRAS**, v. 9, n. 100, p. 62-65, 2014.

MENEZES, C. R. et al. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. **Estudos Tecnológicos**, v. 5, n. 1, p.68-78, 2009.

MENEZES, G. K. A. et al. Gestão dos resíduos de caroços de açaí como instrumento de desenvolvimento local: o caso do município de Ananindeua-pa. **Congresso brasileiro de gestão**, p.468-477, 2018.

MESQUITA, A. L. et al. Eco-particleboard manufactured from chemically treated fibrous vascular tissue of acai (*Euterpe oleracea* Mart.) Fruit: A new alternative for the particleboard industry with its potential application in civil construction and furniture. **Industrial Crops And Products**, v. 112, p.644-651, 2018.

METREVELI, E. et al. Alteration of white-rot basidiomycetes cellulase and xylanase activities in the submerged co-cultivation and optimization of enzyme production by *Irpex lacteus* and *Schizophyllum commune*. doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.148. Epub 26 may. 2017.

MIAO, L.; WU, T. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) Liquefied Pulp for Drinking and their Antioxidant Capacities During Processing. **Processing And Impact On Antioxidants In Beverages**, p.165-172, 2014.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 03/01/ 1959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030> >. Acesso 25 jan. 2018.

MOLLA, A. H. et al. *In vitro* compatibility evaluation of fungal mixed culture for bioconversion of domestic wastewater sludge. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 17, p. 849-856, 2001.

MONTEIRO, M. B. O.; PEREIRA, R. P. W.; ABREU, H. S. *Compositional Analysis of the Lignin of Eucalyptus urophylla Treated with JA e 2,4 – D. BBR – Biochemistry and Biotechnology Reports*, DOI 10. 5433/2316 – 5200, v. 1, n. 2, p. 48, 2012.

MOURÃO, L. História e natureza: Do açaí ao palmito. **Revista Territórios e Fronteiras**, v. 3, n. 2, p.74-80, 2011.

NETO, A. R. S. et al. Characterization and comparative evaluation of thermal, structural, chemical, mechanical and morphological properties of six pineapple leaf

fiber varieties for use in composites. *Journal Industrial Crops and Products*, v. 43, p. 529 – 537, 2012.

NOGUEIRA, O. L. et al. Açaí. **Embrapa Amazônia Oriental**, (Embrapa Amazônia Oriental. Sistemas de Produção, 4), p. 137, 2005.

NONAKA, K. et al. Enhancement of metabolites productivity of *Penicillium pinophilum* FKI-5653, by co-culture with *Trichoderma harzianum* FKI-5655. *Journal of Antibiotics*, v. 64, n. 12, p. 769–774, 2011.

OGEDA, T. L. E PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 7, 1549-1558, 2010.

OLIVEIRA, J. A. Efeito do tombamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.). 111 f. **Dissertação** (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

OLIVEIRA, M. S. P.; NETO, J. T. F.; PENA, R. S. Açaí: Técnicas de Cultivo e Processamento. **In: 7º Flor Pará – Semana da Fruticultura, Floricultura e Agroindústria**, Belém, Pará, 2007.

PALA, D. et al. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) dietary intake affects plasma lipids, apolipoproteins, cholesteryl ester transfer to high-density lipoprotein and redox metabolism: A prospective study in women. **Clinical Nutrition**, v. 37, n. 2, p.618-623, 2018.

PAYNE, Christina M. et al. Fungal cellulases. **Chemical reviews**, v. 115, n. 3, p. 1308-1448, 2015.

PESSOA, J. D. C. et al. Characterization of açaí (*E. oleracea*) fruits and its processing residues. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, v. 53, n. 6, p.1451-1460, 2010.

PHITSUWAN, P. et al. Present and potential applications of cellulases in agriculture, biotechnology, and bioenergy. **Folia Microbiol.**, 58, pp. 163-176, 2013.

PICCOLI-VALLE, R. H. et al. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* in bioreactors in the absence of inducer. **Brazilian Journal of Microbiology**. v 32, p 135-140, 2001.

PORTINHO, J.A. et al. Efeitos benéficos do açaí. **Int. J. Nutrol.** v.5, p. 15–20, 2012.

QINNGHE, C. et al. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Process Biochemistry**, 39:561- 1566, 2004.

RAHARDJO, Y. S. P. et al. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 161-179, 2006.

REDDY, G. V. et al. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P.ostreatus* and *P. sajor-caju*). **Process of Biochemistry**, 38:1457-1462, 2003.

REGINA, M. Cinética do crescimento miceliano de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler em bagaço de cana-de-açúcar e serragem de eucalipto. 2001. 87p. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

RODRIGUES, R. B., et al. Total Oxidant Scavenging Capacity of *Euterpe oleraceae* Mart. (Açaí) Seeds and Identification of Their Polyphenolic Compounds. **Journal of Agriculture Food and Chemistry**, v. 54, p. 4162–4167, 2006.

ROMERO-PELÁEZ, D. R. Enzimas lignocelulolíticas de basidiomicetos cultivados em biomassas vegetais oriundas da agroindústria do dendê e obtenção de açucares fermentáveis. **Dissertação**. Universidade Federal do Tocantins – UFT, 2017.

ROSSI, A. Ambient pH sensing in filamentous fungi: Pitfalls in elucidating regulatory hierarchical signaling networks. **IUBMB Life** 65(11):930–935. <https://doi.org/10.1002/iub.1217>, 2013.

RUFINO, M.S.M. et al. Açaí (*Euterpe oleraceae*) ‘BRS Pará’: a tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. **Food Res. Int.** 44, 2100–2106, 2011.

RYTIOJA, J. et al. “Plant polysaccharide-degrading enzymes from Basidiomycetes. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, vol. 78,4 (2014): 614-49. Disponível em: < <https://mmbr.asm.org/content/mmbr/78/4/614.full.pdf> >. Acesso em: 14 nov. 2018.

SALES-CAMPOS, C. et al. Uso de resíduos madeireiros da Amazônia brasileira no cultivo in vitro de *Lentinus strigosus*. *Ambiência* v.9 p.189–196, 2013.

SANCHEZ, S.; DEMAINE, A. L. Useful Microbial Enzymes-An Introduction. Chapter 1. In: *Biotechnology of Microbial Enzymes*, 2016.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p.1004-1010, 2012.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 263–289, 2010.

SELISTEANU, D. et al. Microbial production of enzymes: Nonlinear state and kinetic reaction rates estimation. *Biochemical Engineering Journal* 91, 23–36, 2014.

SILVA, R. et al. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Quim Nova**, v.32, p.661, 2009.

SILVA-DIAS, M. M. Canais Reversos da Produção de Polpa de Açaí no Estado do Pará no Contexto da Política Nacionais de Resíduos Sólidos. **CONBREPO**, 2017.

SIMAS, K. N. Resíduo do processamento da palmeira-real (*archontophoenix alexandrae*) orgânica: caracterização físico-química, aplicação em biscoitos fibrosos sem glúten e

avaliação sensorial pelo consumidor celíaco. **Dissertação** (Ciência dos alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. p. 168, 2008.

SINITSYNA, O. A. et al. Isolation and characterization of extracellular pectin lyase from *Penicillium canescens*. **Biochemistry**. v. 72, p 565-567, 2007.

SORRENTINO, W. Alternativas de uma fibra vegetal. 2017. Disponível em: <<https://waltersorrentino.com.br/2017/03/27/alternativas-de-uma-fibra-vegetal-por-revista-fapesp/>>. Acesso em: 25 jan. 2018.

SOUZA, M. P. et al. O Produto Florestal Não Madeirável (PFNM) Amazônico açaí nativo: proposição de uma organização social baseada na lógica de cadeia e rede para potencializar a exploração local. **Revista de Administração e Negócios da Amazônia**, v.3, p.44-57, 2011.

SOUZA, W. R. Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass. In: CHANDEL, D. A. (Ed.). Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, pplications and Commercialization. [s.l.] InTech, p. 135–152, 2013.

SOUZA, N. F. et al. Nanocelulose e lignina obtidas de fibras do mesocarpo do dendê. (**12º Congresso Brasileiro de Polímeros - 12º CBPol**), 2013.

SU, Y, et al. Evaluation of screened lignin-degrading fungi for the biological pretreatment of corn stover. **Sci Rep** 8(1):1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23626-6>, 2018.

SUFRAMA. Potencialidades - Estudo de Viabilidade Econômica. Vol. 1 – Açaí. Manaus, 2003.

TEIXEIRA, W. F. *Trichoderma spp.* Isolados dos resíduos de abacaxi para produção de enzimas extracelulares em sistema de cultura mista. **Trabalho de conclusão de curso**. Universidade Federal do Tocantins, Gurupi-TO, 2015.

TEIXEIRA L. B. et al. Processos de compostagem usando resíduos das agroindústrias de açaí e do palmito do açazeiro. **EMBRAPA** (Circular técnica 41), 2015.

THAKUR, S. Lipases, its sources, properties and applications: a review. International Journal of Scientific & Engineering Research. v.3, n.7, p.1-40, 2012.

TIAN, X.; FANG, Z.; GUO. F. Impact and prospective of fungal pre-treatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Biofuels Bioprod Biorefin** 6:335–350. <https://doi.org/10.1002/bbb>, 2012.

TREICHEL, H. et al. Review on Microbial Lipases Production. Food Bioprocess Technol. 3:182–196, 2010.

UEDA, S.; FUJIO, Y.; LIM, J.Y. Production and some properties of pectic enzymes from *Aspergillus oryzae* A-3. **Journal of Applied Biochemistry**, v. 4, p. 524-532, 1982.

VASCONCELOS, M. S. et al. Açaí or Brazilian Berry (*Euterpe oleracea*). **Nonvitamin And Nonmineral Nutritional Supplements**, p.131-133, 2019.

WAKEFIELD, J. et al. Dual induction of new microbial secondary metabolites by fungal bacterial co-cultivation. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, n. JUL, p. 1–10, 2017.

WEN, Z. Y.; LIAO, W.; CHEN, S. L. **Production of cellulase/beta-glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure.** *Process Biochemistry*, 40, p. 3087-3094, 2005.

WOJCIESZEK, J.; RUZIK, L. Enzymatic Extraction of Copper Complexes with Phenolic Compounds from Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Fruits. *Food Anal Methods*. Volume 9, edição 7, p. 2105-2114. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0395-0>, 2016.

YADAV, S. et al. Pectin lyase: a review. ***Process Biochem.*** 44, 1–10, 2009.

YAMAGUCHI, K. K. L. et al. Amazon acai: Chemistry and biological activities. ***Food Chemistry***, v. 179, p.137-151, 2015.

YUYAMA, L. K. O. et al. Caracterização físico-química do suco de açai de *Euterpe precatoria* Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. ***Acta Amazonica***, v. 41, n. 4, p.545-552, 2011.