



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CÂMPUS DE PALMAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CELULOLÍTICO DE FUNGOS
FILAMENTOSOS DO BIOMA CERRADO VISANDO
À PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

ÁUREA WELTER

**PALMAS - TO
JUNHO/2019**

ÁUREA WELTER

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CELULOLÍTICO DE FUNGOS
FILAMENTOSOS DO BIOMA CERRADO VISANDO
À PRODUÇÃO DE BIOETANOL

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biodiversidade e
Biotecnologia –BIONORTE como requisito
parcial à obtenção do grau de Doutor em
Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Adriano Guarda

PALMAS - TO
JUNHO/2019

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

W464a Welter, Áurea.
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CELULOLÍTICO DE FUNGOS
FILAMENTOSOS DO BIOMA CERRADO VISANDO À PRODUÇÃO DE
BIOETANOL. / Áurea Welter. – Palmas, TO, 2019.
120 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus
Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em
Biodiversidade e Biotecnologia, 2019.
Orientador: Emerson Adriano Guarda

1. Enzimas celulolíticas. 2. Fungos filamentosos. 3. Material
lignocelulósico. 4. Paraphaeosphaeria arecacearum . 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).

ÂUREA WELTER

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CELULOLÍTICO DE FUNGOS
FILAMENTOSOS DO BIOMA CERRADO VISANDO
À PRODUÇÃO DE BIOETANOL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – BIONORTE, foi avaliada para a obtenção de título de Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia, e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca examinadora.

Data de aprovação: 27/06/2019

Banca examinadora:



Prof. Dr. Emerson Adriano Guarda
Orientador, UFT



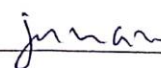
Prof.ª Dr. José Maria Rodrigues da Luz
Examinador externo, UFAL



Prof.ª Dra. Solange Cristina Carreiro
Examinadora interna, UFT



Prof. Dr. Horllys Gomes Barreto
Examinador interno, UFT



Prof. Dr. Guilherme Nobre Lima do Nascimento
Examinador interno, UFT

Palmas-TO
Junho/2019

Dedico este trabalho à minha família, meu alicerce, refúgio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr Emerson Adriano Guarda, pelos conhecimentos compartilhados e dedicação na orientação do trabalho.

A Prof^a. Dra Paula Benevides, por disponibilizar a infra-estrutura do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia – LAMBIO, onde grande parte do trabalho experimental foi realizado.

A Dra Jéssica Jéssica Barros Aguiar Silva, por ter disponibilizado os microrganismos bem como pela ajuda e esclarecimentos essenciais para a realização do trabalho.

Aos servidores do LAMBIO, Cristina e Márcia, e LAPEQ, Álvaro, pelo suporte e ajuda prestados.

Aos meus colegas, Celso, Clemilson, Danilo, Jaqueline, Jéssica e Morgana, pela amizade e momentos de descontração proporcionados.

Aos funcionários do LAPEQ, Mayana, Larissa e Fabrício, pela amizade, momentos de recreação e auxílio prestado para a realização do trabalho.

Aos secretários Valmir e Geane, pelo auxílio nas demandas pedagógicas.

À minha família, pelas palavras de apoio e motivação que foram essenciais para essa conquista.

A UFT e a REDE Bionorte, por oportunizar a minha qualificação profissional.

RESUMO

Atualmente, há um crescente interesse na produção etanol celulósico, sendo uma alternativa promissora aos combustíveis fósseis. Fontes produtoras de celulases, como fungos tem sido investigadas, no entanto, os associados a detritos foliares em decomposição, são pouco estudados neste sentido. Nesse contexto, objetivou-se avaliar a produção do complexo celulolítico por fungos filamentosos associados a detritos foliares em decomposição, em riacho do Bioma Cerrado e, selecionar um isolado, a fim de otimizar a produção de celulases para posterior aplicação na hidrólise de materiais lignocelulósicos. Um total de 27 isolados foram submetidos a fermentação submersa, na presença de carboximetilcelulose, por sete dias, a 35 °C e agitação constante a 150 rpm, e os apresentaram maior atividade de celulase total foram identificados por sequenciamento da região ITS do rDNA. Para otimizar a produção celulases foi realizado inicialmente um planejamento Placket-Burman para a triagem de variáveis significativas, em seguida estas foram otimizadas aplicando um delineamento composto central rotacional. Definida a melhor condição de produção de celulases, esta foi utilizada no cultivo do isolado selecionado e o extrato enzimático bruto assim obtido, utilizado para caracterização bioquímica parcial. O extrato enzimático bruto bem como uma preparação enzimática comercial foram aplicados na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar e de casca de arroz, ambos pré tratados com peróxido de hidrogênio em meio alcalino, avaliando-se a produção de açúcares redutores. Os 27 isolados produziram celulases, no entanto, oito apresentaram melhor atividade sendo que esta variou de 0,272 a 0,343 U/mL, 0,355 a 0,485 U/mL, e 0,250 a 0,335 U/mL respectivamente, para celulase total, endoglicanase e exoglicanase. A partir do sequenciamento da região ITS do rDNA, estes isolados foram identificados, a saber, *Aspergillus sydowii*, *Cladosporium* sp., *Paraphaeosphaeria arecacearum*, *Penicillium simplicissimum* e *Penicillium citrinum*. A produção de celulases por *Paraphaeosphaeria arecacearum*, a nova fonte produtora de celulases identificada no presente estudo, foi otimizada obtendo-se máxima produção na presença de peptona (4 gL⁻¹), pH 4,0 e 11 dias de cultivo, sendo esta de 6,32 U.g⁻¹ ss para celulase total, 7,58 U.g⁻¹ ss para endoglicanase e 5,08 U.g⁻¹ ss para exoglicanase. A caracterização bioquímica parcial do extrato enzimático bruto, indicou uma atividade ótima para celulase total e endoglicanase em pH 5,5 e temperatura 50 °C e, para exoglicanase em pH 5,0 e temperatura de 45 °C. O extrato enzimático bruto foi utilizado na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar e casca de arroz sendo que após 72 horas de hidrólise, a produção de açúcares redutores totais foi de 60,7 mg.g⁻¹ na presença do bagaço de cana e 37,2 mg.g⁻¹ quando empregado a casca de arroz, o que corresponde a eficiência de respectivamente, 51% e 61,7% menor do extrato bruto se comparado a preparação comercial. As celulases produzidas por *Paraphaeosphaeria arecacearum* mostram-se promissoras na hidrólise de materiais lignocelulósicas objetivando a produção de biocombustíveis. Destaca-se a importância dos resultados obtidos no presente trabalho como pesquisa básica, pois não há relatos na literatura acerca da produção de celulases por *Paraphaeosphaeria arecacearum*.

Palavras-chave: Celulases fúngicas. *Paraphaeosphaeria arecacearum*. Biomassa lignocelulósica. Otimização. Hidrólise enzimática

ABSTRACT

Currently, there is a growing interest in cellulosic ethanol production, and is a promising alternative to fossil fuels. New cellulase-producing sources such as fungi have been investigated, however, those associated with decomposing foliar debris are little studied in this sense. In this context, the objective was to evaluate the production of the cellulolytic complex by filamentous fungi associated with decomposing foliar debris in the stream and to select an isolate in order to optimize the cellulase production for later application in the hydrolysis of lignocellulosic materials. A total of 27 isolates were submitted to submerged fermentation in the presence of carboxymethylcellulose for seven days at 35 ° C and constant agitation at 150 rpm and the highest total cellulase activity were identified by sequencing of the rDNA ITS region. The selected isolate to optimize the production cellulases was initially performed a Placket-Burman planning for the screening of significant variables, then these were optimized applying a rotational central compound design. The best cellulase production condition was defined this was used in the culture of the isolate and the crude enzyme extract thus obtained, used for partial biochemical characterization. From the knowledge of the conditions of the best activity of the total cellulase, the crude enzymatic extract as well as a commercial enzymatic preparation were applied in the hydrolysis of sugarcane bagasse and rice husk, both pretreated with hydrogen peroxide in medium the production of reducing sugars. The 27 isolates studied produced cellulases; however, eight presented the best activity, ranging from 0.272 to 0.343 U / mL, 0.355 to 0.485 U / mL, and 0.250 to 0.335 U / mL, respectively, for total cellulase, endoglycanase and exoglycanase. From the sequencing of the ITS region of the rDNA, these isolates were identified, namely, *Aspergillus sydowii*, *Cladosporium* sp., *Paraphaeosphaeria arecacearum*, *Penicillium simplicissimum* and *Penicillium citrinum*. The production of cellulases by *Paraphaeosphaeria arecacearum*, the new source of cellulases identified in the present study, was optimized obtaining maximum yield in the presence of 4 gL⁻¹ peptone, pH 4.0 and 11 days of cultivation, being 6, 32 U.g⁻¹ ss for total cellulase, 7.58 U.g⁻¹ ss for endoglycanase and 5.08 U.g⁻¹ ss for exoglycanase. The partial biochemical characterization of the crude enzyme extract indicated an optimal activity for total cellulase and endoglycanase at pH 5.5 and temperature 50 ° C and for exoglycanase at pH 5.0 and temperature of 45 ° C. The crude enzymatic extract was used in the hydrolysis of sugarcane bagasse and rice hulls, and after 72 hours of hydrolysis, the production of total reducing sugars was 60.7 mg.g⁻¹ in the presence of sugarcane bagasse and 37.2 mg.g⁻¹ when the rice husk was used, which corresponds to efficiency respectively, 51% and 61.7% lower than the crude extract when compared to commercial preparation. *Paraphaeosphaeria arecacearum* shows promise in the hydrolysis of lignocellulosic materials with the objective of producing biofuels. It is important to note the importance of the results obtained in this work as a basic research, since there are no reports in the literature about the production of cellulases by *Paraphaeosphaeria arecacearum*.

Key words: Fungal cellulases. *Paraphaeosphaeria arecacearum*. Lignocellulosic biomass. Optimization. Enzymatic hydrolysis

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
REFERENCIAS.....	13
2 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA NA PRODUÇÃO DE CELULASES.....	16
2.1 Introdução.....	16
2.2 Desenvolvimento.....	17
2.2.1 Biocombustíveis de segunda geração.....	17
2.2.2 Biomassa lignocelulósica.....	18
2.2.2.1 <i>Bagaço de-cana-de-açúcar</i>	20
2.2.2.2 <i>Casca de arroz</i>	22
2.3 Enzimas que atuam na hidrólise da biomassa lignocelulósica.....	23
2.4 Fungos produtores de celulases.....	24
2.5 Considerações finais.....	27
2.6 Perspectivas futuras.....	27
REFERÊNCIAS.....	27
3 FUNGOS PRODUTORES DE CELULASES ASSOCIADOS A DETRITOS VEGETAIS EM DECOMPOSIÇÃO EM RIACHO DO CERRADO DO BRASIL.....	34
3.1 Introdução.....	35
3.2 Material e métodos.....	36
3.2.1 Obtenção de microrganismos.....	36
3.2.2 Produção de celulases por fermentação submersa.....	36
3.2.2.1 <i>Preparo do inóculo</i>	36
3.2.2.2 <i>Fermentação submersa</i>	36
3.2.3 Determinação da atividade de enzimas celulolíticas.....	37
3.2.4 Identificação molecular	37
3.2.4.1 <i>Massa micelial</i>	37
3.2.4.2 <i>Extração do DNA e identificação dos isolados a partir da amplificação da região ITS do rDNA e sequenciamento</i>	37
3.2.5 Análise estatística.....	38
3.3 Resultados.....	38
3.3.1 Atividade celulolítica por fermentação submersa.....	38
3.3.2 Identificação molecular de fungos filamentosos por sequenciamento da região ITS do rDNA.....	41

3.4 Discussão.....	41
3.5 Conclusão.....	45
Referências.....	46
4 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES POR <i>Paraphaeosphaeria</i>	53
<i>arecacearum</i>	
4.1 INTRODUÇÃO.....	53
4.2 EXPERIMENTAL.....	54
4.2.1 Microrganismo.....	54
4.2.2 Pré-tratamento da biomassa.....	54
4.2.3 Produção de celulases por fermentação submersa.....	54
4.2.4 Atividade das enzimas celulolíticas.....	55
4.2.5. Delineamento experimental Placket-Burman (PB).....	55
4.2.6 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e metodologia de	56
superfície de resposta	
4.2.7 Análise estatística.....	57
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.3.1 Triagem de variáveis pelo planejamento Placket-Burman.....	57
4.3.2 Análise do planejamento DCCR e metodologia de superfície de	60
resposta.....	
4.4 CONCLUSÕES.....	67
REFERENCIAS CITADAS.....	67
5 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO DE	72
<i>Paraphaeosphaeria arecacearum</i> E APLICAÇÃO NA SACARIFICAÇÃO	
LIGNOCELULÓSICA.....	
5.1 INTRODUÇÃO.....	72
5.2 EXPERIMENTAL.....	73
5.2.1 Microrganismo.....	73
5.2.2 Pré-tratamento dos resíduos agroindustriais.....	73
5.2.3 Produção de celulases por fermentação submersa.....	74
5.2.4 Atividade das enzimas celulolíticas.....	74
5.2.5 Caracterização parcial do extrato bruto de <i>Paraphaeosphaeria</i>	74
<i>arecacearum</i>	
5.2.5.1 Efeito do pH e da temperatura.....	74

5.2.5.2 <i>Estabilidade térmica e ao pH</i>	75
5.2.6 Hidrólise enzimática de resíduos agroindustriais	75
5.2.7 Análise estatística	75
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.3.1 Caracterização bioquímica	75
5.3.1.1 <i>Efeito do pH e da temperatura na atividade das celulases</i>	75
5.3.1.2 <i>Efeito do pH e da temperatura na estabilidade das celulases</i>	77
5.3.2 Sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais	80
5.4 CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS CITADAS	83
CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
APÊNDICE A	89
ANEXO 1	92
ANEXO 2	105

1 INTRODUÇÃO

Biomoléculas provenientes de recursos naturais, como as enzimas, tem ampla aplicabilidade em processos industriais, o que aumentou a demanda global nos últimos anos, com estimativa de crescimento de 6,83% durante o período de 2019-2024 (RESEARCH AND MARKETS, 2019a), impulsionado principalmente pela crescente diversidade de aplicações e normas ambientais rigorosas que limitam o uso de produtos químicos (JAYASEKARA; RATNAYAKE, 2019).

Dentre as enzimas de interesse industrial estão as celulasas, que no ambiente natural são produzidas por fungos, bactérias e actinomicetos, porém a eficiência na produção e a composição do complexo de enzimas diverge entre os microrganismos produtores. Segundo relatórios recentes do mercado de enzimas, estas são utilizadas na área da saúde, têxtil, celulose e papel, detergente, alimentos e bebidas e, principalmente na hidrólise de lignocelulose, objetivando a produção de etanol de segunda geração (JAYASEKARA; RATNAYAKE, 2019), área em que o emprego de carbohidrases, dentre elas as celulasas aumentou exponencialmente, estimando-se um crescimento de 9,05% no período de 2019-2024 (RESEARCH AND MARKETS, 2019b).

Embora o desempenho das enzimas celulósicas comerciais utilizadas neste processo tenha melhorado bastante desde a década passada, as celulasas ainda representam um custo operacional significativo, o que limita economicamente a aplicação industrial (KLEIN-MARCUSCHAMER et al., 2012; KUBICEK et al., 2009). Segundo Humbird et al., (2011) a fonte de carbono utilizada na produção de enzimas pode representar mais de 50% do custo total desta, o que tem um impacto desfavorável no preço do etanol celulósico. Estudos propõem a utilização de resíduos agroindustriais como substrato indutor da produção de enzimas celulolíticas por fungos, sendo esta uma alternativa econômica e ecologicamente viável para a destinação desses recursos bem como a produção de enzimas em larga escala (AGOSTINHO et al., 2015; YOON et al., 2014).

Resíduos provenientes da agroindústria constituem fontes baratas e são utilizados como substrato ou fonte de carbono no processo fermentativo para obtenção de compostos de interesse industrial. Tal montante justifica-se pelo interesse gerado por processos que envolvem tecnologia de baixo custo energético, com menor impacto ambiental e que utilizam matérias primas renováveis,

adequando-se ao reaproveitamento de subprodutos da agroindústria (COELHO, 2001).

Estudos acerca da disponibilidade de biomassas, em termos mundiais e no Brasil, mostram que haverá um significativo incremento, principalmente de resíduos agrícolas, até 2030. (WELFLE, 2017). Logo, o aumento da biomassa irá contribuir significativamente para a geração de energia elétrica e produção de etanol de segunda geração. Segundo Maluf (2014), pode haver competição entre as duas tecnologias pelo uso do substrato, no caso o bagaço de cana-de-açúcar. Sendo assim, a tecnologia mais eficiente empregará maior volume de biomassa, e nesse cenário o processo de produção do etanol de segunda geração necessita se tornar mais atrativo.

O grande potencial que as celulases assumem nas indústrias de bioenergia emergentes constitui motivação para buscar novas fontes e alternativas que visam reduzir o custo de produção das enzimas, já que celulases representam um dos insumos que oneram significativamente o processo de produção do etanol de segunda geração. Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo geral, avaliar a produção do complexo celulolítico por fungos filamentosos associados a detritos foliares em decomposição, em riacho do Bioma Cerrado, a fim de otimizar a produção de celulases para posterior utilização do extrato bruto enzimático no processo de hidrólise de materiais lignocelulósicos.

Foram objetivos específicos do trabalho, analisar a produção de celulases por meio da fermentação submersa utilizando como substrato carboximetilcelulose (CMC); identificar taxonomicamente os isolados de interesse por meio do sequenciamento da região do espaço interno transcrito (ITS) do DNA ribossomal; otimizar a produção de celulases por fermentação submersa, usando como biomassa o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com peróxido de hidrogênio em meio alcalino; caracterizar bioquimicamente o extrato enzimático bruto; avaliar o potencial do complexo celulolítico na hidrólise de biomassas lignocelulósicas pré-tratadas com peróxido de hidrogênio em meio alcalino.

O capítulo I, intitulado *Biomassa lignocelulósica na produção de celulases*, consiste em uma revisão bibliográfica sobre fungos filamentosos produtores de celulases e características de biomassas empregadas na produção de etanol celulósico. O presente capítulo foi publicado no livro *Tópicos Especiais em Biotecnologia e Biodiversidade- Volume I* (Apêndice A).

No capítulo II, sob o título de *Fungos produtores de celulases associados a detritos vegetais em decomposição em riacho do Cerrado do Brasil*, são abordados os dados de triagem de fungos quanto a produção de celulase total, endoglicanase e exoglicanase bem como a identificação molecular dos fungos de interesse. O artigo será submetido a revista *Brazilian Journal of Microbiology* (Normas da revista - Anexo 1).

No capítulo III, intitulado *Otimização da produção de celulase por Paraphaeosphaeria arecacearum*, é apresentada a otimização das condições de cultivo de *Paraphaeosphaeria arecacearum* objetivando a produção de celulases, utilizando como biomassa indutora o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com peróxido de hidrogênio em meio alcalino. O artigo será submetido a revista *Bioresources* (Normas da revista - Anexo 2).

O capítulo IV, intitulado *Caracterização parcial do extrato enzimático bruto de Paraphaeosphaeria arecacearum e aplicação na sacarificação lignocelulósica*, traz a caracterização bioquímica do extrato enzimático bruto produzido por *Paraphaeosphaeria arecacearum* e o emprego deste na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar e da casca de arroz pré-tratados com peróxido de hidrogênio em meio alcalino. O artigo será submetido a revista *Bioresources* (Normas da revista - Anexo 2).

REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, F. et al. Influence of cellulase enzyme production on the energetic-environmental performance of lignocellulosic ethanol. **Ecological Modelling**, v. 315, p. 46-56, 2015.

COELHO, et al. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **Boletim CEPPA**, v. 19, p. 33-42, 2001.

HUMBIRD, D. et al. **Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol**, NREL/TP-5100-47764, 2011.

JAYASEKARA, S., E RATNAYAKE, R. Microbial Cellulases: an overview and applications. In: Cellulase. *IntechOpen*.p. 1-21, 2019.

KLEIN-MARCUSCHAMER, D. et al. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, p. 1083-1087, 2012.

KUBICEK C. P, et al. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 19, p. 1-14, 2009.

MALUF, G. **A competição entre o etanol de segunda geração e a produção de eletricidade pelo uso do bagaço**. 2014. 93 f. Dissertação (Mestrado em Agronegócio) -Fundação Getúlio Vargas, São Paulo, 2014.

RESEARCH AND MARKETS. **Industrial Enzymes Market - Growth, Trends, and Forecast (2019 - 2024)**. 2019a. 230p.

RESEARCH AND MARKETS. **Biofuel Enzymes Market - Forecasts from 2019 to 2024**. 2019b 106p.

WELFLE. A. Balancing growing global bioenergy resource demands - Brazil's biomass potential and the availability of resource for trade. **Biomass and Bioenergy**. v. 105, p. 83-95, 2017.

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

CAPITULO I

BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA NA PRODUÇÃO DE CELULASES

2 BIOMASSA LIGNOCELULOSICA NA PRODUÇÃO DE CELULASES

2.1 Introdução

A demanda energética mundial é dependente de combustíveis fósseis, sendo que em 2015, 78,4% da energia total global foi obtida pela queima de combustíveis fósseis (RENEWABLE ENERGY POLICY NETWORK FOR THE 21st CENTURY 2017).

Vários são os desafios em relação aos combustíveis convencionas enfrentados por distintos países, dentre os quais, destaca-se o rápido aumento do consumo de todos os tipos de combustíveis fósseis devido à crescente industrialização e motorização, o que compromete as reservas que são limitadas. Além disso, os combustíveis fósseis contribuem na emissão de gases de efeito estufa e aquecimento global que causa mudanças climáticas, perda de biodiversidade e poluição urbana (SINGH et al. 2010).

Diante do exposto, fica evidente a necessidade de fontes alternativas de energia para o consumo da sociedade e economia industrial. O etanol, termo que se refere ao álcool etílico (C_2H_5OH) obtido a partir de açúcares fermentescíveis (BAEYENS et al. 2015), é uma das alternativas mais promissoras e ecológicas aos combustíveis fósseis, uma vez que é produzido a partir de fontes renováveis (ZABED et al. 2016).

O etanol de primeira geração é derivado da fermentação da glicose presente em culturas ricas em sacarose e amido. Os EUA e o Brasil são os maiores produtores mundiais sendo que nos EUA a matéria-prima utilizada é o milho e no Brasil, atualmente o milho e a cana-de-açúcar. Na Europa, a batata, o trigo e a beterraba são as matérias-primas utilizadas com a mesma finalidade (FUNDAÇÃO GETÚLIO VARGAS 2017, JAMBO et al. 2016).

Conhecido como biocombustível avançado e etanol celulósico, o etanol de segunda geração também representa um recurso renovável promissor para a produção sustentável de etanol em um futuro próximo (ZABED et al. 2016). A produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, dentre os quais resíduos agrícolas (palha e bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz, palha de trigo e resíduos de milho) e resíduos florestais (pó e restos de madeira), tem como vantagens a disponibilidade, baixo preço caso não necessite ser transportado por

longas distâncias, não competitividade com a cadeia alimentar, e por muitas vezes constituir um material residual (LARSEN et al. 2012).

Um estudo recente avaliou as patentes depositadas nos EUA no período de 2002 a 2015, sobre biocombustíveis lignocelulósicos envolvendo áreas de tecnologia, como catálise enzimática. Do total de 1069 patentes depositadas no período de estudo, 645 são de origem do país de estudo, seguido da Alemanha, com 69 e o Japão, com 61. O Brasil ocupa a 11ª posição com 13 patentes, posição essa que divide com a Suécia e Itália. A partir desses dados percebe-se um interesse econômico e tecnológico mundial emergente por biocombustíveis lignocelulósicos, o que está ligado a uma ampla mudança social, econômica e ambiental, como o aumento da demanda por energia nos países em desenvolvimento (TOIVANENA & NOVOTNYD 2017).

O processo de produção do etanol de segunda geração em escala industrial ainda envolve muitos obstáculos se comparado com a produção de etanol de primeira geração, sendo o principal o alto custo de produção, uma vez que os materiais lignocelulósicos apresentam uma complexa estrutura da parede celular, no geral, resistente à bioconversão, o que torna necessário o processo de pré-tratamento (JAMBO et al. 2016). Além disso, para a sacarificação destes objetivando a produção de bioetanol, as celulasas são indispensáveis, porém tem um elevado custo de produção (IRSHAD et al. 2013).

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Biocombustíveis de segunda geração

O termo biocombustível refere-se a combustíveis líquidos ou gasosos com aplicação no setor de transporte e predominantemente produzidos a partir de biomassa. Dentre os principais combustíveis produzidos a partir destes recursos naturais, destaca-se o o etanol. O etanol, produzido a partir de biomassas residuais de composição lignocelulósica, abundantemente geradas nos setores agrícolas e florestais, é denominado de etanol de segunda geração. A escolha ou uso de biomassas lignocelulósicas para fins de produção de etanol de segunda geração deve ser regionalizada e depende da disponibilidade da matéria-prima (BRANCO 2013).

No Brasil, a produção de etanol de segunda geração, é uma tecnologia que viabiliza a obtenção de etanol a partir do bagaço e palha de cana-de-açúcar, aproveitando resíduos gerados na produção do etanol de primeira geração. O processo de obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos consta de duas etapas básicas: pré-tratamento e a hidrólise. A primeira etapa consiste no pré-tratamento da biomassa que tem a função de desordenar a rígida estrutura desta e tornar a celulose e a hemicelulose mais acessíveis às enzimas. A segunda etapa envolve a hidrólise da celulose para produção de glicose, o que necessita de enzimas celulolíticas apropriadas para produção de açúcares fermentescíveis provenientes da fração lignocelulósica (celulose e hemicelulose) presentes em diferentes biomassas. Em seguida, ocorre o processo de fermentação, que consiste em um processo biológico anaeróbico em que os açúcares liberados na hidrólise enzimática são convertidos a etanol por meio de ação microbiana. Por último, a destilação, como acontece no processo clássico de produção de etanol de primeira geração (COTANA et al. 2014, VIIKARI et al. 2012).

2.2.2 Biomassa lignocelulósica

Biomassa é qualquer matéria de origem vegetal que dispõe de energia acumulada em sua constituição química e que pode ser processada para fornecer energia adequada para o uso final (ZHANG & SMITH 2007). A origem da biomassa pode ser agrícola (arroz, cana-de-açúcar, soja, mandioca), florestal (madeira) ou de resíduos industriais ou urbanos, líquidos ou sólidos.

Um estudo recente analisou o potencial do Brasil no que se refere a disponibilidade de biomassa. Evidenciou-se que até 2015 resíduos agrícolas como palha representaram mais de 7,1% do total da biomassa, com estimativa de chegar a mais de 8,3% até 2030. Em relação a biomassa decorrente de plantações, esta contribuiu com 78,8% do total até 2015, com previsão de ultrapassar 80,0% até 2030, sendo que a cana-de-açúcar representa mais de 68% do total até 2030 (WELFLE 2017).

A biomassa lignocelulósica, a qual representa a fonte renovável mais abundante do mundo, corresponde ao conjunto dos polímeros estruturais presente nos vegetais, sendo estes a lignina, a celulose e a hemicelulose. A celulose e hemicelulose são macromoléculas constituídas por diferentes açúcares e a lignina, uma macromolécula aromática sintetizada a partir de precursores fenilpropanóides.

Estes polímeros encontram-se conectados por ligações covalentes e não covalentes, formando uma malha entrelaçada na parede das células vegetais (SÁNCHEZ 2009).

Quanto a composição da a biomassa lignocelulósica, esta pode variar, como se evidencia na Tabela 1, já que é influenciada pelo tipo de biomassa, da parte da planta escolhida, fase de crescimento, idade, dentre outros fatores.

Tabela 1 - Composição de biomassas lignocelulósicas com potencial para produção de etanol de segunda geração

Biomassa Lignocelósica	% Celulose	% Hemicelulose	% Lignina
Palha de cana	40-44	30-32	22-25
Bagaço de cana	32-48	19-24	23-32
Madeira dura	43-47	25-35	16-24
Madeira mole	40-44	25-29	25-31
Talo de milho	35	25	35
Espiga de milho	45	35	15
Algodão	95	2	0,3
Palha de trigo	30	50	15
Sisal	73,1	14,2	11
Palha de arroz	43,3	26,4	16,3
Forragem de milho	38-40	28	7-21
Fibra de coco	36-43	0,15-0,25	41-45
Fibra de bananeira	60-65	6-8	5-10
Casca de arroz	32	21	21
Palha de cevada	31-45	27-38	14-19

Fonte: Adaptado de CHAKRABORTY et al. 2011, SANTOS et al. 2012).

A celulose, principal polissacarídeo estrutural das paredes de células vegetais, é uma substância fibrosa, de elevado peso molecular, resistente à tração e insolúvel em água. É um homopolissacarídeo linear, não ramificado, formado por subunidades de glicose, unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1,4). Cada resíduo de glicose tem uma orientação de 180° em relação ao resíduo adjacente, formando uma unidade repetitiva de dois resíduos que se denomina celobiose. A extremidade da cadeia de celulose em que se encontra um carbono anomérico livre

é chamada de extremidade redutora, e a extremidade em que o carbono anomérico não está disponível é chamada de não redutora (LYND et al., 2002).

As ligações de hidrogênio intramoleculares entre as hidroxilas conferem resistência à celulose, enquanto aquelas que unem cadeias adjacentes (intermoleculares), favorecem uma forte interação entre estas, em fileiras paralelas, formando as microfibrilas, que são agregados extremamente longos e cristalinos. Essas moléculas de celulose formam os feixes de fibrilas de celulose, os quais são organizados em lamelas para formar as várias camadas que compõe a estrutura da parede celular vegetal (HENDRIKS & ZEEMAN 2009, JUTURO & WU 2014, SANTOS et al. 2012).

As hemiceluloses apresentam uma estrutura heterogênea, ramificações e natureza amorfa, características que facilitam sua hidrólise em comparação com a celulose. A estrutura das hemiceluloses inclui pentoses (xilose e arabinose), hexoses (glicose, galactose e manose) e compostos fenólicos como o ácido ferúlico e o ácido p-cumárico (GÍRIO et al. 2010). A xilana constitui o principal componente da hemicelulose e segundo polissacarídeo constituinte da biomassa vegetal mais abundante na natureza após a celulose. As hemiceluloses ligam-se de forma não covalente à superfície das microfibrilas de celulose, cobrindo-as e mantendo ligações cruzadas via pontes de hidrogênio, formando o chamado domínio celulose-hemicelulose da parede celular (HENDRIKS & ZEEMAN 2009).

A lignina é um polímero fenólico, uma macromolécula tridimensional amorfa, sendo o terceiro composto mais abundante na natureza, depois da celulose e hemicelulose. Nos tecidos vegetais, a lignina não é encontrada como uma molécula independente, mas sim associada com outros polímeros, em especial hemiceluloses (principalmente as xilanas), via ligações covalentes, formando uma matriz complexa que circunda as microfibrilas de celulose. A principal função da lignina é dar resistência às plantas contra fitopatógenos, ao estresse oxidativo além de conferir rigidez aos tecidos vegetais (SANDGREN et al. 2005).

2.2.2.1 Bagaço de-cana-de-açúcar

O Brasil ocupa lugar de destaque por ser o maior produtor mundial de cana-de-açúcar com um processamento de 657,1 milhões de toneladas na safra 2016/2017, segundo Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB 2017). A Região Centro-Sul (Estados das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste) responde por

90% deste volume, e os 10% restantes cabem aos Estados da região Norte e Nordeste. Em 2014, o valor bruto movimentado pela cadeia sucroenergética superou US\$ 100 bilhões, com um PIB de aproximadamente US\$ 43 bilhões, o que equivalente a cerca de 2% do PIB brasileiro (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA DE AÇÚCAR 2015).

Quanto a produção de etanol de primeira geração, o Brasil ocupa a posição de segundo maior produtor global, perdendo apenas para os Estados Unidos. A produção de etanol no país na safra 2016/17 totalizou 27,81 bilhões de litros (CONAB 2017). No entanto, o país tem capacidade de expansão do cultivo e uma vantagem competitiva frente aos seus concorrentes, que é a utilização da cana-de-açúcar, enquanto os europeus utilizam a beterraba e os norte-americanos o milho (SOUZA et al. 2012).

O bagaço de cana-de-açúcar é o coproduto que resulta da extração do caldo obtido após passagem do colmo da cana por moendas ou por difusores. A extração do caldo passa de 90-93% com a moagem convencional para 96-98% com a difusão. Por isso, de acordo com o processo de extração do caldo da cana, o bagaço de cana resultante, pode conter diferentes teores residuais de sacarose (DELGADO et al. 1975). Quanto a composição do bagaço de cana este apresenta aproximadamente de 32-48% de celulose, 19-24% de hemicelulose, 23-32% de lignina (SANTOS et al. 2012).

A cada tonelada de cana-de-açúcar moída na indústria obtêm-se 700 litros de caldo e 280-300 kg de bagaço (SILVA et al. 2007), sendo assim o resíduo agroindustrial obtido em maior quantidade no Brasil, considerando o montante processado anualmente. A partir do bagaço tem-se a possibilidade de gerar energia elétrica, a chamada bioenergia ou produzir etanol de segunda geração, já que por ser uma biomassa lignocelulósica contêm altos teores de celulose e outros polissacarídeos que podem ser hidrolisados em açúcares fermentescíveis.

Considerando somente à bioeletricidade da cana-de-açúcar, o setor sucroenergético detém em torno de 7% da potência outorgada no Brasil sendo a terceira fonte de geração mais importante da nossa matriz elétrica em termos de capacidade instalada, atrás somente da fonte hídrica (66,08%) e das termelétricas (17,45%) com gás natural. Dentre as fontes de biomassa lignocelulógicas utilizadas, o bagaço de cana é a principal (78,23%), seguido por resíduos florestais (20%), o

capim elefante (0,46%) e a casca de arroz (0,32%) (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA DE AÇÚCAR 2017).

GranBio e Raízen são as empresas com usinas especializadas na produção de etanol celulósico, em escala comercial, a partir do bagaço e da palha da cana. A Bioflex 1, usina industrial da GranBio foi a primeira do país, sendo inaugurada em 2014 em São Miguel dos Campos (AL), com capacidade de produção de 82 milhões de litros do biocombustível por ano. Raízen, instalada em Piracicaba (SP), foi inaugurada em 2015, com uma estimativa de produção de 40 milhões de litros de etanol celulósico por ano (CENTRO NACIONAL DE PESQUISA EM ENERGIA E MATERIAIS 2017). Até 2024, a Raizen pretende construir mais 7 usinas para a produção de etanol de segunda geração e a Granbio, projetou a instalação de mais 11 unidades até 2022, estimando com isso cada empresa passar a produzir 1 bilhão de litros por ano.

2.2.2.2 Casca de arroz

A casca de arroz, um dos subprodutos do beneficiamento do arroz, totaliza cerca de 20% do peso total do grão (DELLA et al. 2001). A composição da casca de arroz corresponde, aproximadamente, a 32% de celulose, 21% de hemicelulose, 21% de lignina, 20% de sílica e 3% de proteínas, sendo que há variação destes percentuais conforme a safra, condições climáticas, diversificação de solo e localização (CHAKRABORTY et al. 2011).

A casca de arroz torna-se, neste contexto, um resíduo abundante e de baixo valor agregado pelo reduzido valor nutritivo para ruminantes, sendo de difícil digestibilidade, e com grande quantidade de sílica, o que confere características abrasivas ao trato gastrointestinal dos animais (SAHA & COTTA 2008). No entanto, apresenta um alto poder energético, já que contém quase 80% de seu peso em carbono (SOUZA 1993).

Por ser uma biomassa lignocelulósica a casca de arroz é fonte de açúcares hidrolisáveis e por isso constitui uma alternativa futura na produção de etanol de segunda geração. Como a melhor maneira de armazenar o produto é com a casca, tem-se a disponibilidade desta durante o ano todo, além do quantitativo decorrente do montante de arroz beneficiado anualmente no país, fatores que garantem o abastecimento da usina produtora do bioetanol.

2.3 Enzimas que atuam na hidrólise da biomassa lignocelulósica

A hidrólise enzimática da celulose envolve a ação conjunta e coordenada de várias enzimas do complexo celulolítico, denominadas de forma geral de celulases. As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações O-glicosídicas, sendo classificadas pela *Enzyme Commission* (EC) com a codificação 3.2.1.x, onde o valor de x varia com a celulase avaliada (CASTRO & PEREIRA JÚNIOR 2010).

As celulases são classificadas em três grupo de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico (HANPENG et al. 2015, VAN DEN BRINK & VRIES 2011), sendo estes endo- β -1,4-glucanases ou endoglucanases (EG I, EG II, EG III e EG IV); e exo- β -1,4-glucanases ou celobiohidrolases, ou exoglucanases (CBH I e CBH II) β -1,4-glicosidase (BG I e BG II).

A hidrólise da celulose é iniciada pela endoglucanase (EC 3.2.1.4), sendo que esta atua randomicamente nas regiões internas da estrutura amorfa das fibras celulósicas, diminuindo o comprimento das mesmas uma vez que hidrolisa ligações glicosídicas β -(1,4). Com isso, ocorre a liberação de oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (GP) e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor, quando a glicose possui uma hidroxila heterosídica livre e um não redutor, ou seja, quando a hidroxila heterosídica da molécula da extremidade participa de ligação com a glicose adjacente. Dessa forma a endoglucanase rapidamente solubiliza o polímero celulósico (redução do GP), devido à sua fragmentação em oligossacarídeos (CASTRO & PEREIRA JÚNIOR 2010, KLEMAN-LEYER et al. 1996).

As exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) agem de maneira progressiva na hidrólise de terminais redutores (R), função da enzima do tipo I (CBH I) enquanto que a do tipo II (CBH II) hidrolisa terminais não redutores (NR) da celulose. Apresentam maior afinidade por celulose insolúvel ou microcristalina, liberando como produtos glicose e principalmente moléculas de celobiose (SAJITH et al. 2016).

O terceiro e último grande grupo de enzimas do complexo celulolítico, as β -glicosidases (EC 3.2.1.21), tem a propriedade de hidrolisar celobiose e celodextrinas solúveis à glicose (CASTRO & PEREIRA JÚNIOR 2010, LYND et al. 2002). Como as β -glicosidases hidrolisam a celobiose (Figura 1), impedem a ação inibitória desta sobre as celulases, e por isso de grande importância na degradação da celulose (SAJITH et al. 2016).

Quando atuam sinergicamente, as enzimas do complexo celulolítico apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais (CASTRO & PEREIRA JÚNIOR 2010). De acordo com o modelo de sinergismo “endo-exo”, as celobiohidrolases agem como exoenzimas (na extremidade da cadeia) e liberam celobiose como produto principal; as endoglucanases agem randomicamente ao longo da cadeia produzindo novos sítios de ataque para as celobiohidrolases; e as β -glicosidases completam o processo através da hidrólise da celobiose e de outros oligossacarídeos a glicose (ZANDONÁ FILHO 2001). Além disso, as celulases são amplamente utilizadas em interação com as hemicelulases objetivando melhorar o rendimento na hidrólise da celulose (HU et al. 2013).

As celulases podem atuar em substratos similares: endoglucanases agem também sobre hemicelulose; xilanas podem ser degradadas por endoglucanases e celobiohidrolases e β -glicosidases, embora tenham alto grau de especificidade, podem clivar hemicelulose, manose, xilose e galactose (BALDRIAN & VALÁSKOVA 2008).

Ressalta-se que para possibilitar a utilização da celulose e/ou hemicelulose presentes na parede celular vegetal, seja por microrganismos ou em processos biocatalíticos, torna-se necessário o uso de recursos como o pré-tratamento da biomassa para fracionar a lignina, o que permite um maior ataque das celulases e xilanas aos polissacarídeos disponíveis (UMMARTYOTIN & MANUSPIYA 2015). Alguns microrganismos produzem enzimas ligninolíticas das quais fazem parte a lignina peroxidase, manganês-peroxidase e lacase, sendo que este complexo enzimático tem a capacidade de desestabilizar a estrutura da lignina (RABEMANOLONTSOA & SAKA 2016).

2.4 Fungos produtores de celulases

No mercado mundial de enzimas industriais, as celulases ocupam a terceira posição ($\approx 15\%$), após as amilases ($\approx 25\%$) e a proteases ($\approx 18\%$) (SAJITH et al. 2016). A aplicação de enzimas do complexo celulolítico é ampla, podendo ser desde na alimentação animal, extração e clarificação de sucos, produção de cerveja e vinhos, indústria têxtil, papelaria e na sacarificação de materiais lignocelulósicos para a produção de etanol, processo em que houve um aumento substancial da demanda nos últimos anos (GUPTA & VERMA 2015, JUTURO & WU 2014).

A maioria dos microrganismos descritos na literatura como produtores de celulasas, dentre eles fungos filamentosos, são de ambiente terrestre sendo que estes ocorrem no solo, colonizando vegetais, suas raízes e resíduos, tendo grande importância na reciclagem de nutrientes (LYNCH et al. 1981). No entanto, espécies de fungos isolados de ambiente marinho também foram descritas como produtoras de celulasas (TRIVEDI et al. 2016).

Por possuírem uma diversidade metabólica alta, os fungos filamentosos estão presentes em vários ecossistemas, apresentam crescimento rápido, os meios de cultura onde são cultivados são relativamente simples, são fáceis de manusear, as condições de cultivo são facilmente controladas, ocupam pouco espaço e crescem onde há fonte de carbono associada ao calor e umidade (TREVISAN et al. 2004).

A Tabela 2 apresenta alguns fungos filamentosos produtores de celulasas utilizando diferentes substratos lignocelulósicos.

Tabela 2: Fungos produtores de celulasas

Microrganismo	Substrato	Metodologia de Fermentação	Atividade enzimática	Referencias da literatura
<i>Trichoderma viridans</i>	Casca de banana	FES	FPase 5,6 U/g CMCse 10,3 U/g	SUN et al. (2011)
<i>Melanoporia</i> sp CCT 7736	Casca de coco	FES	FPase 3,05 U/g CMCse 2,8 U/g	DE OLIVEIRA et al. (2016)
<i>Sporothrix carnis</i>	Sabugo de milho	FSB	CMCse 285,7 U/mL	OLAJUYIGBE & OGUNYEWO (2016)
<i>Penicillium oxalicum</i>	Palha de arroz	FSB	FPase 1,4 U/mL CMCse 2,0 U/mL	HANPENG et al. (2015)
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	Farelo de trigo	FES	FPase 5 U/g CMCse 103 U/g	PRÉVOT et al. (2013)
<i>Trichoderma reesei</i> QM 9414	Farelo de arroz	FES	FPase 1,6 U/g CMCse 94,2 U/g	ROCKY-SALIMI et al. (2010)
<i>Penicillium oxalicum</i>	Sorgo	FES	FPase 4,2 U/g CMCse 9,2 U/g	BOMTEMPO et al. (2017)
	Bagaço de cana-de-	FES	FPase 3,3 U/g CMCse 3,52 U/g	

<i>Penicillium funiculosum</i> ATCC 11797	açúcar Bagaço de cana- de- açúcar	FSB	FPase 1,14 U/mL CMCse 10,2 U/mL	MAEDA et al. (2013)
--	---	-----	------------------------------------	------------------------

FPase; celulase total; CMCse: endoglucanase; FES: Fermentação em estado sólido; FSB: Fermentação submersa; Atividade enzimática expressa em U/mL para FSB; Atividade enzimática expressa em U/g para FES.

Os gêneros fúngicos são os mais explorados comercialmente pela capacidade de secretar altos níveis de proteínas na forma livre e pela possibilidade de suas enzimas atuarem naturalmente de maneira efetiva na hidrólise da biomassa (CHUNDAWAT et al. 2011). Segundo Menezes (1997), as principais espécies envolvidas na síntese de celulasas utilizadas na indústria são produzidas pelos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus* sp.

Segundo Zhang et al., (2006), o aumento da produtividade volumétrica de enzimas comerciais, usando organismos que produzem enzimas em substratos mais baratos, obtenção de preparados enzimáticos com maior estabilidade para processos específicos e com maior atividade específica em substratos sólidos, são estratégias que podem reduzir de forma significativa o custo das celulasas.

Segundo Humbird et al. (2011) a fonte de carbono utilizada na produção de enzimas pode representar mais de 50% do custo total desta, o que tem um impacto desfavorável no preço do etanol celulósico. Resíduos provenientes da agroindústria, como os lignocelulósicos constituem fontes baratas e são utilizadas como substratos indutores da produção de enzimas celulolíticas por fungos (Figura 2). A utilização de resíduos agroindustriais é uma alternativa econômica e ecologicamente viável para a destinação desses recursos bem como para a produção de enzimas em larga escala. Tal montante justifica-se pelo interesse gerado por processos que envolvem tecnologia de baixo custo energético, com menor impacto ambiental e que utilizam matérias primas renováveis, adequando-se ao reaproveitamento de subprodutos da agroindústria (AGOSTINHO et al. 2015, COELHO 2001).

Portanto, a descoberta de novas espécies microbianas, dentre elas fungos filamentosos, que secretam níveis elevados de celulasas utilizando como substrato resíduos agroindustriais, representa uma área de pesquisa emergente para o desenvolvimento de bioprocessos economicamente competitivos aplicáveis em escala industrial (KUBICEK et al. 2009).

2.5 Considerações finais

Considerando o potencial do Brasil para a produção agrícola, há uma grande geração de resíduos e sub-produtos agro-industriais e a utilização desses, diminui possíveis problemas ambientais e agrega valor a essas matérias-primas, por meio da produção de substâncias de interesse econômico, como o bioetanol.

O conhecimento de novas linhagens de fungos filamentosos produtores de celulasas é de grande interesse biotecnológico, não apenas para a obtenção de biocatalisadores que apresentam características adequadas aos processos industriais aos quais se destinam, como por exemplo, na hidrólise de biomassa lignocelulósica, mas também para o conhecimento e exploração da biodiversidade microbiana.

2.6 Perspectivas futuras

A necessidade de fontes alternativas de energia torna necessária a busca de cepas de microrganismos produtores de celulasas, dentre eles, fungos filamentosos e a otimização do processo de produção, com vistas a melhorar o rendimento final destas. Além disso, o emprego de resíduos agroindustriais, os quais são abundantes no Brasil, como substratos pode ser uma alternativa viável para esse processo.

REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, Feni; BERTAGLIA, Ana; ALMEIDA, Cecilia; GIANNETTI, Biagio. Influence of cellulase enzyme production on the energetic-environmental performance of lignocellulosic ethanol. **Ecological Modelling**, v. 315, p. 46-56, 2015.

BAEYENS, Jan; KANG, Qian; APPELS, Lise; DEWIL, Raf; LV, Yongqin; TAN, Tianwei. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. **Progress in Energy and Combustion Science**. v. 47, p. 60-88, 2015.

BALDRIAN, Petr.; VALÁSKOVÁ, Vendula. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 3, p. 501-21, 2008.

BOMTEMPO, Fabrícia Vieira Silva; SANTIN, Franciane Maria Mantovani; PIMENTA, Raphael Sanzio; DE OLIVEIRA, Deyla Paula; GUARDA, Emerson Adriano. Production of celulasas by *Penicillium oxalicum* through solid state fermentation using agroindustrial substrates. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 39, n. 3, p. 321-329, 2017.

BRANCO, Luizella Giardino Barbosa. Biocombustíveis: vantagens e desafios. **Revista Eletrônica de Energia**, v. 3, n. 1, p. 16-33, 2013.

CASTRO, Aline Machado; PEREIRA JR, Nei. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA EM ENERGIA E MATERIAIS. **Etanol de segunda geração deve custar 80% do preço do combustível de cana**. 2017.

CHAKRABORTY, Sagnik; CHOWDHURY, Shamik; DAS SAHA, Papita. Adsorption of Crystal Violet from aqueous solution onto NaOH-modified rice husk. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 4, p. 1533-1541, 2011.

CHUNDAWAT, Shishir, DONOHOE, Bryon; SOUSA, Leonardo da Costa; ELDER, Thomas; AGARWAL, Umesh; LU, Fachuang; RALPH, John; HIMMEL, Michael; BALAN, Venkatesh; DALE, Bruce Multi-scale visualization and characterization of lignocellulosic plant cell wall deconstruction during thermochemical pretreatment. **Energy & Environmental Sciencia**, v. 4, p. 973-984, 2011.

COELHO, Maria Alice Zarur; LEITE, Selma Gomes Ferreira; ROSA, Morsyleide De Freitas; FURTADO, Angela Aparecida Lemos. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **Boletim CEPPA**, v. 19, p. 33-42, 2001.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. SAFRA 2017/18**. Brasília: Conab, v. 4, n. 1, p. 1-62, 2017.

COTANA, Franco; CAVALAGLIO, Gianluca; GELOSIA, Mattia; NICOLINI, Andrea; COCCIA, Valentina, PETROZZI, Alessandro. Production of bioethanol in a second generation prototype from pine wood chips. **Energy Procedia**, v. 45, p. 42-51, 2014.

DE OLIVEIRA, Simone Lopes do Rego, MACIEL, Tatiane Cavalcante; SANCHO, Soraya de Oliveira; RODRIGUES, Sueli. Solid-state production of cellulase by *Melanoporia* sp. CCT 7736: a new strain isolated from coconut shell (*Cocos nucifera* L.) **Bioresources and Bioprocessing**, v. 3, n. 9, p. 1-11, 2016.

DELGADO, A. A. **Tecnologia dos produtos agropecuários: tecnologia do açúcar e das fermentações industriais**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1975. 209 p.

DELLA, Viviana Possamai; KUHN, Ingeborg; HOTZA, Dachamir. Caracterização de cinza de casca de arroz para uso como matéria-prima na fabricação de refratários de sílica. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 778-782, 2001.

FUNDAÇÃO GETÚLIO VARGAS. **Biocombustíveis**. Cadernos FGV Energia, ano 4, n. 8, p. 1-120, 2017.

GÍRIO, F. M; FONSECA, C; CARVALEHIRO, F; DUARTE, L. Ç; MARQUES, S; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Special Issue on Lignocellulosic Bioethanol: Current Status and Perspectives**, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.

GUPTA, Anubhuti; VERMA, Jay Prakash Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 550-567, 2015.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Review: pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.100, p.10-18, 2009.

HU, Jinguang; ARANTES, Valdeir; PRIBOWO, Amadeus; SADDLER, Jack. The synergistic action of accessory enzymes enhances the hydrolytic potential of a "cellulase mixture" but is highly substrate specific. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 112, 2013.

HUMBIRD, D; DAVIS, R; TAO, L; KINCHIN, C; HSU, D; ADEN, A; SHOEN, P; LUKAS, J; OLTHOF, B; WORLEY, M; SEXTON, D; DUDGEON, D. **Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol**, NREL/TP-5100-47764, 2011.

IRSHAD, Muhammad Nasir; ANWAR, Zahid; BUT, Hamama Islam; AFROZ, Amber; IKRAM, Nadia; RASHID, Umer. The industrial applicability of purified cellulose complex indigenously produced by *Trichoderma viride* through solid-state bio-processing of agro-industrial and municipal paper wastes. **BioResources**, v.8, n.1, p. 145-157, 2013.

JAMBO, Siti Azmah; ABDULLA, Rahmath; AZHAR, Siti Hajar Mohd; MARBAWI, Hartinie; GANSAU, Jualang Azlan; RAVINDRA, Pogaku. A review on third generation bioethanol feedstock. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 65, p. 756-769, 2016.

JUTURO, Veeresh; WU, Jin Chuan. Microbial cellulases: engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 188-203, 2014.

KLEMAN-LEYER, K. M; SIIKA-AHO, M; TEERI, T. T; KIRK, T. K. The cellulases endoglucanase I and cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* act synergistically to solubilize native cotton cellulose but not to decrease its molecular Size. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 8, p. 2883-2887, 1996.

KUBICEK Christian; MIKUS, Marianna; SCHUSTER, André; SCHMOLL, Monika; SEIBOTH; Bernhard. Metabolic engineering strategies for the improvement of celulase production by *Hypocrea jecorina*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 19, p. 1-14, 2009.

LARSEN, Jan; HAVEN, MAI, Ostergaard; THIRUP, Laila. Inbicon makes lignocellulosic ethanol a commercial reality. **Biomass Bioenergy**, v. 46, p. 36-45, 2012.

HANPENG, Lion, XIAOTENG, Fan; XINLAN, Mei; ZHONG, Wei; QIRONG, Shen; YANGCHUN, Xu. Production and characterization of cellulolytic enzyme from

Penicillium oxalicum GZ-2 and its application in lignocellulose saccharification. **Biomass and Bioenergy**, v. 74, p. 122-134, 2015.

LYNCH, J. M. SLATER, J. H; BENNETT, J. A; HARPER, H. T. Cellulase activities of some aerobic microorganisms isolated from soil. **Journal of General Microbiology**, v. 127, p. 231-236, 1981.

LYND, Lee; WEIMER, Paul; VAN ZYL, Willen; PRETORIUS, Isak. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MAEDA, Roberto Nobuyuki; BARCELOS, Carolina Araújo; ANNA, Lídia Maria Melo Santa; PEREIRA JUNIOR, Nei. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. **Journal of Biotechnology**, v. 163, p. 38-44, 2013.

MENEZES, T. J. B. Os fungos na indústria. **Boletim da SBCTA**, v. 31, n. 2, p. 116-120, 1997.

OLAJUYIGBE, Folasade; OGUNYEWO, Olusola. Comparative Evaluation of Neglected Biomass for Efficient and Economically Viable Production of Lignocellulolytic Enzymes from Selected White and Soft Rot Fungi. **Current Biotechnology**, v. 5, n. 1, p.71-80, 2016.

PRÉVOT, V; LOPEZ, M; COPINET, E; DUCHIRON, F. Comparative performance of commercial and laboratory enzymatic complexes from submerged or solid-state fermentation in lignocellulosic biomass hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 690-693, 2013.

RABEMANOLONTSOA, Harifara; SAKA, Shiro. Various pretreatments of lignocellulosics. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 83-91, 2016.
RENEWABLE ENERGY POLICY NETWORK FOR THE 21st CENTURY - REN21. **Renewables 2017 Global Status Report**. 2017, 302p.

ROCKY-SALIMI, K.; HAMIDI-ESFAHANI, Z. Evaluation of the effect of particle size, aeration rate and harvest time on the production of cellulase by *Trichoderma reesei* QM9414 using response surface methodology. **Food and Bioprocess Processing**, v. 88, p. 61–66, 2010.

SAHA, Badal; COTTA, Michael. Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biomass and Bioenergy** v. 32, n. 10, p. 971-977, 2008.

SAJITH, S; PRIJI, P; SREEDEVI, S; BENJAMIN, S. An Overview on Fungal Cellulases with an Industrial Perspective. **Journal Nutrition & Food Science**, v 6, n. 1, p. 1-13, 2016.

SÁNCHEZ, Carmen. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185-194, 2009.

SANDGREN, M.; STÅHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH Family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 89, p. 246 - 291, 2005.

SANTOS, Fernando; DE QUEIRÓZ, José; COLODETTE, Jorge, FERNANDES, Sergio; GUIMARÃES, Valéria, REZENDE, Sebastião. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SILVA, V. L. M. M.; GOMES, W. C. O.; ALSINA, L.S. Utilização do bagaço de cana de açúcar como biomassa adsorvente na absorção de poluentes orgânicos. **Revista eletrônica de materiais e processos**, v. 2, n. 1, p. 27-32, 2007.

SINGH, Anoop; PANT, Deepak; KORRES, Nicholas; NIZAMI, Abbul-Sattar; PRASAD, Shiv, MURPHY, Jerry. Key issues in life cycle assessment of etanol production from lignocellulosic biomass: challenges and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5003-5012, 2010.

SINGH, Bharat Raj; SINGH, Onkar. **Global Trends of Fossil Fuel Reserves and Climate Change in the 21st Century**, Fossil Fuel and the Environment, Dr. Shahriar Khan (Ed.), 2012, 304p.

SOUSA, Paulo Nunes; SCUR, Gabriela; SOUZA, Roberta de Castro. Panorama da cadeia produtiva do etanol no Brasil: gargalos e proposições para seu desenvolvimento. **GEPROS - Gestão da Produção, Operações e Sistemas**, v. 7, n. 3, p. 145-159, 2012.

SOUZA, F. X. de. Casca de arroz carbonizada: um substrato para a propagação de plantas. **Revista Lavoura Arrozeira**, v. 46 n. 406, p. 11, 1993.

SUN, Hai-Yan; LI, Juanhua; ZHAO, Pingjuan; PENG, Ming. Banana peel: a novel substrate for cellulose production under solid-state fermentation. **African Journal Biotechnology**, v.10, p. 17887-17890, 2011.

TOIVANEN, Hannes; NOVOTNY, Michael. The emergence of patent races in lignocellulosic biofuels, 2002-2015. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 77, p. 318-326, 2017.

TREVISAN, H.C. Lipases. In: SAID, S. & PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agente Biotecnológico**. 1. ed. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, p. 115-135, 2004.

TRIVEDI Hiral; VALA, Anjana; DHRANGADHRIYA, Jaykishan; DAVE, Bharti. Marine-derived fungal siderophores: a perception. **Indian Journal of Geo-Marine Science**, v. 45, n. 3, p. 431-439, 2016.

UMMARTYOTIN, Sarute; MANUSPIYA, Hathaikam. A critical review on cellulose: from fundamental to an approach on sensor technology. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 402-412, 2015.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Fotografia do setor sucroenergético no Brasil**. 2015.

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

VIIKARI, L.; VEHEMAANPERA, J.; KOIVULA, A. Lignocellulosic ethanol: From science to industry, **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 1-12, 2012.

WELFLE, Andrew. Balancing growing global bioenergy resource demands - Brazil's biomass potential and the availability of resource for trade. **Biomass and Bioenergy**, v. 105, p. 83-95, 2017.

ZABED, H; SAHU, J. N; BOYCE, A. N; FARUQ, G. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: an overview on feedstocks and technological approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 751-774, 2016.

ZANDONÁ FILHO, A. **Modificação das qualidades processuais de fibras celulósicas através do uso de enzimas**. 2001. 193 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) -Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

ZHANG, H; HONG, Y. Z; XIAO, Y. Z; YUAN, J; TU, X. M; ZHANG, X. Q. Efficient production of laccases by *Trametes* sp. AH28-2 in cocultivation with a *Trichoderma* strain. **Applied Microbiology Biotechnology Chemical Society**, v. 73, p. 89-94, 2006.

ZHANG, Junfeng; SMITH, Kirk Household air pollution from coal and biomass fuels in China: Measurements, health impacts, and interventions. **Environ Health Perspect**, v. 115, n. 6, p. 848-855, 2007.

CAPITULO II**FUNGOS PRODUTORES DE CELULASES ASSOCIADOS A DETRITOS
VEGETAIS EM DECOMPOSIÇÃO EM RIACHO DO CERRADO DO BRASIL**

3 Fungos produtores de celulases associados a detritos vegetais em decomposição em riacho do Cerrado do Brasil

Emerson Adriano Guarda^a, Patricia Martins Guarda^a, Jéssica Barros Aguiar Silva^b,
Áurea Welter^{a*}

^a Universidade Federal do Tocantins (UFT), Laboratório de Pesquisa em Química Ambiental e de Biocombustíveis (LAPEQ), Palmas, TO, Brasil

^b Universidade Federal do Tocantins (UFT), Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LAMBIO), Palmas, TO, Brasil

* Autor correspondente. E-mail: aureaw@mail.uft.edu.br (Á. Welter).

Resumo: Fungos são organismos de importância ecológica na decomposição da matéria orgânica e, por serem produtores de enzimas que tem aplicação biotecnológica, a busca de novos microrganismos por meio de estudos de bioprospecção é de grande interesse econômico. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção de celulases por fungos filamentosos associados a detritos foliares em decomposição em um riacho do Cerrado, no estado do Tocantins. Um total de 27 isolados foram submetidos a fermentação submersa, por sete dias, a 35 °C e agitação constante a 150 rpm. Os extratos enzimáticos brutos obtidos foram utilizados para determinar a atividade da celulase total, endoglucanase, exoglucanase. Todos os isolados testados produziram celulases, no entanto, oito apresentaram melhor atividade para as enzimas avaliadas, variando de 0,272 a 0,343 U/mL para celulase total, 0,355 a 0,485 U/mL para endoglucanase e 0,250 a 0,335 U/mL para exoglucanase. Os isolados que apresentaram maior atividade de celulase total, identificados por sequenciamento da região ITS do rDNA, foram *Aspergillus sydowii*, *Cladosporium* sp., *Paraphaeosphaeria arecacearum*, *Penicillium simplicissimum* e *Penicillium citrinum*. A biodiversidade fúngica estudada possibilitou a identificação de uma nova linhagem (*Paraphaeosphaeria arecacearum*) produtora de celulases biotecnologicamente importantes.

Palavras-chave: Enzimas celulolíticas. Fungos filamentosos. Detrito foliar. Carboximetilcelulose.

39 3. 1 Introdução

40 Em ecossistemas aquáticos existem duas possíveis fontes de detritos
41 vegetais, a alóctone, produzida fora do ecossistema e a autóctone, aquela gerada
42 dentro do próprio sistema [1]. Ecossistemas aquáticos lóticos, ou seja, aqueles que
43 apresentam um fluxo de água contínuo, constituem sistemas abertos que
44 transportam material solúvel e insolúvel, como os rios e córregos [2-3]. A vegetação
45 ripária é responsável pela maior parte da matéria orgânica alóctone subsidiando este
46 sistema com energia, sendo que em córregos tropicais, as folhas podem representar
47 até 74% de toda a matéria orgânica, além de galhos, flores e frutos [4]. Como
48 exemplo desse tipo de ecossistema, pode-se citar o córrego Buritizal localizado na
49 sub-bacia do Ribeirão Taquarussú Grande, na parte centro sul do município de
50 Palmas-TO, Brasil, o qual pertence ao bioma Cerrado.

51 A velocidade da decomposição dos detritos foliares em córregos depende de
52 fatores como as características químicas e físicas das folhas e da água, além de
53 fatores bióticos avaliados pela composição e estrutura das comunidades
54 microbianas, como bactérias e fungos, e de invertebrados aquáticos associados aos
55 detritos [5]. Os fungos correspondem em média 96% da biomassa microbiana
56 associada às folhas em decomposição, os quais produzem enzimas hidrolíticas
57 extracelulares que degradam polímeros estruturais complexos presentes na parede
58 celular vegetal, como celulose, hemicelulose e lignina, além de outras moléculas,
59 como lipídios, amido e proteínas [6-7].

60 Logo, fungos decompositores de detritos foliares representam uma fonte em
61 potencial para a obtenção de celulases, conhecidas também como celulases totais
62 ou enzimas do papel de filtro – FPases [8-9], as quais atuam sinergicamente na
63 hidrólise da celulose [10].

64 A aplicação biotecnológica das celulases é ampla, incluindo a indústria têxtil,
65 de papel e celulose, de alimentos, bebidas e ração animal [11-13]. Além disso, tem
66 importância na sacarificação de biomassa lignocelulósica para a produção de
67 bioetanol, o que justifica um maior interesse, nas últimas décadas, por novas fontes
68 produtoras de celulases, em especial microrganismos [10,14-15].

69 Considerando o exposto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a
70 produção de celulases por fungos filamentosos associados a detritos foliares em
71 decomposição, por meio de fermentação submersa, utilizando como substrato a
72 carboximetilcelulose (CMC). Ainda, identificar taxonomicamente os isolados de

73 interesse por meio do sequenciamento das regiões dos espaçadores internos
74 transcritos (ITS) do rDNA.

75

76 **3.2 Material e métodos**

77

78 3.2.1 Obtenção de microrganismos

79 As linhagens de fungos filamentosos utilizadas neste estudo foram isoladas pelo
80 Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LAMBIO) da Universidade
81 Federal do Tocantins (UFT), Campus de Palmas – TO sendo estes oriundos de
82 folhas da vegetação ripária em decomposição no córrego Buritizal localizado na sub-
83 bacia do ribeirão Taquarussú Grande, na parte centro sul do município de Palmas-
84 TO, Brasil [16]. Foram objeto de estudo, 27 isolados, depositados na Coleção de
85 Culturas Microbianas Carlos Rosa da UFT-TO.

86

87 3.2.2 Produção de celulases por fermentação submersa

88 3.2.2.1 *Preparo do inóculo*

89 Os fungos preservados [17] foram cultivados em meio Ágar Batata Dextrose
90 (BDA) a 28 °C por sete dias. Após este período, foi obtida uma suspensão de
91 esporos de cada linhagem por meio da adição de 10 mL de água deionizada estéril
92 contendo 0,2% de Tween 80, efetuando-se a raspagem da cultura esporulada com
93 uma alça de platina. A concentração de esporos na suspensão obtida foi estimada
94 pela contagem em microscópio óptico, usando câmara de Neubauer. O inóculo foi
95 ajustado para uma concentração de 1×10^6 esporos/mL e utilizado para avaliar a
96 produção de celulases por fermentação submersa (FSm).

97

98 3.2.2.2 *Fermentação submersa*

99 Para avaliar a produção de celulases, 1 mL (1×10^6 esporos/mL) da suspensão
100 de esporos foi inoculada, em triplicada, em frascos Erlenmeyer contendo 25 mL do
101 meio composto por carboximetilcelulose (CMC) (10 gL^{-1}), extrato de levedura ($0,6 \text{ gL}^{-1}$)
102 e solução de sais segundo Mandels e Weber [18], com modificações, composta
103 por KH_2PO_4 ($2,0 \text{ gL}^{-1}$), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,3 \text{ gL}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,3 \text{ gL}^{-1}$), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
104 ($5,0 \text{ gL}^{-1}$), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($1,6 \text{ gL}^{-1}$), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1,4 \text{ gL}^{-1}$), em pH 6,0. O ensaio para
105 produção enzimática foi mantido em incubadora shaker por sete dias, sob
106 temperatura de 35 °C e agitação constante de 150 rpm. Após esse período, a fase

107 líquida foi separada por meio de filtração, com o auxílio de bomba a vácuo, obtendo-
108 se o extrato enzimático bruto, o qual foi mantido à temperatura de -20 °C até o uso.

109

110 3.2.3 Determinação da atividade de enzimas celulolíticas

111 Celulase total (FPase), endoglucanase (CMCase) e exoglucanase foram
112 determinadas de acordo com a metodologia proposta por Ghose [8], utilizando-se
113 como substrato respectivamente, papel Whatman, carboximetilcelulose e celulose
114 microcristalina. Os açúcares redutores foram estimados utilizando o método do ácido
115 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller [19]. Para conversão da quantidade de
116 glicose em valores de atividade enzimática, considerou-se uma unidade (U) de
117 atividade enzimática como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol
118 de açúcares redutores totais (medido como glicose), por minuto, sob as condições
119 do ensaio. Para cada atividade enzimática avaliada foi realizado o branco reacional
120 (do espectro) e o branco do extrato enzimático. Os ensaios foram realizados em
121 triplicata e os resultados apresentados como a média destes valores e o desvio-
122 padrão.

123

124 3.2.4 Identificação molecular

125 3.2.4.1 *Massa micelial*

126 Para a obtenção da massa micelial, os fungos foram cultivados em meio BDA a
127 28 °C por sete dias. Em seguida, foram cortados três discos de aproximadamente 6
128 mm de diâmetro sendo inoculados em frascos erlemeyer de 125 mL contendo 15 mL
129 de meio líquido BDA e incubados à 28 °C, por sete dias. Após esse período, o
130 micélio foi acondicionado em microtubo e armazenado a temperatura de -20 °C até o
131 uso.

132

133 3.2.4.2 *Extração do DNA e identificação dos isolados a partir da amplificação da* 134 *região ITS do rDNA e sequenciamento*

135 A extração do DNA genômico foi realizada com o kit “*Illustra Nucleon Phytopure*
136 *Genomic DNA extraction*” (GE Healthcare®), seguindo a instruções do fabricante. As
137 regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA foram amplificadas com os
138 *primers* ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e ITS4
139 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') [20]. As amplificações foram realizadas em
140 termociclador Mastercycler® nexus (Eppendorf North America, Inc, EUA) e os

141 produtos da amplificação por PCR foram submetidos à eletroforese em gel de
142 agarose 1,0% contendo *GelRed*TM e visualizados com auxílio de um
143 fotodocumentador (L.PIX Touch) (Loccus Biotecnologia, Brasil). O marcador de peso
144 molecular utilizado foi o 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®). Em seguida, produtos
145 de PCR de aproximadamente 300 a 650 pb foram purificados utilizando o kit Wizard
146 SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corp., Madison, WI) e
147 bidirecionalmente sequenciados de acordo com a metodologia de terminação de
148 cadeia [21] utilizando BigDye Terminator v 3.1 sequencing kit (Applied Biosystems,
149 Foster City, CA). O sequenciamento foi realizado pela Macrogen Inc., na Coreia do
150 Sul.

151 As sequências de nucleotídeos dos fungos foram importadas para o programa
152 Geneious 6.1.8 [22] para serem analisadas, alinhadas e editadas. A sequência de
153 consenso, que foi gerada a partir das sequências direta e reversa, foi corrigida e
154 alinhada manualmente e exportada para uma extensão de arquivo FASTA (fasta */*.
155 Fas) e, em seguida, realizada uma busca comparativa de identidades de sequências
156 nas bases de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) e CBS
157 (<http://www.cbs.knaw.nl/Collections/>). As sequências obtidas foram depositadas no
158 GenBank sob os números de acesso MH801877 a MH801881.

159

160 3.2.5 Análise estatística

161 O resultado das atividades enzimáticas foram expressos como médias \pm desvio
162 padrão, submetidos à análise de variância (ANOVA) ao nível de 95% e 99% de
163 confiança, utilizando o programa Assistat versão 7.7. [23]. Para a comparação entre
164 as médias da atividade das diferentes enzimas, foi aplicado o teste de Tukey com
165 nível de significância de 5%.

166

167 3.3 Resultados

168

169 3.3.1 Atividade celulolítica por fermentação submersa

170

171 Ao avaliar o extrato enzimático dos fungos filamentosos, obtido por fermentação
172 submersa em meio contendo CMC, verificou-se que todos os isolados produziram o
173 complexo enzimático, que engloba a FPase, CMCCase e exoglicanase (Tabela 1).

174

175
176

Tabela 1 - Produção de celulases por 27 fungos filamentosos utilizando fermentação submersa em carboximetilcelulose.

Isolado	FPase U/mL	CMCase U/mL	Exoglicanase U/MI
F55	0,207 ± 0,028	0,273 ± 0,030	0,225 ± 0,036
F73	0,213 ± 0,013	0,303 ± 0,021	0,201 ± 0,013
F89	0,215 ± 0,015	0,207 ± 0,042	0,136 ± 0,021
F91	0,208 ± 0,008	0,262 ± 0,020	0,226 ± 0,010
F113	0,060 ± 0,013	0,069 ± 0,013	0,069 ± 0,090
F124	0,189 ± 0,023	0,272 ± 0,038	0,136 ± 0,060
F130	0,195 ± 0,017	0,230 ± 0,016	0,204 ± 0,025
F133	0,201 ± 0,034	0,263 ± 0,011	0,219 ± 0,041
F137	0,275 ± 0,036	0,355 ± 0,069	0,269 ± 0,034
F144	0,154 ± 0,006	0,221 ± 0,010	0,196 ± 0,026
F145	0,112 ± 0,040	0,161 ± 0,047	0,139 ± 0,320
F149	0,203 ± 0,014	0,242 ± 0,006	0,216 ± 0,006
F162	0,166 ± 0,048	0,252 ± 0,048	0,217 ± 0,010
F189	0,192 ± 0,111	0,086 ± 0,041	0,173 ± 0,090
F208	0,220 ± 0,005	0,232 ± 0,031	0,176 ± 0,002
F259	0,297 ± 0,010	0,485 ± 0,006	0,259 ± 0,002
F262	0,150 ± 0,007	0,224 ± 0,038	0,206 ± 0,022
F265	0,146 ± 0,078	0,224 ± 0,058	0,145 ± 0,009
F267	0,343 ± 0,029	0,425 ± 0,014	0,313 ± 0,020
F268	0,339 ± 0,046	0,425 ± 0,054	0,273 ± 0,022
F286	0,340 ± 0,098	0,426 ± 0,001	0,335 ± 0,018
F308	0,272 ± 0,036	0,417 ± 0,065	0,250 ± 0,033
F320	0,302 ± 0,010	0,395 ± 0,012	0,251 ± 0,001
F344	0,315 ± 0,016	0,438 ± 0,005	0,301 ± 0,035
F382	0,131 ± 0,038	0,168 ± 0,039	0,145 ± 0,021
F390	0,148 ± 0,007	0,139 ± 0,035	0,128 ± 0,004
F392	0,177 ± 0,036	0,211 ± 0,042	0,195 ± 0,043

177

Nota: Resultados expressos como média ± desvio padrão de análise realizada em triplicata.

178

179

180

181

182

183

Na presença do substrato indutor e nas condições de cultivo utilizadas, cada linhagem apresentou um comportamento próprio quanto a secreção de celulases. Os fungos com maior atividade para FPase foram F137, F259, F267, F268, F286, F308, F320 e F344 (Tabela 1). Pela análise de variância (ANOVA) foi possível verificar que não houve diferença significativa (nível de 1 e 5%) na produção

184 quantitativa das três enzimas entre os oito fungos com maior atividade de FPase
185 (Tabela 2).

186

187 Tabela 2 - Análise de Variância para produção de celulases
188 dos isolados F137, F259, F267, F268, F286, F308, F320 e
189 F344.

Fonte de Variância	Grau de Liberdade	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F-Calculado
Fungos	7	0,01621	0,00232	1,7021 ns
Enzimas	2	0,32378	0,16189	119,0167 **
Fungos x Enzimas	14	0,03144	0,00225	1,6510 ns
Resíduo	48	0,06529	0,00136	
Total	71	0,43671		

190 **: significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). ns: não significativo ($p \geq 0,05$).

191

192 No entanto, verificou-se que entre as enzimas secretadas, houve uma
193 diferença na atividade, a um nível de 1% de significância, sendo que foi aplicado o
194 Teste de Tukey para verificar as diferenças por meio das médias (Tabela 3).

195

196 Tabela 3 - Teste Tukey para as enzimas do
197 complexo celulolítico dos isolados F137, F259, F267,
198 F268, F286, F308, F320 e F344.

Enzimas	Média (U/mL)
Fpase	0,30671 ^b
CMCase	0,42856 ^a
Exoglicanase	0,27224 ^c
Diferença Mínima Significativa	0,02575

199 Nota: As médias seguidas pela mesma letra não diferem
200 estatisticamente entre si. O coeficiente de variância foi de 10,98%
201 mostrando a concordância dos dados com média geral de 0.33584.
202

203 Ao comparar a média dos valores de atividade enzimática das diferentes
204 enzimas do complexo celulolítico, verificou-se que houve uma maior produção de
205 CMCase, em detrimento as demais. Os fungos que apresentaram maior atividade
206 quanto a FPase foram selecionados para a extração de DNA, amplificação por PCR
207 da região ITS do rDNA e identificação molecular.

208

209 3.3.2 Identificação molecular de fungos filamentosos por sequenciamento da região
210 ITS do rDNA

211

212 Na tabela 4, são apresentados os dados de identificação das amostras
213 submetidas ao sequenciamento da região ITS do rDNA.

214

215 Tabela 4 - Identificação molecular dos fungos filamentosos por sequenciamento
216 da região ITS do rDNA.

Fungo	Sequência do GenBank com maior similaridade	Identidade máxima (%)*	Número de acesso ao GenBank
F137	<i>Cladosporium</i> sp. HQ608074.1	99%	MH801877
F268	<i>Penicillium simplicissimum</i> KU529848.1	99%	MH801878
F308	<i>Penicillium citrinum</i> KY827361.1	100%	MH801879
F320	<i>Aspergillus sydowii</i> MF359934.1	100%	MH801880
F344	<i>Paraphaeosphaeria arecacearum</i> KM873041.1	99%	MH801881

217

218

219

* Percentagem de semelhança entre as sequências nucleotídicas obtidas nesse estudo com seqüências disponíveis no banco de dados NCBI.

220 O sequenciamento da região ITS permitiu a identificação de cinco dos oito
221 fungos filamentosos, sendo que dois apresentaram homologia 100% com relação às
222 seqüências depositadas no GenBank e CBS (tabela 4).

223

224 3.4 Discussão

225 Os extratos enzimáticos de todos os fungos filamentosos, objeto de estudo no
226 presente trabalho, demonstraram atividade celulolítica. A produção de celulasas por
227 fungos visa suprir as necessidades energéticas destes, já que a bioconversão de
228 substratos celulósicos fornece compostos de fácil assimilação para o seu
229 metabolismo, além de contribuir na decomposição da matéria orgânica, dinamizando
230 a ciclagem de nutrientes e regulando o equilíbrio energético dos ecossistemas
231 terrestres [24]. Os resultados aqui encontrados corroboram os de outros estudos no
232 que se refere a importância de fungos na decomposição de detritos foliares em
233 ecossistemas aquáticos, pela ampla variedade de enzimas que produzem, em
234 especial as celulasas [25-26].

235 A variação na produção de celulases entre os 27 isolados (Tabela 1) era
236 esperada, o que corrobora com outros estudos com fungos filamentosos
237 provenientes do solo do Cerrado, em Goiás, Brasil, cultivados por fermentação
238 submersa em meio contendo 1% de CMC ou farelo de trigo (FT) objetivando avaliar
239 a produção de celulases. Os valores médios de FPase produzidos pelos isolados
240 variaram de 0,05 a 1,1 U/mL em CMC e 0,06 a 0,16 U/mL em FT. CMCase
241 apresentou valores médios maiores, sendo de 0,9 a 3 U/mL em CMC e 1,5 a 7 U/mL
242 em FT. Na presença de CMC, a produção de exoglucanase foi de 0,009 a 0,013
243 U/mL e no substrato FT, esta foi de 0,009 a 0,012 U/mL [27].

244 A prospecção de fungos filamentosos (isolados AR133 e MD22) associados a
245 troncos em decomposição, oriundos de Mata de Galeria do Cerrado, em Tocantins,
246 Brasil, foi realizada utilizando cultivo submerso contendo 1% de bagaço de cana-de-
247 açúcar (BCA) ou capim-elefante. Verificou-se que na presença de BCA a produção
248 de FPase foi respectivamente, $0,07 \pm 0,06$ U/mL e $0,34 \pm 0,12$ U/mL, para AR133 e
249 MD22. Quando a fonte de carbono utilizada foi o capim-elefante, a produção de
250 FPase foi superior a do BCA, sendo esta de $0,37 \pm 0,08$ U/mL para AR133 e $0,58 \pm$
251 $0,07$ U/mL para MD22. Na presença de BCA, a produção de CMCase por AR133 foi
252 de $0,12 \pm 0,08$ U/mL e para MD22 foi $0,41 \pm 0,06$ U/mL. No capim-elefante, esta
253 atingiu $0,54 \pm 0,04$ U/mL para AR133 e $0,67 \pm 0,05$ U/mL para MD22 [28].

254 Os valores de FPase, CMCase e exoglucanase produzidos pelos fungos aqui
255 estudados (Tabela 1) diferem dos verificados para isolados provenientes do solo e
256 de troncos em decomposição. Tal divergência pode ser pela diversidade dos
257 materiais, cada qual colonizado por uma micota característica [29], e da fonte de
258 carbono utilizada como substrato, que pode ser complexa, como CMC e resíduos
259 agroindustriais (bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz, farelo de trigo) ou
260 simples, como glicose, celobiose, xilose e arabinose [30].

261 Sabe-se que há uma considerável variação no nível de transcrição e no tipo
262 de genes de celulases que serão transcritos, dependendo da fonte de carbono
263 usada no crescimento do microrganismo, como já foi verificado para *Trichoderma*
264 *reesei*, *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium oxalicum* [31-33]. A regulação
265 transcricional da expressão gênica celulolítica é vital para a biossíntese e secreção
266 de celulases em fungos filamentosos, e depende de uma rede reguladora de fatores
267 de transcrição que controla a expressão gênica celulolítica em resposta a indutores
268 e repressores externos [34-35]. Alguns dos indutores de celulase são celulose,

269 xilana, lactose, celobiose e sofrorse, enquanto a glicose é a principal fonte de
270 carbono repressora [36].

271 Além da espécie do fungo e da fonte de carbono, outros fatores
272 desempenham papel fundamental na indução da produção de celulasas, como o
273 método de fermentação, fonte de nitrogênio, quantidade de inóculo, pH do meio,
274 tempo de cultivo, temperatura, sais/íons metálicos [37-39].

275 O papel de filtro utilizado para determinação da FPase é composto em sua
276 maior parte de celulose cristalina e, em menor quantidade, celulose amorfa [40]. A
277 atividade da FPase é importante, pois avalia a ação sinérgica das enzimas
278 celulolíticas, mostrando assim sua atuação em regiões tanto amorfas como
279 cristalinas do substrato [11,41]. Logo, na avaliação da FPase, utilizando como
280 substrato o papel Whatman, a hidrólise da celulose pode ser atribuída à ação
281 conjunta das enzimas celulolíticas secretadas pelos fungos em estudo, destacando-
282 se oito como maiores produtores, sendo estes F137, F259, F267, F268, F286, F308,
283 F320 e F344 (Tabela 1).

284 As enzimas do complexo celulolítico possuem domínios catalíticos
285 semelhantes, sendo que todas clivam a ligação β -1,4-glicosídica, porém diferem em
286 seus domínios de interação e ligação ao substrato, resultando em cooperação e
287 sinergismo na liberação de glicose [42]. CMCases clivam internamente ligações
288 glicosídicas nas regiões amorfas da fibra celulósica; as exoglicanases atuam
289 externamente nas fibras, com maior afinidade por celulose insolúvel, liberando como
290 produtos glicose e principalmente moléculas de celobiose. Já as β -glicosidases
291 hidrolisam os oligossacarídeos resultantes das ações catalíticas das enzimas citadas
292 anteriormente em glicose [43]. No presente estudo, a atividade de CMCCase foi
293 superior a da FPase e exoglicanase (Tabela 3) para os isolados F137, F259, F267,
294 F268, F286, F308, F320 e F344, o que está de acordo com a sua importância na
295 sacarificação de celulose, uma vez que desempenha um papel proeminente no início
296 e na sustentação do processo hidrolítico [44].

347 Os extratos comerciais comumente empregados nos processos de hidrólise
348 enzimática de materiais lignocelulósicos apresentam uma mistura complexa de
349 enzimas celulolíticas, porém com atividades enzimáticas distintas. Preparações
350 comerciais Celluclast (Megazyme International, Irlanda) e Novozymes 188
351 (Novozymes Inc., Bagsvard, Dinamarca) são exemplos de extratos comerciais. O
352 primeiro, é derivado da cepa *Trichoderma reesei*, apresenta em sua composição

353 endoglicanase e exoglicanase de elevada atividade, porém β -glicosidase de baixa
354 atividade. Já o segundo, produzido a partir de *Aspergillus niger*, ao contrário do
355 primeiro, tem atividade β -glicosidase elevada e baixa atividade para endoglicanase e
356 exoglicanase [45]. Ainda que no presente estudo não foram otimizadas as condições
357 de cultivo para a produção do complexo enzimático celulolítico avaliado, os
358 resultados indicam o potencial biotecnológico de fungos filamentosos associados a
359 detritos foliares em decomposição, isolados de um riacho do Bioma Cerrado.

360 Dos isolados com maior atividade de FPase, foi possível identificar cinco a
361 partir do sequenciamento da região ITS do rDNA, os quais apresentaram no máximo
362 1% de divergência em relação a sequência depositada no GenBank (Tabela 4).
363 Segundo Nilsson et al [46], 2% é uma margem aceitável para divergências
364 intraespecíficas em sequências da região ITS.

365 Fungos filamentosos conhecidos pela degradação de celulose pertencem ao
366 filo Basidiomycota [47] e Ascomycota [48-49], ambos abundantes em ecossistemas
367 de água doce [50]. Dothideomycetos, a maior e mais diversificada classe de
368 Ascomycota, são endofíticos, sapróbicos ou epífitos em substratos como restos de
369 plantas lenhosas, folhas em decomposição, líquens [51] e esterco de herbívoros
370 [52]. Eurotiomycetos são encontrados em todos os tipos de material em
371 decomposição e estão entre os fungos mais onipresentes [53].

372 Os isolados sequenciados no presente estudo pertencem ao filo Ascomycota, o
373 qual engloba a classe Dothideomycetos, a quem pertence *Cladosporium* sp. e
374 *Paraphaeosphaeria arecacearum* e, a classe Eurotiomycetos, que compreende
375 *Penicillium simplicissimum*, *Penicillium citrinum* e *Aspergillus sydowii*. Dentre as
376 cepas identificadas como produtoras de celulasas, *Aspergillus* sp, *Cladosporium* sp.
377 e *Penicillium* sp. têm sido mencionados como gêneros envolvidos na decomposição
378 de detritos foliares que pertencem a micota terrestre, ou seja, aquela procedente do
379 solo, ar ou substratos orgânicos que são carregados para o ambiente aquático,
380 podendo se associar as folhas após sua submersão [54-56].

381 Fungos do gênero *Aspergillus* são cosmopolitas e onipresentes na natureza,
382 comumente encontrado no solo, água doce e salgada, grãos de milho, café,
383 amendoim, entre outros [57-59]. Estudos mostram produção de celulasas por
384 *Aspergillus sydowii* procedente de ambiente marinho [60] e solo [61].

385 *Cladosporium* spp, considerado cosmopolita e de maior concentração na
386 atmosfera [62], engloba espécies conhecidas por serem patógenos de plantas,

387 agentes de deterioração em alimentos ou produtos industriais, sendo isolados de
388 substratos como terra, têxteis, papel e couro [63-64]. A capacidade produtora de
389 celulases por *Cladosporium* sp. foi constatada em isolados provenientes de
390 efluentes de lavagem de carros [65], de folhas de *Azadirachta indica* A. Juss [66] e
391 solo [67].

392 O gênero *Penicillium* compreende fungos que são comumente encontrados no
393 solo como decompositores de diferentes tipos de materiais vegetais orgânicos [68]
394 *Penicillium citrinum*, isolado de ambiente marinho [60] e de frutos de laranja em
395 deterioração [69] e *Penicillium simplicissimum*, oriundo de amostras de solo e
396 detritos de plantas em decomposição [70] são espécies do gênero produtores de
397 celulases.

398 Sendo assim, os resultados do presente trabalho corroboram com os dados de
399 outros estudos, no que se refere a capacidade de produção de celulases por
400 *Aspergillus sydowii*, *Cladosporium* sp., *Penicillium citrinum* e *Penicillium*
401 *simplicissimum*, isolados estes provenientes de fontes distintas. Quanto a
402 *Paraphaeosphaeria arecacearum*, há relatos de isolamento deste fungo filamentosos
403 no coco, fruto de *Cocos nucifera*, e em *Elaeis guineenses*, conhecida por palmeira-
404 de-dendê [71]. Nosso estudo verificou a presença de *Paraphaeosphaeria*
405 *arecacearum* em detritos foliares em decomposição em riacho do Cerrado, sendo
406 que até a presente data, este é o primeiro relato de produção de celulases pela
407 espécie em questão.

408

409 **3.5 Conclusão**

410 A bioprospecção de fungos filamentosos associados a detritos vegetais
411 alóctones do Bioma Cerrado, utilizando como substrato indutor a
412 carboximetilcelulose, possibilitou avaliar a produção do complexo enzimático
413 celulolítico, com destaque para as cepas de maior produção identificados por
414 sequenciamento, a saber, *Aspergillus sydowii*, *Cladosporium* sp.,
415 *Paraphaeosphaeria arecacearum*, *Penicillium simplicissimum* e *Penicillium citrinum*.
416 *Paraphaeosphaeria arecacearum* é o único isolado sem relato na literatura, até a
417 presente data, no que se refere a produção de celulases. Estudos futuros visando
418 determinar as condições ideais de produção por essa cepa podem possibilitar o seu
419 uso em processos biotecnológicos que requerem celulases, como a produção de
420 biocombustíveis da biomassa lignocelulósica.

421

422 **Conflitos de interesse:** Os autores declaram não haver conflito de interesse.

423

424 **Agradecimentos:** Os autores agradecem a UFT, REDE BIONORTE, LAPEQ e
425 LAMBIO.

426

427 **Referências**

428

429 1. Webster JR, Benfield EF. (1986). Vascular plant breakdown in freshwater
430 ecosystems. *Ann Rev Ecol Evol Syst.* 17:567-594.

431

432 2. Thomas K. (1996). Australian freshwater fungi. In: Grgurinovic CA, ed. Introductory
433 volume to the Fungi (Part 2). *Fungi of Australia*. Canberra, Australia: Australian
434 Biological Resources Study. pp1-37.

435

436 3. Vorste RV, McElmurray P, Bell S, Eliason KM, Brown BL. (2017). Does stream
437 size really explain biodiversity patterns in lotic systems? A call for mechanistic
438 explanations. *Diversity.* 9(26):1-21.

439

440 4. Gonçalves JJF, Callisto M. (2013). Organic-matter dynamics in the riparian zone of
441 a tropical headwater stream in Southern Brasil. *Aquatic Botany.*109(1):8-13.

442

443 5. Hamada N, Nessimian JL, Querino RB. (2014). *Insetos aquáticos na Amazônia
444 brasileira: taxonomia, biologia e ecologia*. Manaus: Editora do INPA.

445

446 6. Archer DB, Wood DA. (1995). Fungal exoenzymes. In: Grow NAR, Gadd GM. *The
447 growing fungus*. London: Chapman & Hall, pp137-162.

448

449 7. Gonçalves JR JF, Medeiros AO, França JS, Rosa CA. (2006). Leaf breakdown in a
450 tropical stream. *Internat. Rev. Hydrobiol.* 91(2):164-177.

451

452 8. Ghose TK. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.*
453 59(2):257-268.

454

455 9. Zhang YHP, Himmel ME, Mielenz JR. (2006). Outlook for cellulose improvement:
456 screening and selection strategies. *Biotechnol Adv.* 24(5):452-481.

457

458 10. Imran M, Anwar Z, Irshad M, Asad MJ, Ashfaq H. (2016). Cellulase production
459 from species of fungi and bacteria from agricultural wastes and its utilization in
460 industry: A review. *Adv Enzyme Res.* 4(2):44-55.

461

462 11. Ahmed A, Bibi A. (2018). Fungal cellulase; production and applications:
463 minireview. *Int. J. Health Life Sci.* 4(1):19-36.

464

465 12. Juturu V, Wu JC. (2014). Microbial cellulases: engineering, production and
466 applications. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 33:188-203.

467

- 468 13. Przybysz Buzala K, Przybysz P, Kalinowska H, Derkowska M. (2016). Effect of
469 cellulases and xylanases on refining process and kraft pulp properties. PLOS ONE.
470 1:e0161575.
471
- 472 14. Budihal SRD, Agsar S, Patil R. (2016). Enhanced production and application of
473 acidothermophilic *Streptomyces* cellulase. Bioresour. Technol. 200:706-712.
474
- 475 15. Srivastava N, Srivastava M, Mishra P, Singh P, Ramteke P. (2015). Application of
476 cellulases in biofuels industries: an overview. J Biofuels Bioenergy. 1(1):55-63.
477
- 478 16. Silva JBA. (2014). Diversidade e atividade enzimática da comunidade fúngica
479 filamentosa associada à decomposição de detrito foliar em um riacho no Cerrado.
480 Dissertação, Universidade Federal do Tocantins.
481
- 482 17. Castellani, A. (1967). Maintenance and cultivation of the common pathogenic
483 fungi of man in sterile distilled water. Further researches. J Trop Med and Hyg.
484 70:181-184.
485
- 486 18. Mandels M, Weber J. (1969). The production of cellulases. Adv. Chem. Ser.
487 95:391-414.
488
- 489 19. Miller GL. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of
490 reducing sugar. Anal Chem. 31:426-428.
491
- 492 20. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of
493 fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to
494 methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds).
495 Academic Press, New York, USA. pp 315-322.
496
- 497 21. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain-
498 terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 74(12):5463-7.
499
- 500 22. Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S.,
501 Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P.,
502 Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop
503 software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics
504 (Oxford, England). 28(12):1647-1649.
505
- 506 23. Silva FAS, Azevedo CAV. (2016). The Assistat Software Version 7.7 and its use in
507 the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res. 11(39):3733-3740.
508
- 509 24. Tuomela M, Vikman M, Hatakka A, Itävaara M. (2000). Biodegradation of lignin
510 in a compost environment: a review. Bioresource Technol. 72:169-183.
511
- 512 25. Gulis V, Su R, Kuehn KA. (2019). Fungal Decomposers in Freshwater
513 Environments. In: Lectures on Quantum Statistics, pp.121-155.
514
- 515 26. Soares M, Kritzberg ES, Rousk J. (2017). Labile carbon 'primes' fungal use of
516 nitrogen from submerged leaf litter. FEMS Microbiol Ecol. 93:1-10
517

- 518 27. Pereira DEP. (2013). Análise de celulasas e xilanasas por fungo isolado a partir
519 do Bioma Cerrado. Dissertação. Universidade Federal de Goiás.
520
- 521 28. Facundes BC (2014) Fungos filamentosos produtores de holocelulasas
522 prospectados em Mata de Galeria do Cerrado tocantinense. Dissertação,
523 Universidade Federal do Tocantins.
524
- 525 29. Lodge, D.J.; Ammirati, J.F.; O'Dell, T.E.; Mueller, G.M.; Huhndorf, S.M.; Wang,
526 C.-J.; Stokland, J.N.; Schmit, J.P.; Ryvardeen, L.; Leacock, P.R.; Mata, M.; Umaña, L.;
527 Wu, Q. & Czederpiltz, D.L. (2004). Terrestrial and lignicolous macrofungi. In: G.M.
528 Mueller; G.F. Bills & M.S. Foster (eds.). Biodiversity of fungi: inventory and
529 monitoring methods. New York, Elsevier Academic Press. pp. 343-392.
530
- 531 30. Batelaan JG, Van Ginkel CG, Balk F. (1992). Carboxymethylcellulose (CMC). In:
532 The handbook of environmental chemistry. 3 Part F, Hutzinger, pp. 329- 336.
533
- 534 31. Dos Santos Castro L, Pedersoli WR, Campos AC, Antoniêto Steindorff AS, Silva-
535 Rocha R, Martinez-Rossi NM, Neil AR, Brown A, Goldman GH, Faça VM,
536 Persinoti GF, Silva RN. (2014). Comparative metabolism of cellulose, sophorose and
537 glucose in *Trichoderma reesei* using high-throughput genomic and proteomic
538 analyses. *Biotechnol Biofuels*. 7(4): 1-17.
539
- 540 32. Liu D, Li J, Zhao S, Zhang R, Wang M, Miao Y, Shen Y, Shen Q. (2013).
541 Secretome diversity and quantitative analysis of cellulolytic *Aspergillus fumigatus* Z5
542 in the presence of different carbon sources *Biotechnol Biofuels* 2013 6(149):1-16.
543
- 544 33. Yan Y, Zhao S, Liao L, He Q, Xiong Y, Wang L, Li C, Feng J. (2017).
545 Transcriptomic profiling and genetic analyses reveal novel key regulators of cellulase
546 and xylanase gene expression in *Penicillium oxalicum* *Biotechnol Biofuels*.
547 10(279):1-20.
548
- 549 34. Coradetti ST, Craig JP, Xiong Y, Shock T, Tian C, Glass NL. (2012). Conserved
550 and essential transcription factors for cellulase gene expression in ascomycete fungi.
551 *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(19):7397-7402.
552
- 553 35. Tani S, Kawaguchi T, Kobayashi T. (2014). Complex regulation of hydrolytic
554 enzyme genes for cellulosic biomass degradation in filamentous fungi. *Appl Microbiol*
555 *Biotechnol*. 98:4829–4837.
556
- 557 36. Bazafkan H, Tisch D, Schmoll M. (2014). Regulation of glycoside hydrolase
558 expression in *Trichoderma*. In: Gupta VK, Schmoll M, Herrera-Estrella A, Upadhyay
559 R, Druzhinina I, Tuohy MG. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, Elsevier. pp
560 291-308.
561
- 562 37. Bomtempo FVS, Santin FMMS, Pimenta RS, Oliveira DP, Guarda EA. (2017).
563 Production of celulasas by *Penicillium oxalicum* through solid state fermentation
564 using agroindustrial substrates. *Acta Sci. Biol Sci*. 39(3)-321-329.
- 565 38. Elsebaay HH, Shoukry AA, Hassan FRH, El-Shall HS. (2018). Optimization of
566 cellulase enzyme production from *Pleurotus* under submerged fermentation. *Middle*
567 *East J. Agric. Res*. 7(1):50-59.

- 568
569 39. Mahalakshmi N, Jayalakshmi S. (2016). Cellulase production by *Aspergillus niger*
570 under solid state fermentation using agroindustrial wastes Int. J. Adv. Multidiscip.
571 Res. 3(2):78-83.
572
- 573 40. Zhang YHP, Lynd LR. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic
574 hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol. Bioeng.* 88:797-
575 824.
576
- 577 41. Inforsato FJ, Port ALM. (2016). Atividade enzimática de celulases pelo método
578 DNS de fungos isolados de sementes em germinação. *Rev Bras Energ Renov.*
579 5(4):444-465.
580
- 581 42. Boisset C, Fraschini C, Schulein M, Henrissat B, Chanzy H. (2000). Imaging the
582 enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals the endo character of the
583 cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and its mode of synergy with
584 cellobiohydrolase Cel7A. *Appl Environ Microbiol.* 66(4):1444-1452.
585
- 586 43. Castro AM, Pereira Júnior N. (2010). Produção, propriedade e aplicação das
587 celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Quím Nova.* 33(7)181-188.
588
- 589 44. Rahman MS, Fernando S, Ross B, Wu J, Qin W. (2018). Endoglucanase (EG)
590 activity assays. In: Clifton, N.J. *Methods in molecular biology.* pp.169-183
591
- 592 45. Berlin, A. Maximenko V, Gilkes N, Saddler JN. (2007). Optimization of enzyme
593 complexes for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnol Bioeng.* 97:287-296.
594
- 595 46. Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson KH. (2008).
596 Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international
597 sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evol.*
598 *Bioinform.* 4:193-201.
599
- 600 47. Baldrian P, Valaskova V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous
601 fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 32:501-521.
602
- 603 48. Hernandez C, Milagres AMF, Vazquez-Marrufo G, Munoz-Paez KM, Garcia-
604 Perez JA, Alarcon E. (2018). An ascomycota coculture in batch bioreactor is better
605 than polycultures for cellulase production. *Folia Microbiol.* 63(4):467-478.
606
- 607 49. Timo S, Raphael G, Nora B, Scott EB, Steven WS. (2017). *Thermoascus*
608 *aurantiacus* is na intriguing host for the industrial production of cellulases. *Curr*
609 *Biotechnol.* 6:89-97.
610
- 611 50. Lepère C, Domaizon I, Humbert JF, Hugoni M, Debroas D. (2019). Diversity,
612 spatial distribution and activity of fungi in freshwater ecosystems. *Peer J.* 7:e6247
613
- 614 51. Lücking R, Sérusiaux E. (2013). *Phyllobathelium nudum* Zahlbr. is a second
615 species in the genus *Phyllocratera* (lichenized Ascomycota: Strigulaceae).
616 *Lichenologist.* 45(05):691-693.
617

- 618 52. Hyde KD, Jones EBG, Liu JK, Ariyawansa H, et al. (2013). Families of
619 Dothideomycetes. *Fungal Divers.* 63:1-313.
620
- 621 53. Webster J, Weber R. (2007). *Introduction to Fungi*. 3 ed. Cambridge University
622 Press, Cambridge, UK.
623
- 624 54. Asha Devi NK, Padmavathy S, Sangeetha K (2014). Microbial diversity in leaf
625 litter and sediments of selected streams of Palani Hills, Southern Western Ghats,
626 India. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research.* 2(6):054-061.
627
- 628 55. Goh TK, Hyde KD. (1996). Biodiversity of freshwater fungi. *J Ind Microbiol.*
629 17:328-345.
630
- 631 56. Xu W, Shi L, Chan O, Li J, Casper P, Zou X. (2013). Assessing the effect of litter
632 species on the dynamic of bacterial and fungal communities during leaf
633 decomposition in microcosm by molecular techniques. *PLoS ONE.* 8(12):1-10.
634
- 635 57. Marfenina O, Bubnova E, Semenova TA, Ivanova A, Danilogorskaya A. (2014).
636 Microfungi of the genus *Aspergillus*: Distribution and accumulation in different
637 conditions of natural environments (On Example Of European Russia). *Mikol*
638 *Fitopatol.* 48(3):139-150.
639
- 640 58. Marques OJ, Vidigal Filho PS, Dalpasquale VA, Scapim CA, Pricinotto LF,
641 Machinski Júnior M. (2009). Incidência fúngica e contaminações por micotoxinas em
642 grãos de híbridos comerciais de milho em função da umidade de colheita. *Acta Sci*
643 *Agron.* 31:667-675.
644
- 645 59. Pasin LAAP, Almeida JR, Abreu MS. (2009). Fungos associados a grãos de
646 cinco cultivares de café (*Coffea Arabica* L.). *Acta Bot Bras.* 23(4):1129-1132.
647
- 648 60. Santos DA, Oliveira MM, Curvelo AAS, Fonseca LP, Porto ALM. (2017).
649 Hydrolysis of cellulose from sugarcane bagasse by cellulases from marine-derived
650 fungi strains. *Int. Biodeter Biodegr.* 121:66-78.
651
- 652 61. Verma P, Verma RK. (2016). Cellulase activity of soil fungi (*Aspergillus*,
653 *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*) isolated from rhizosphere region of iron ore mine
654 overburden soil. *Int J Basic Appl Biol.* 3(2):115-120.
655
- 656 62. Zoppas BCA, Valencia-Barrera RM, Fernández-González D. (2011). Distribuição
657 de esporos de *Cladosporium* spp no ar atmosférico de Caxias do Sul, RS, Brasil,
658 durante dois anos de estudo. *Rev Bras Alergia Imunopatol.* 34(2):55-58.
659
- 660 63. Bensch K, Braun U, Groenewald JZ, Crous PW. (2012). The genus
661 *Cladosporium*. *Stud Mycol.* 72:1-401.
662
- 663 64. Gutarowska B. (2014). Moulds in biodeterioration of technical materials. *Folia Biol*
664 *Oecol.* 10(1):27-39.
665

- 666 65. Sibanda T, Selvarajan R, Tekere M, Nyoni H, Meddows-Taylor S. (2017).
667 Potential biotechnological capabilities of cultivable mycobiota from carwash effluents.
668 *Microbiologyopen*. 6(5):e00498.
669
- 670 66. Taware AS, More YW, Ghag SV, Rajurkar SK. (2017). Screening of endophytic
671 fungi isolated from *Azadirachta indica* A. Juss. for production of enzyme. *Biosci*
672 *Discov*. 8(4):688-694.
673
- 674 67. Zhang S, Shan D, Liu X, Sun M. (2018). Cellulose-Degrading Strains: their
675 Screening and Application to Corn Straw in Low-Temperature Environments. *Pol J*
676 *Environ. Stud*. 27(5):2349-2355.
677
- 678 68. Pitt JI, Samson RA, Frisvad JC. (2000). List of accepted species and their
679 synonyms in the Family *Trichocomaceae*. Integration of modern taxonomic methods
680 for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Reaging: Harwood Academic
681 Publishers. pp 9-46.
682
- 683 69. Oyedeji O, Ojekunle OO. (2018). Cellulase production from *Penicillium citrinum*
684 using brewer' as spent grain and pineapple peels as cheap, alternate substrates. *Int*
685 *J Sci*. 7:74-83.
686
- 687 70. Anasontzis GE, Thuy NT, Hang DTM, Huong HT, Thanh DT, Hien D.D., Thanh
688 VN, Olsson L. (2017). Rice straw hydrolysis using secretomes from novel fungal
689 isolates from Vietnam. *Biomass Bioenerg*. 99:11-20.
690
- 691 71. Verkley GJ, Dukik K, Renfurm R, Göker M, Stielow JB. (2014). Novel genera and
692 species of coniothyrium-like fungi in Montagnulaceae (Ascomycota) Persoonia.
693 32:25-51.
694

CAPITULO III**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Paraphaeosphaeria*
*arecacearum***

4 Otimização da produção de celulases por *Paraphaeosphaeria arecacearum*

Áurea Welter^{a,*}, Emerson Adriano Guarda^a, Patrícia Martins Guarda^a, Jéssica Barros Aguiar Silva^b

Celulases têm amplo emprego em diversos segmentos da indústria, sendo obtidas a partir de fontes como fungos filamentosos, que quando cultivados em meio e condições de cultivo adequadas, fornecem grande quantidade de enzimas. O presente trabalho teve por objetivo identificar variáveis e otimizar aquelas que influenciam na produção de celulases pelo fungo filamentoso *Paraphaeosphaeria arecacearum*. As variáveis significativas identificadas pelo planejamento Placket-Burman foram otimizadas por meio de Delineamento Composto Central Rotacional. Das sete variáveis estudadas, peptona, tempo de incubação e pH influenciaram significativamente a produção de celulases. Após a otimização, verificou-se máxima produção na presença de peptona (4 gL⁻¹), pH 4,0 e 11 dias de cultivo, sendo esta de 6,32 U.g⁻¹ ss para FPase, 7,58 U.g⁻¹ ss para CMCase e 5,08 U.g⁻¹ ss para exoglicanase, o que representa um aumento, respectivamente, de 2,54, 3,09 e 2,57 vezes. Considerando a capacidade de produção de celulases pela linhagem em estudo após otimização, esta tem potencial para emprego na hidrólise de biomassas lignocelulósicas visando a obtenção de biocombustíveis.

Palavras-chave: Celulase total; Bagaço de cana-de-açúcar, Fermentação submersa, Metodologia de superfície de resposta

*Informação de contato: a: Universidade Federal do Tocantins, Campus de Palmas; Laboratório de Pesquisa em Química Ambiental e de Biocombustíveis (LAPEQ); Av. NS 15 ALCNO 14, 109 Norte; Plano Diretor Norte, Palmas- TO; CEP: 77001090.; b: Universidade Federal do Tocantins, Campus de Palmas; Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia; Av. NS 15 ALCNO 14, 109 Norte; Plano Diretor Norte, Palmas- TO; CEP: 77001090; *Autor correspondente: aureaw@mail.uft.edu.br*

4.1 INTRODUÇÃO

Com o crescimento populacional e enriquecimento de países em desenvolvimento, a demanda mundial por alimentos, água e energia tem se tornado um desafio. Em referência a energia, os novos paradigmas relacionados à mitigação de impactos ambientais, dentre eles a minimização das emissões de gases do efeito estufa, reforçam a necessidade de obtenção de fontes alternativas, limpas e renováveis de energia, a exemplo da biomassa (Zahid Anwar *et al.* 2014; Trombeta e Caixeta Filho 2017; Moiceanu *et al.* 2019).

A categoria de biomassa, inclui as agroindustriais como o bagaço de cana-de-açúcar (BCA), cujo maior produtor mundial é o Brasil, com um processamento de 615,84 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra 2018/2019 (Conab 2018). Considerando que uma tonelada de cana produz em média 250 kg de bagaço, este representa o resíduo agroindustrial em maior quantidade no país, considerado o montante processado anualmente (Única 2012; Conab 2018).

O BCA pode ser utilizado na produção de enzimas, energia elétrica e etanol de segunda geração (Vasconcelos *et al.* 2015; Trombeta e Caixeta Filho 2017). No que diz respeito ao etanol, a viabilidade econômica do processo de produção ainda esbarra em limitações tecno-econômicas, como alto custo dos coquetéis enzimáticos

54 e o desempenho destes na conversão da lignocelulose em açúcares fermentescíveis
55 (Florencio *et al.* 2017). Nesse sentido, a produção de celulases utilizando biomassas
56 para o cultivo de microrganismos tem sido considerada uma estratégia para diminuir
57 os gastos na obtenção de enzimas (Chandel *et al.* 2012; Johnson 2016).

58 Diversos trabalhos relatam o emprego do BCA como fonte de carbono indutora
59 da síntese de celulases por microrganismos, seja em processo de fermentação
60 submersa ou em estado sólido (Cunha *et al.* 2012; Hansen *et al.* 2015; Vasconcelos
61 *et al.* 2015; Cunha *et al.* 2017). Além da fonte de carbono, a produção de enzimas
62 extracelulares pode ser controlada pela composição nutricional de meios com
63 compostos de nitrogênio diferentes, sais minerais e vitaminas e alteração em
64 parâmetros do processo físico como período de incubação, temperatura e pH (Goyal
65 *et al.* 2014; Yang *et al.* 2014). Portanto, esses fatores desempenham um papel
66 significativo no desenvolvimento de bioprocessos industriais para a produção de
67 enzimas (Premalatha *et al.* 2015; Hu *et al.* 2018).

68 Limitações associadas ao baixo rendimento de enzimas podem ser superadas
69 pela introdução de novas espécies ou pela indução da produção de celulases por
70 meio da otimização dos parâmetros que controlam o rendimento (Singh *et al.* 2014).
71 Sendo assim, neste trabalho, foram identificadas variáveis nutricionais e do processo
72 físico que influenciam a produção de celulases por *Paraphaeosphaeria arecacearum*
73 sendo estas otimizadas a partir de um Delineamento de Composto Central
74 Rotacional (DCCR).

75

76

77 **4.2 EXPERIMENTAL**

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

101

102

103

80 **4.2.1 Microrganismo**

81 O fungo filamentoso *Paraphaeosphaeria arecacearum* (número de acesso ao
82 Genbank: MH801881) foi fornecido pela Coleção de Culturas Microbianas Carlos
83 Rosa do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia – LAMBIO, da
84 Universidade Federal do Tocantins, Campus de Palmas – TO.

85 **4.2.2 Pré-tratamento da biomassa**

86 O bagaço de cana-de-açúcar (BCA) otido de um produtor de Palmas-TO, foi
87 pré-tratado com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) alcalino (Rabelo *et al.* 2014;
88 Assumpção *et al.* 2016). O material *in natura* fom lavado em água e secado em
89 estufa a 60°C até a estabilização da massa. Em seguida, este foi triturado em
90 moinho de facas e a 2 g deste acrescentou-se 100 mL de solução 1% de H₂O₂, pH
91 11,5 (ajustado com uma solução 5,0 mol·L⁻¹ de NaOH) e mantido em incubadora
92 shaker por 24h, a 25°C e agitação constante de 150 rpm, Após o material foi filtrado
93 com o auxílio de bomba a vácuo. A fração sólida remanescente foi lavada com água
94 destilada fervente e secada em estufa a 60 °C até atingir peso constante e então
95 mantido em geladeira até o uso.

97 **4.2.3 Produção de celulases por fermentação submersa**

98 A reativação do fungo foi realizada em meio Ágar Batata Dextrose (BDA) sendo
99 incubado a 28°C por sete dias. A partir deste material cultivado, foi preparada uma
100 suspensão de esporos (1x10⁶ esporos/mL), sendo esta inoculada em frascos
101 Erlenmeyer com 50mL do meio contendo 5 g de BCA pré-tratado com peróxido de
102 hidrogênio (H₂O₂) alcalino, solução de sais segundo Mandels e Weber (1969), com
103 modificações, composta por KH₂PO₄ (2.0 gL⁻¹), CaCl₂·2H₂O (0,3 gL⁻¹), MgSO₄·7H₂O

1	7 (1)	2 (-1)	3 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	3 (1)
2	7 (1)	6 (1)	0 (-1)	3 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)
3	7 (-1)	6 (1)	3 (1)	0 (-1)	3 (-1)	0 (-1)	0 (-1)
4	7 (1)	2 (-1)	3 (1)	3 (1)	0 (-1)	3 (1)	0 (-1)
5	7 (1)	6 (1)	0 (-1)	3 (1)	3 (1)	0 (-1)	3 (1)
6	7 (1)	6 (1)	3 (1)	0 (-1)	3 (1)	3 (1)	0 (-1)
7	5 (-1)	6 (1)	3 (1)	3 (1)	0 (-1)	3 (1)	3 (1)
8	5 (-1)	2 (-1)	3 (1)	3 (1)	3 (1)	0 (-1)	3 (1)
9	5 (-1)	2 (-1)	0 (-1)	3 (1)	3 (1)	3 (1)	0 (-1)
10	7 (1)	2 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	3 (1)	3 (1)	3 (1)
11	5 (-1)	6 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	3 (1)	3 (1)
12	5 (-1)	2 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)
13	6 (0)	4 (0)	1,5 (0)	1,5 (0)	1,5 (0)	1,5 (0)	1,5 (0)
14	6 (0)	4 (0)	1,5 (0)	1,5 (0)	1,5 (0)	1,5 (0)	1,5 (0)
15	6 (0)	4 (0)	1,5 (0)	1,5 (0)	1,5 (0)	1,5 (0)	1,5 (0)

142

143

144 4.2.6 Delineamento composto central rotacional (DCCR) e metodologia de

145 superfície de resposta

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

Após identificar as variáveis significativas pelo PB, estas foram otimizadas utilizando um delineamento composto central rotacional (fatorial 2^3), com 8 pontos fatoriais (-1 e +1), 6 pontos axiais (-1,68 e +1,68) e 3 pontos centrais (0) (Tabela 3). A tabela 4, mostra a matriz gerada com 17 ensaios, valores reais e codificados. Os valores das variáveis foram definidos a partir dos resultados do PB. As seguintes condições foram mantidas fixas: concentração do substrato (5g), inóculo (1×10^6 esporos/mL), sais de Mandels e Weber (1969), temperatura (35 °C) e agitação (150 rpm). As variáveis dependentes avaliadas foram FPase, CMCase e exoglicanase, sendo estas quantificadas como descrito anteriormente.

Tabela 3. Variáveis independentes, níveis e valores no delineamento composto central rotacional

Código	Variável	Níveis				
		-1,68	-1	0	1	1,68
X ₁	pH	2,3	3	4	5	5,7
X ₂	Tempo (dias)	5,6	6	8	10	1,1
X ₃	Peptona (gL ⁻¹)	2,3	3	4	5	5,7

157

158

159

160

Tabela 4. Matriz de planejamento DCCR para avaliar efeitos das variáveis na produção de celulases por *Paraphaeosphaeria arecacearum*

Ensaio	pH	Tempo (dias)	Peptona (gL ⁻¹)
1	3(-1)	6(-1)	3(-1)
2	5(1)	6(-1)	3(-1)
3	3(-1)	10(1)	3(-1)
4	5(1)	10(1)	3(-1)
5	3 (-1)	6(-1)	5(1)
6	5 (1)	6(-1)	5(1)
7	3(-1)	10(1)	5(1)
8	5(1)	10(1)	5(1)
9	2,3 (-1,68)	8(0)	4(0)

10	5,7(1,68)	8(0)	4(0)
11	4(0)	4,6(-1,68)	4(0)
12	4(0)	11(1,68)	4(0)
13	4(0)	8(0)	2,3(-1,68)
14	4(0)	8(0)	5,7(1,68)
15	4(0)	8(0)	4(0)
16	4(0)	8(0)	4(0)
17	4(0)	8(0)	4(0)

161

162

163

Os dados obtidos pelo DCCR (Tabela 4) foram ajustados segundo um modelo polinomial de segunda ordem para prever o ponto ótimo:

$$\hat{Y}_1 = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \beta_{11} \cdot X_1^2 + \beta_2 \cdot X_2 + \beta_{22} \cdot X_2^2 + \beta_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (1)$$

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

4.2.7 Análise estatística

175

176

177

178

179

180

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

181

182

183

184

185

186

187

188

189

4.3.1 Triagem de variáveis pelo planejamento Plackett-Burman

190

191

192

193

Para avaliar os efeitos das variáveis independentes na produção de FPase CMCase e exoglicanase, foi realizado um fatorial fracionário de dois níveis por planejamento experimental Plackett-Burman, sendo a significância deste representada por meio de gráfico de Pareto (Fig. 1).

194

195

196

197

198 **FPase**

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

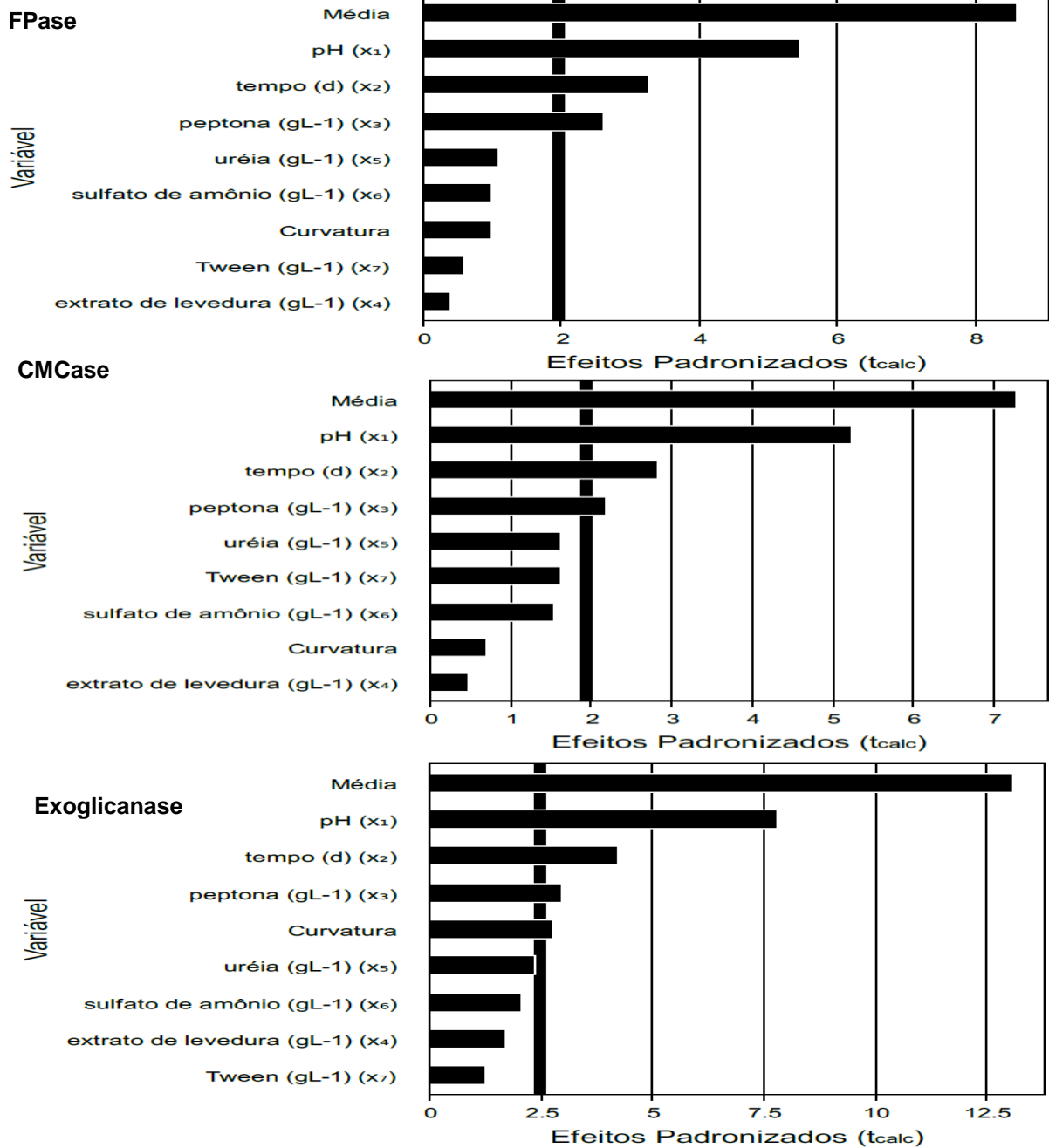


Fig.1. Gráfico de Pareto apresentando a significância dos efeitos das variáveis independentes na produção de celulasas *Paraphaeosphaeria arecacearum*

O gráfico de Pareto mostra as variáveis independentes em ordem de importância para o modelo sendo significativas as que ultrapassam a linha vertical. Logo, influenciaram significativamente a produção de celulasas, tempo, pH e peptona ($p < 0,05$) (Fig. 1). O planejamento de PB possibilita avaliar além da influência das variáveis independentes, se o efeito destas foi positivo ou negativo sobre a variável dependente (Tabela 5).

242

243

244 **Tabela 5.** Coeficientes estatísticos para os efeitos avaliados derivados do
 245 planejamento Plackett-Burman

Fpase			
Variável	Efeito	t calculado	p-valor
Média	0,88	8,60	0,0001
pH	-1,12	-5,47	0,0016*
Tempo	0,67	3,28	0,0168*
peptona	0,53	2,61	0,0401*
extrato de levedura	-0,08	-0,41	0,6956
Uréia	-0,23	-1,10	0,3136
sulfato de amônio	0,20	1,00	0,3578
Tween-80	0,12	0,59	0,5768
CMCase			
Variável	Efeito	t calculado	p-valor
Média	0,68	7,28	0,0003
pH	-0,81	-8,46	0,0001*
Tempo	0,36	3,75	0,0095*
Peptona	0,24	2,53	0,0447*
extrato de levedura	-0,08	-0,81	0,4511
Uréia	-0,14	-1,44	0,2000
sulfato de amônio	0,12	1,28	0,2493
Tween-80	0,14	1,41	0,2069
Exoglicanase			
Variável	Efeito	t calculado	p-valor
Média	0,76	13,09	0,0000
pH	-0,90	-7,82	0,0002*
Tempo	0,49	4,20	0,0057*
Peptona	0,34	2,96	0,0251*
extrato de levedura	-0,20	-1,69	0,1426
Uréia	-0,27	-2,36	0,0564
sulfato de amônio	0,24	2,04	0,0874
Tween-80	0,15	1,27	0,2516
* (p<0,05)			

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

Das sete variáveis estudadas, tempo, peptona, sulfato de amônio e Tween mostraram efeito positivo na produção das celulases enquanto o pH, extrato de levedura e uréia mostraram efeito negativo (Tabela 5). Apesar de sulfato de amônio e Tween mostrar efeito positivo, este não foi estatisticamente significativo. Considerando as variáveis que foram significativas na produção de celulases, o fato do efeito ser positivo, como é o caso da concentração da peptona e do tempo de cultivo da cepa, isso indica que o aumento destes favorecerá a produção de enzimas. Como o efeito foi negativo para o pH, a produção enzimática será favorecida quando este for reduzido.

No presente estudo, o fungo *Paraphaeosphaeria arecacearum* foi cultivado em meio contendo BCA, amplamente empregado na produção de celulases pelo baixo custo e por suprir as necessidades de glicose, principal fonte de carbono utilizada por fungos, a partir da degradação da celulose. Estudos mostram que a celulose atua como indutor de fatores de transcrição que regulam a expressão de genes de

261 celulasas (Bazafkan *et al.* 2014; Tani *et al.* 2014). Aliado a esse fato, atua como
262 suporte físico para o crescimento do microrganismo (Pandey 2003).

263 O nitrogênio é um requisito essencial para o crescimento celular fúngico, pois
264 favorece a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e glicosamina, principal
265 componente da parede celular (Pedria *et al.* 2015). Fungos apresentam
266 comportamentos distintos no crescimento celular na presença de fontes orgânicas
267 de nitrogênio (peptona e extrato de levedura) e inorgânicas (sulfato de amônio e
268 uréia), o que também é verificado na produção de celulasas, pois a mesma fonte de
269 nitrogênio pode ter efeito negativo para uma linhagem, mas positiva para outra
270 (Rodríguez-Zúñiga *et al.* 2011; Tambe 2012; Pedria *et al.* 2015; Rosa *et al.* 2017).

271 Portanto, torna-se necessário conhecer a fonte de nitrogênio ideal para cada
272 linhagem. No presente estudo, as fontes de nitrogênio avaliadas foram peptona,
273 extrato de levedura, uréia e sulfato de amônio, mas somente peptona mostrou efeito
274 positivo significativo na produção de todas as celulasas (Tabela 5). Além de ser uma
275 fonte de nitrogênio, a peptona contém vitaminas, as quais são de grande importância
276 na regulação do metabolismo.

277 De acordo com a literatura, o agente surfactante tween 80 aumenta a
278 produção de celulasas em fermentação submersa (Deswal *et al.* 2011), porém no
279 presente estudo este fator não influenciou significativamente a produção enzimática
280 ($p > 0,05$) (Tabela 5). Surfactantes aumentam o sítio de adsorção a fibra celulósica, o
281 que favorece maior conversão desta em glicose e conseqüente contribui no
282 crescimento do micélio. Além disso, acredita-se que este composto aumenta a
283 permeabilidade da membrana da célula fúngica, resultando em maior secreção das
284 enzimas para o meio extracelular (Assares *et al.* 2012).

285 O fator tempo influencia na produção enzimática, porém, o período de tempo
286 necessário para produção máxima varia entre as cepas, sendo que relatos da
287 literatura mencionam que esse período pode ser de 3 a 14 dias (Rodríguez-Zúñiga *et al.*
288 *et al.* 2011; El-Hahrawy *et al.* 2017). Esta variável mostrou influenciar de forma positiva
289 a produção enzimática no presente estudo (Tabela 5).

290 Entre os parâmetros físicos, o pH inicial do meio de crescimento desempenha
291 um papel importante pela indução de alterações morfológicas e na secreção
292 enzimática (Gupta *et al.* 2003). Para a produção de celulasas, a produção máxima
293 ocorre em ampla faixa de pH, ou seja, de 3 a 7, conforme espécie estudada (Sales
294 *et al.* 2010; Jadhav *et al.* 2013; El-Hahrawy *et al.* 2017). No presente estudo, este
295 fator influenciou significativamente a produção de celulasas (Tabela 5).

296 Em nosso estudo, no ensaio 7 (Tabela 2) foi verificada a maior produção de
297 enzimas, sendo para FPase, CMCase e exoglicanase respectivamente, 2,48, 2,53 e
298 $1,97 \text{ U.g}^{-1} \text{ ss}$ (dados não mostrados). Dentre as variáveis que compõem o ensaio 7,
299 fazem parte as três significativas no nosso estudo para a variável dependente
300 avaliada (Fig. 1, Tabela 5), verificando-se que nessa condição, a concentração de
301 peptona foi 3 gL^{-1} , tempo de cultivo 6 dias e pH do meio 5. A partir dessas
302 informações, foi gerada a matriz de DCCR (Tabela 3) para a otimização das
303 variáveis independentes tendo como resposta a produção de celulasas.

304 305 **4.3.2 Análise do planejamento experimental DCCR e metodologia de superfície** 306 **de resposta**

307
308 As variáveis estudadas e os seus respectivos níveis, além dos resultados das
309 atividades enzimáticas obtidos no delineamento DCCR são apresentados na Tabela
310 6.

311 **Tabela 6.** Valores reais e codificados para o planejamento experimental DCCR
 312 fatorial 2³ e as respostas experimentais (Exp.) e preditas (Pred.) correspondentes

Ensaio	pH	Tempo (dias)	Peptona (gL ⁻¹)	Resposta Exp. (U.g ⁻¹ ss)			Resposta Pred. (U.g ⁻¹ ss)		
				A	B	C	A	B	C
1	3(-1)	6(-1)	3(-1)	2,4	2,88	1,93	2,73	3,23	2,15
2	5(1)	6(-1)	3(-1)	2,65	3,28	2,13	3,21	3,98	2,53
3	3(-1)	10(1)	3(-1)	3,7	4,44	2,97	3,95	4,78	3,19
4	5(1)	10(1)	3(-1)	4,07	4,88	3,27	4,35	5,23	3,15
5	3 (-1)	6(-1)	5(1)	2,64	3,17	2,12	2,91	3,47	2,28
6	5 (1)	6(-1)	5(1)	3,45	4,14	2,77	3,75	4,44	2,96
7	3(-1)	10(1)	5(1)	5,48	6,93	4,41	5,47	6,87	4,41
8	5(1)	10(1)	5(1)	6,02	7,22	4,84	6,23	7,53	5,03
9	2,3 (-1,68)	8(0)	4(0)	3,6	4,32	2,89	3,37	4,08	2,73
10	5,7(1,68)	8(0)	4(0)	4,95	5,94	3,98	4,41	5,27	3,57
11	4(0)	4,6(-1,68)	4(0)	3,63	4,36	2,65	3,03	3,69	2,27
12	4(0)	11(1,68)	4(0)	6,32	7,84	5,08	6,15	7,6	4,89
13	4(0)	8(0)	2,3(-1,68)	3,74	4,49	3,01	3,14	3,77	2,57
14	4(0)	8(0)	5,7(1,68)	5,08	6,10	4,08	4,89	5,91	3,96
15	4(0)	8(0)	4(0)	5,6	6,77	4,50	5,72	6,88	4,6
16	4(0)	8(0)	4(0)	5,8	6,72	4,53	5,72	6,88	4,6
17	4(0)	8(0)	4(0)	5,64	6,99	4,66	5,72	6,88	4,6

A: FPase; B: CMCCase; C: Exoglicanase

313

314

315

316 Considerando os valores dos dados experimentais, a produção de FPase
 317 variou de 2,4 U.g⁻¹ ss a 6,32 U.g⁻¹ ss; CMCCase de 2,88 a 7,84 U.g⁻¹ ss e
 318 exoglicanase de 1,93 a 5,08 U.g⁻¹ ss. A atividade mais alta para as celulasas
 319 avaliadas foi verificada no ensaio 12, ou seja, presença de peptona na concentração
 320 de 4 gL⁻¹, meio com pH 4 e 11 dias de cultivo. Nessa condição, a produção predita
 321 para FPase, CMCCase e exoglicanase foi respectivamente 6,15, 7,6 e 4,89 U.g⁻¹ ss. A
 322 mensuração da atividade experimental (6,32, 7,84 e 5,08 respectivamente, para
 323 FPase, CMCCase exoglicanase) corresponde aos valores preditos na condição do
 324 ensaio 12 e representa um aumento de 2,54, 3,09 e 2,57 vezes respectivamente,
 325 para FPase, CMCCase e exoglicanase quando comparado a produção em condição
 de cultivo não otimizada, ou seja ensaio 7 do PB (Tabela 4).

326

327 Pachauri *et al.* (2006) verificaram um aumento de 8 vezes na produção de
 328 FPase para *Trichoderma longibochiatum* após otimização. Para *Aspergillus terreus*
 329 AUMC 10138, este aumento foi 1,85 e 1,97 vezes, respectivamente para FPase e
 330 CMCCase (Isaac e Abu-Tahon 2015). Logo, a partir de cada processo de otimização
 331 tem-se um aumento na produção de celulasas, já que são empregadas linhagens
 332 distintas, diferentes fontes de carbono e nitrogênio, parâmetros físicos e variáveis
 que são otimizadas.

333

334 Os resultados obtidos a partir da matriz experimental DCCR para produção de
 335 celulasas foram submetidos à análise de regressão. A Tabela 7 representa os
 336 coeficientes de regressão das variáveis e suas interações.

336

337

338

339

340 **Tabela 7.** Coeficientes de regressão para a produção de celulases

Fpase			
Variável	Efeito	t calculado	p-valor
Media	5,72	19,1	0,00000
pH (L)	0,31	2,20	0,0634
pH (Q)	-0,65	-4,19	0,0041*
tempo (L)	0,93	6,58	0,0003*
tempo (Q)	-0,40	-2,59	0,0360*
peptona (L)	0,51	3,65	0,0081*
peptona (Q)	-0,60	-3,88	0,0061*
pH (L) x tempo (L)	-0,02	-0,1	0,9252
pH (L) x peptona (L)	0,09	0,5	0,6338
tempo (L) x peptona (L)	0,34	1,83	0,1096
CMCase			
Variável	Efeito	t calculado	p-valor
Media	6,88	19,05	0,0000
pH (L)	0,35	2,09	0,0754
pH (Q)	.0,78	-4,18	0,0042*
tempo (L)	1,16	6,85	0,0002*
tempo (Q)	.0,44	-2,34	0,0519
peptona (L)	0,64	3,75	0,0072*
peptona (Q)	-0,72	-3,86	0,0062*
pH (L) x tempo (L)	-0,08	-0,35	0,7339
pH (L) x peptona (L)	0,05	0,24	0,8179
tempo (L) x peptona (L)	0,46	2,08	0,0761
Exoglicanase			
Variável	Efeito	t calculado	p-valor
Media	4,60	21,18	0,0000
pH (L)	0,25	2,45	0,0440*
pH (Q)	-0,51	-4,56	0,0026*
tempo (L)	0,78	7,62	0,0001*
tempo (Q)	-0,36	-3,20	0,0151*
peptona (L)	0,41	4,04	0,0049*
peptona (Q)	-0,47	-4,21	0,0040*
pH (L) x tempo (L)	-0,01	-0,01	0,9170
pH (L) x peptona (L)	0,07	0,55	0,5978
tempo x peptona (L)	0,027	2,03	0,0816
(L): linear; (Q): quadrática; *p<0,05			

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

Com os resultados dos coeficientes de regressão, observa-se que para peptona a variável linear e quadrática foram significativas para a produção das celulases avaliadas ($p < 0,05$). Já para a variável tempo, a linear foi significativa para todas as enzimas, mas a quadrática somente para FPase e exoglicanase. Quanto ao pH, verifica-se que a variável linear foi significativa somente para exoglicanase e a quadrática para todas as celulases ($p < 0,05$). Os efeitos quadráticos significativos evidenciam comportamento curvilíneo e convexo em determinadas regiões das superfícies de respostas geradas.

Por meio da análise de regressão, verificou-se que não houve interação significativa entre as variáveis, para nenhuma celulase produzida pelo fungo

352 filamentosos em estudo, o que significa que cada variável apresentou efeito linear
 353 isolado. Os resultados da análise de variância (ANOVA) para a produção de
 354 celulases estão descritos na Tabela 8.

355
 356 **Tabela 8.** Análise de Variância (ANOVA) do planejamento DCCR para a resposta
 357 produção de FPase, CMCase e exoglicanase por *P. arecacearum*

Fonte	Soma dos quadrados	GL	QM	F calc	p-valor	
Regressão	23,6	6	3,9	13,7	0,00026	FPase R ² = 0,8916
Residual	2,9	10	0,3			
Falta de ajuste	2,8	8	0,4	31,8	0,3085	
Erro puro	0,0	2	0,0			
Total	26,5	16				
Regressão	31,7	4	7,9	11,4	0,00048	CMCase R ² = 0,7912
Residual	8,4	12	0,7			
Falta de ajuste	8,3	10	0,8	40,2	0,2453	
Erro puro	0,0	2	0,0			
Total	40,1	16				
Regressão	15,9	6	2,6	16,3	0,00012	Exoglicanase R ² = 0,9072
Residual	1,6	10	0,2			
Falta de ajuste	1,6	8	0,2	27,8	0,3515	
Erro puro	0,0	2	0,0			
Total	17,5	16				

GL= graus de Liberdade QM= quadrado médio

358

359 A análise dos dados do DCCR, por regressão múltipla levou as respostas
 360 previstas, ou seja, produção de FPase, CMCase e exoglicanase, conforme expresso
 361 pelas equações 2, 3 e 4:

362 FPase:

$$363 Y_1 = 5,72 + 0,31 x_1 - 0,65 x_1^2 + 0,93 x_2 - 0,40 x_2^2 + 0,51 x_3 - 0,60 x_3^2 \quad (2)$$

364

365 CMCase:

$$366 Y_2 = 6,32 - 0,65 x_1^2 + 1,16 x_2 + 0,64 x_3 - 0,59 x_3^2 \quad (3)$$

367

368 Exoglicanase:

$$369 Y_3 = 4,60 + 0,25 x_1 - 0,51 x_1^2 + 0,78 x_2 - 0,36 x_2^2 + 0,41 x_3 - 0,47 x_3^2 \quad (4)$$

370

371 Onde: $Y_{(1, 2 e 3)}$ = Atividade enzimática (U g⁻¹ ss); X_1 = pH; X_2 = tempo; X_3 = peptona.

372

373 Os coeficientes de determinação (R²) obtidos para o modelo após o ajuste,
 374 foram 0,896, 0,7912 e 0,9072, respectivamente, para FPase, CMCase e
 375 exoglicanase (Tabela 8). Pela análise de variância (ANOVA), o modelo de regressão
 376 quadrática adotado foi significativo (p<0,05). Já parâmetro falta de ajuste do modelo
 377 não foi significativo (p>0,05), ou seja, o modelo se ajustou adequadamente aos
 378 pontos experimentais, representando com confiabilidade os resultados (Tabela 8).
 379 Logo, os modelos podem ser usados para fins preditivos da produção de celulases
 380 por *Paraphaeosphaeria arecacearum*. Sendo assim, os modelos validados foram
 381 utilizados para gerar os gráficos de superfície de resposta a fim de visualizar os

382 efeitos combinados das variáveis independentes na produção de celulasas (Fig. 2, 3
 383 e 4)

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

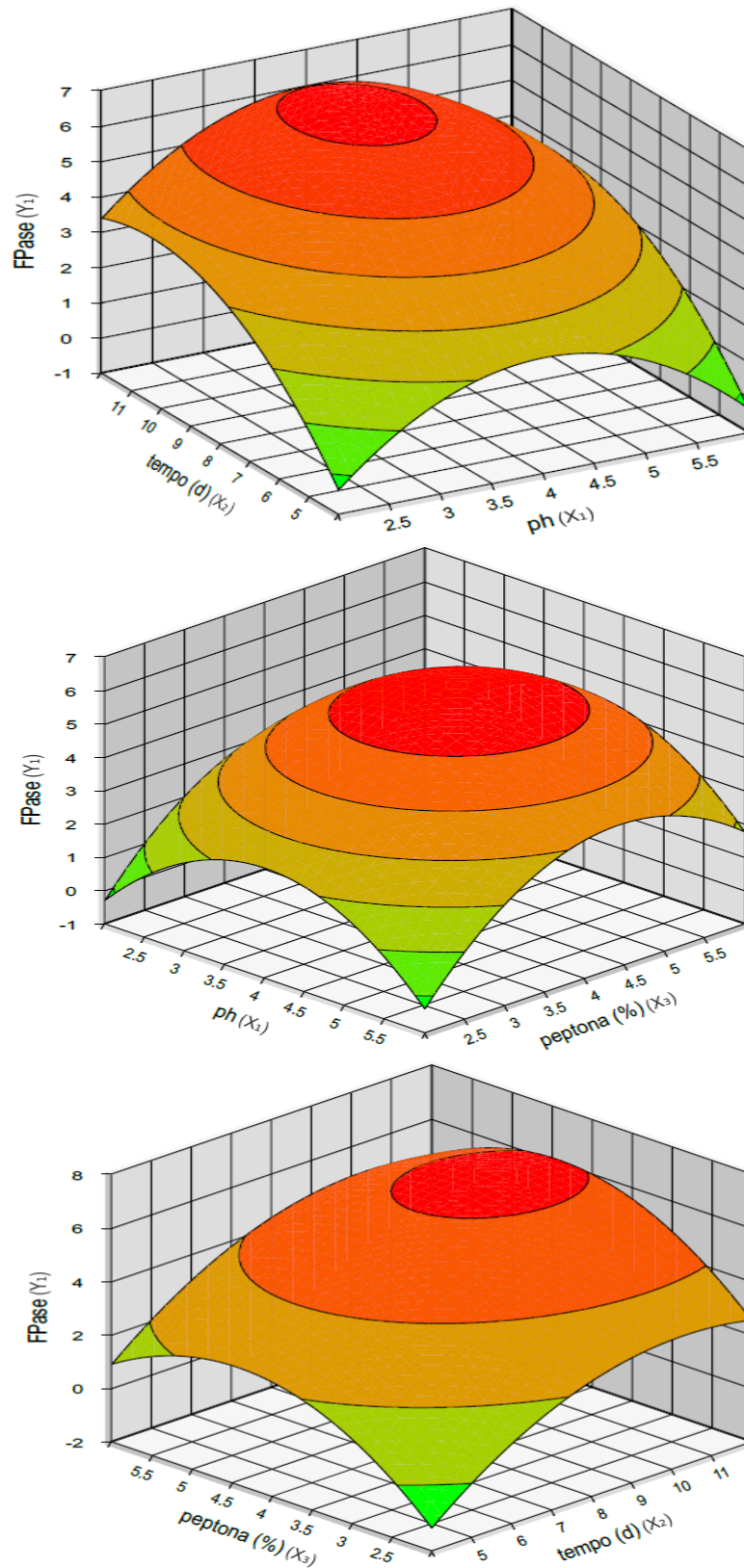


Fig. 2. Gráfico de superfície de resposta que representa as interações entre as variáveis tendo como resposta a produção de FPase por *Paraphaeosphaeria arecacearum*

433
 434
 435
 436
 437
 438
 439
 440
 441
 442
 443
 444
 445
 446
 447
 448
 449
 450
 451
 452
 453
 454
 455
 456
 457
 458
 459
 460
 461
 462
 463
 464
 465
 466
 467
 468
 469
 470
 471
 472
 473
 474
 475
 476
 477
 478
 479
 480
 481
 482
 483

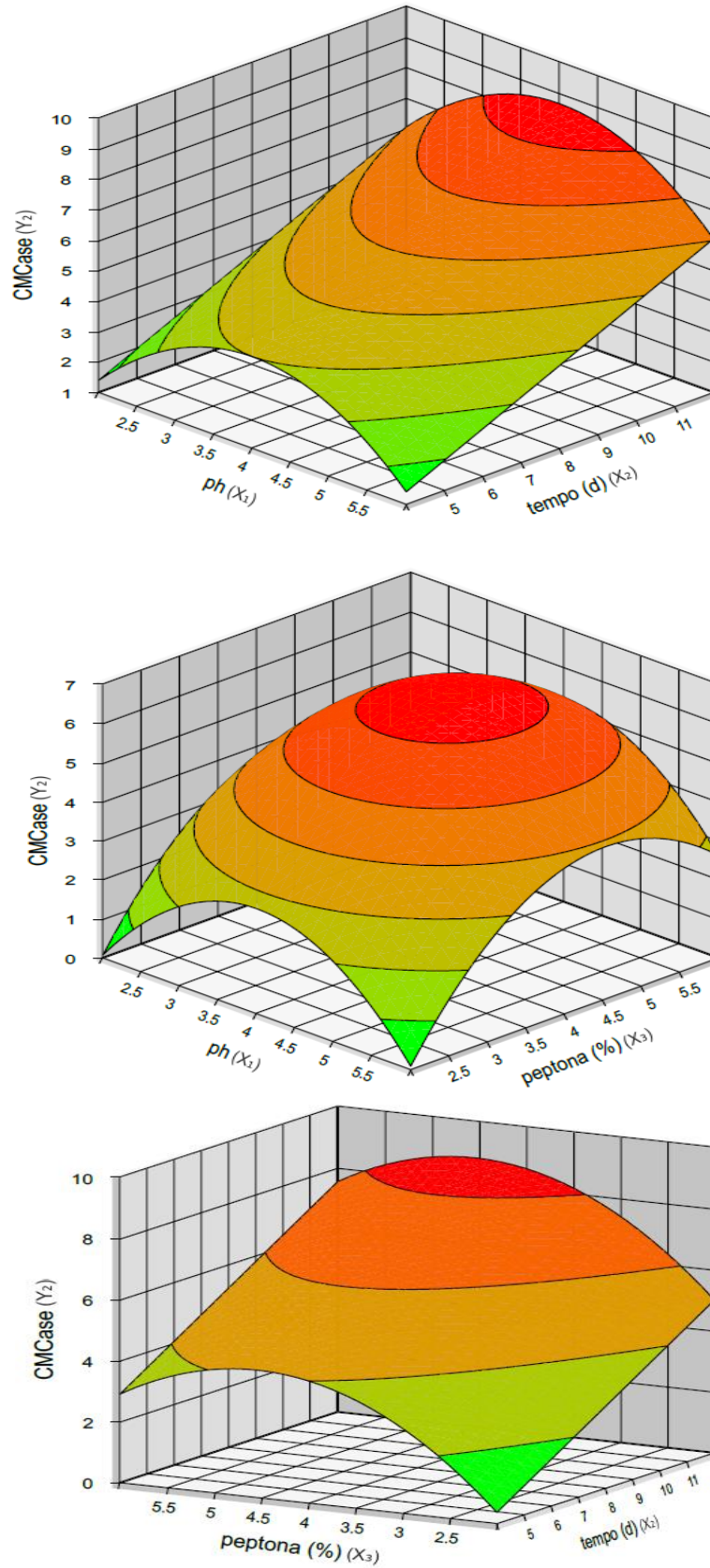


Fig. 3. Gráficos de superfície de resposta que representa as interações entre as variáveis tendo como resposta a produção de CMCase por *Paraphaeosphaeria arcacearum*

484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541

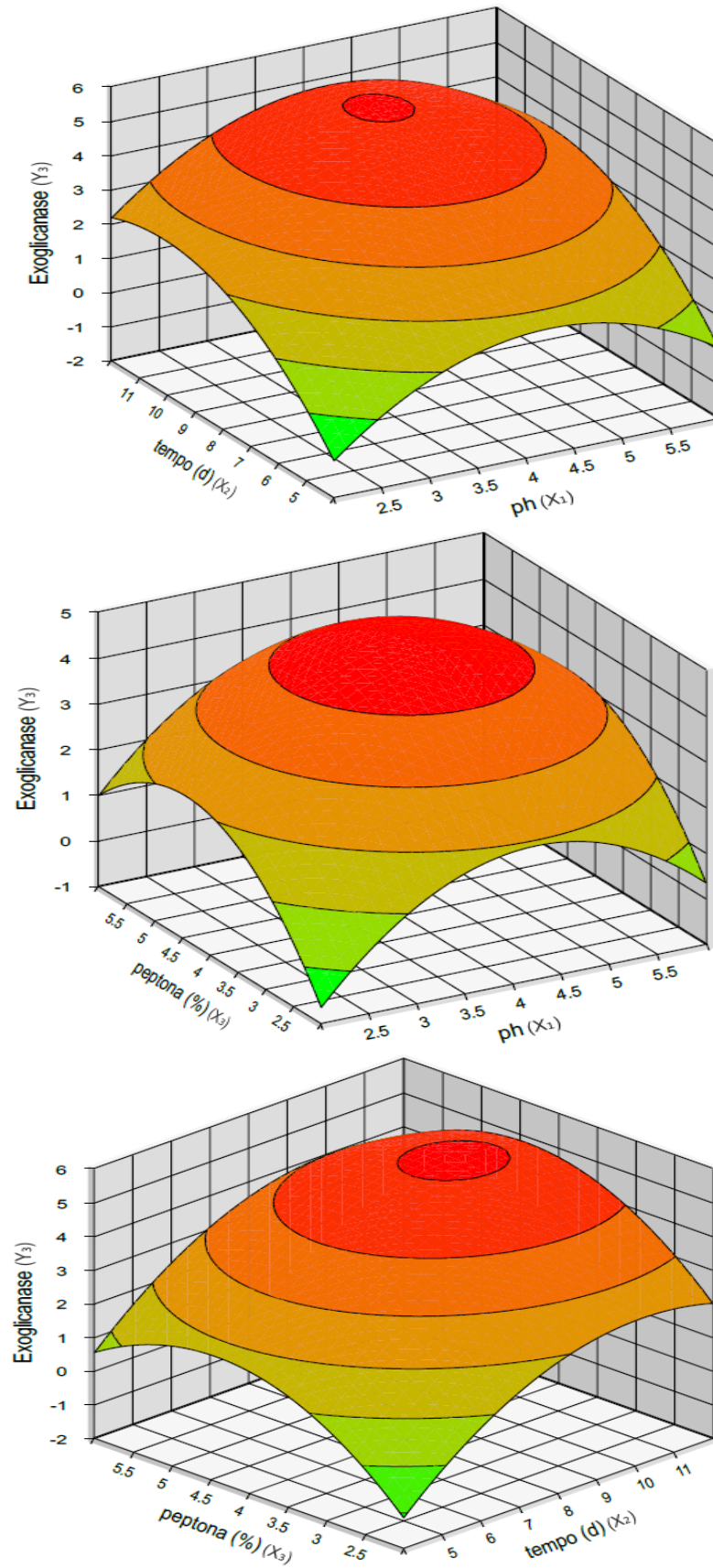


Fig. 4. Gráficos de superfície de resposta que representa as interações entre as variáveis tendo como resposta a produção de Exoglicanase por *Paraphaeosphaeria arecacearum*

542 Os gráficos de superfície de resposta mostram que uma maior produção das
 543 celulasas avaliadas é obtida quando as variáveis peptona e pH estão em seus níveis
 544 centrais 4 gL⁻¹ e 4, respectivamente; já nos níveis superiores e inferiores das
 545 variáveis se alcança menor produção (Fig. 2, 3 e 4). Quanto a variável tempo, para
 546 todas as enzimas se verifica maior produção em nível superior (11 dias), mostrando
 547 para FPase e exoglicanase um ponto máximo relativamente semelhante, no entanto,
 548 para CMCCase, esta poderia ser aumentada.

549
 550

551 4.4 CONCLUSÕES

552

553 1. O BCA utilizado como substrato se mostrou efetivo na indução de enzimas, porém fatores
 554 nutricionais como a peptona e condições ambientais como tempo de cultivo e pH do meio
 555 desempenharam um papel significativo na produção de FPase CMCCase e exoglicanase por *P.*
 556 *arecacearum*, como verificado pelo planejamento Placket-Burmann.

557

558 2. A partir do delineamento composto central rotacional, com as variáveis peptona (4 gL⁻¹), pH (4,0) e
 559 tempo (11 dias) otimizadas, a produção de FPase foi 6,32 U.g⁻¹ ss, CMCCase 7,58 U.g⁻¹ ss e
 560 exoglicanase 5,08 U.g⁻¹ss, o que indicou um aumento de 2,54, 3,09 e 2,57 vezes respectivamente,
 561 para FPase, CMCCase e exoglicanase quando comparado a produção em condição de cultivo não
 562 otimizada.

563

564 3. Pela análise de variância (ANOVA) os modelos de regressão quadrática mostraram-se
 565 significativos (p<0,05) e com coeficientes de determinação (R²) respectivamente, 0,89,6, 0,7912 e
 566 0,9072, indicando bom ajuste e, portanto, preditivos na produção de celulasas por
 567 *Paraphaeosphaeria arecacearum*.

568

569 4. A relação empírica entre a produção de celulasas e as variáveis independentes estudadas pode
 570 ser expressa pelo seguinte modelo quadrático para FPase $Y_1 = 5,72 + 0,31 x_1 - 0,65 x_1^2 + 0,93 x_2 -$
 571 $0,40 x_2^2 + 0,51 x_3 - 0,60 x_3^2$; CMCCase $Y_2 = 6,32 - 0,65 x_1^2 + 1,16 x_2 + 0,64 x_3 - 0,59 x_3^2$ e
 572 exoglicanase $Y_3 = 4,60 + 0,25 x_1 - 0,51 x_1^2 + 0,78 x_2 - 0,36 x_2^2 + 0,41 x_3 - 0,47 x_3^2$.

573

574

575 **AGRADECIMENTOS:** Os autores agradecem a UFT, REDE BIONORTE, LAPEQ e
 576 LAMBIO.

577

578

579 REFERÊNCIAS CITADAS

580

581 Szczodrak, J., e Fiedurek, J. (1996). Technology for conversion of lignocellulosic
 582 biomass to ethanol. *Biomass and Bioenergy*. 10(5/6), 367-375.

583 Assares, R., Zahiri, H. S. Noghabi, K. A., Aminzadeh, S., e Khaniki, G. B. (2012).
 584 Characterization of the newly isolated *Geobacillus* sp. T1, the efficient cellulase-
 585 producer on untreated barley and wheat straws. *Bioresource Technology*. 120,
 586 99-105.

587 Assumpção, S. M. N., Pontes, L. A. M., Carvalho, L. S., Campos, L. M. A., De
 588 Andrade, J. C. F., e Da Silva, E. G. (2016). Pré-Tratamento Combinado
 589 H₂SO₄/H₂O₂/NaOH para Obtenção das Frações Lignocelulósicas do Bagaço da
 590 Cana-de-Açúcar. *Revista Virtual de Química*. 8(3), 803-822.

591 Bazafkan, H., Tisch, D., e Schmoll, M. (2014). Regulation of glycoside hydrolase
 592 expression in *Trichoderma*. In: Gupta VK, Schmoll M, Herrera-Estrella A,
 593 Upadhyay R, Druzhinina I, Tuohy MG. *Biotechnology and Biology of*
 594 *Trichoderma*, Elsevier. pp 291-308.

- 595 Chandel, A. K., Da Silva, S. S., Carvalho, W., e Singh, O. V. (2012). Sugarcane
596 bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products *J. Chem.*
597 *Technol. Biotechnol.* 87(1), 11-20.
- 598 Companhia Nacional de Abastecimento. (2018). Acompanhamento da safra
599 brasileira de cana-de-açúcar. SAFRA 2018/1: terceiro levantamento. Brasília:
600 Conab, 5(3), 1-71.
- 601 Cunha, F. M., Bacchin, A. L. G., Horta, A. C. L., Zangilami, T. C., Badino, A. C., e
602 Farinas, C. S. (2012). Indirect method for quantification of cellular biomass in a
603 solids containing medium used as pre-culture for cellulase production.
604 *Biotechnology and Bioprocess Engineering.* 17, 100-108.
- 605 Cunha, F. M., Vasconcellos, V. M., Florencio, C., Badino, A. C., e Farinas, C. S.
606 (2017). On-site production of enzymatic cocktails using a non-conventional
607 fermentation method with agro-industrial residues as renewable feedstocks.
608 *Waste and Biomass Valorization.* 8(2), 517-526.
- 609 Deswal, D., Khasa, Y. P., e Kuhad, R. C. (2011). Optimization of cellulose production
610 by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK 2010 under solid state fermentation.
611 *Bioresource Technology.* 102 (6065-6072).
- 612 El –Nahrawy, S. M., Metwally, El-Kodoos, Y. R., El-Sayed, B., Shabana, S. A., e El-
613 Refai, I. M. (2017). Optimization of Culture Conditions for Production of Cellulase
614 by *Aspergillus tubingensis* KY615746 . *Env. Biodiv.* 1(177- 189).
- 615 Florencio, C., Badino, A. C., e Farinas, C. S. (2017). Desafios relacionados à
616 produção e aplicação das enzimas celulolíticas na hidrólise da biomassa
617 lignocelulósica. *Quim. Nova.* 40(9), 1082-1093.
- 618 Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.* 59(2),
619 257-268.
- 620 Goyal, V., Mittal, A., Bhuwal, A. K., Singh, G., Yadav, A., e Aggarwal, N. K. (2014)
621 Parametric optimization of cultural conditions for carboxymethyl cellulase
622 production using pretreated rice straw by *Bacillus* sp. 313SI under stationary and
623 shaking conditions. *Biotechnol Res Int.* 1–7.
- 624 Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., e Chauhan, B. (2003).
625 Microbial α -amylases. A Biotechnological Perspective. *Process Biochem.*,
626 38(11),1599-1616.
- 627 Hansen, G. H., Lübeck, M., Frisvad, J. C., Lübeck, P. S., e Andersen, B. (2015).
628 Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state
629 and submerged fermentation. *Process Biochemistry.* 50(9), 1327-1341.
- 630 Hu, Y., Du, C., Pensupa, N., e Lin, C. S. K. (2018) Optimisation of fungal cellulase
631 production from textile waste using experimental design. *Process Saf Environ.*
632 118:133–142.
- 633 Isaac, G. S., e Abu-Tahon M, A. (2015). Enhanced alkaline cellulases production by
634 the thermohalophilic *Aspergillus terreus* AUMC 10138 mutated by physical and
635 chemical mutagens using corn stover as substrate. *Braz. J. Microbiol.* 46(4).
- 636 Jadhav, A. R., Chitanand, M. P., e Shete, H. G. (2013). Study on the Use of
637 Agricultural Wastes for Cellulase (2013). Production by Using *Aspergillus Niger*
638 *Journal of Pharmacy and Biological Sciences.* 6(4), 17-20.
- 639 Johnson, E. (2016). Integrated enzyme production lowers the cost of cellulosic
640 ethanol. *Biofuels, Bioprod. Biorefin.* 10, 164-174.
- 641 Mandels, M., e Weber, J. (1969). The production of cellulases. *Advances in*
642 *Chemistry Series.* 95, 391-414.
- 643 Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of
644 reducing sugar. *Analytical Chemistry.* 31, 426-428.

- 645 Moiceanu, G., Paraschiv, G., Voicu, G., Dinca, M., Negoita, O., Chitoiu, M., e Tudor,
646 P. (2019). Energy consumption at size reduction of lignocellulose biomass for
647 bioenergy. *Sustainability*, 11, 2477.
- 648 Montgomery, D. C. *Design and Analysis of Experiments*. 8th. Ed. – New York, USA:
649 John Wiley & Sons, 2013.
- 650 Pachauri, S. B., Sullia, S. B., e Desmukh. (2016). Statistical optimization for
651 enhanced production of cellulose from sugarcane bagasse using response
652 surface methodology. *Revista de Pesquisa Científica e Industrial*. 75:181-187.
- 653 Pandey, A. (2003). Solid State Fermentation. *Biochemical Engineering Journal*.
654 .13:81-84.
- 655 Plackett, R. L., e Burman, J. P. (1946). The design of optimum multifactorial
656 experiments. *Biometrika*. 33, 305-325.
- 657 Pedria, Z. C., Lozanob, L. M. S., Hermannnc, K. L., Helmd, C. V., Peraltae, R. M., e
658 Tavaresf, L. B. B. (2015). Influence of nitrogen sources on the enzymatic activity
659 and grown by *Lentinula edodes* in biomass *Eucalyptus benthamii*. *Braz. J. Biol.*
660 75(4): 940-94.
- 661 Premalatha, N., Gopal, N. O., Jose, P. A., Anandham, R., e Kwon, S. W. (2015)
662 Optimization of cellulase production by *Enhydrobacter* sp. ACCA2 and its
663 application in biomass saccharification. *Front Microbiol*. 6: 1046.
- 664 Protimiza. (2014) *Protimiza experimental design*. Campinas: PROTIMIZA, versão 1.
- 665 Rabelo, S. C., Andrade, R. R., Maciel Filho, R., e Costa, A. C. (2014). Alkaline
666 hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of
667 sugarcane bagasse to etanol. *Fuel*. 4, 349-357.
- 668 Rodríguez-Zúñiga, U. F., Farinas, C. S., Bertucci Neto, V., Couri, S., Crestana, S.
669 (2011). Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado
670 sólido. *Pesq. Agropec. Bras*.4(8): .912-919.
- 671 Rosa, T. M. F., Marinho, B. M., e Benassi, V. M. Produção de celulasas e formação
672 de açucares fermentescíveis pela degradação do bagaço de cana-de-açúcar.
673 *Ciência & Tecnologia*. 9(1):38-43.
- 674 Sales, M. R., De Moura, R. B., Porto, T. S., De Macedo, G. R., e Porto, A. L. F.
675 (2010). Variáveis que influenciam a produção de celulasas e xilanase por
676 espécies de *Aspergillus*. *Pesq. Agropec. Bras*. 45(11):1290-1296.
- 678 Singh, K., Richa, K., Bose, H., Karthik, L., Kumar, G., e Rao. K. V. B. (2014)
679 Statistical media optimization and cellulase production from marine *Bacillus*
VITRKBH 3. *Biotech*. 4(6): 591–598.
- 680 Tani, S., Kawaguchi, T., e Kobayashi T. (2014). Complex regulation of hydrolytic
681 enzyme genes for cellulosic biomass degradation in filamentous fungi. *Appl*
682 *Microbiol Biotechnol*. 98:4829–4837.
- 683 Tambe Bechem, E. E. (2012). Enhanced alkaline cellulases production by the
684 thermohalophilic *Aspergillus terreus* AUMC 10138 mutated by physical and
685 chemical mutagens using corn stover as substrato. *Int. J. Biol. Chem. Sci*. 6(3):
686 1192-1201.
- 687 Trombeta, N. C., e Caixeta Filho, J. V. (2017). Potencial e disponibilidade de
688 biomassa de cana-de-açúcar na Região Centro-Sul do Brasil: indicadores
689 agroindustriais. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, 55(3), 479-496.
- 690 Única. União da Indústria de Cana de açúcar. (2012) *Conquistas do setor*
691 *sucroenergético na matriz energética brasileira. A sustentabilidade no setor*
692 *sucroenergético brasileiro*, 2012.
- 693 Vasconcelos, V. M., Tardioli, P. W., Giordano, R. L. C., e Farina, C. S. (2015).
694 Production efficiency versus thermostability of (hemi)cellulolytic enzymatic

- 695 cocktails from different cultivation systems. *Process Biochemistry*, 50(11), 1701-
696 1709.
- 697 Yang, M., Zhang, A., Liu, B., Li, W., e Xing, J. (2011). Improvement of cellulose
698 conversion caused by the protection of tween-80 on the adsorbed cellulose.
699 *Biochemical Engineering Journal*. 56(3):125-129.
- 700 Zahid Anwar, Z., Gulfraz, M., e Irshad, M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic
701 biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of*
702 *Radiation Research and Applied Sciences*. 7(2), 163-173.

CAPITULO IV**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO ENZIMÁTICO
BRUTO DE *Paraphaeosphaeria arecacearum* E APLICAÇÃO
NA SACARIFICAÇÃO LIGNOCELULÓSICA**

5 Caracterização parcial do extrato enzimático bruto de *Paraphaeosphaeria arecacearum* e aplicação na sacarificação lignocelulósica

Áurea Welter^{a,*}, Emerson Adriano Guarda^a, Patrícia Martins Guarda^a, Jéssica Barros Aguiar Silva^b

Enzimas quando utilizadas em suas condições ideais de temperatura e pH, melhoram a efetividade em processos de biocatálise, como na sacarificação de materiais lignocelulósicos. No presente estudo, celulases foram produzidas por *P. araphaeosphaeria* em cultivo submerso na presença de bagaço de cana-de-açúcar e, após a caracterização bioquímica parcial do extrato enzimático bruto, este foi utilizado na hidrólise de resíduos agroindustriais pré-tratados com peróxido de hidrogênio alcalino, a fim de avaliar a produção de açúcares redutores totais fermentescíveis. A atividade ótima da exoglicanase foi em pH 5,0 e temperatura de 45 °C; para celulase total e endoglicanase foi em pH 5,5 e temperatura 50 °C. Quanto a estabilidade das celulases, os dados indicam características acidófilas (pH 4,0-6,5) e em temperatura de 30-40 °C. A produção de açúcares redutores totais a partir do BCA e da casca de arroz, após 72h de hidrólise, foi respectivamente, 60,7 mg.g⁻¹ e 37,2 mg.g⁻¹ de biomassa seca pré-tratada. Celulases de *P. arecacearum* são promissoras para a obtenção de açúcares fermentescíveis a partir da hidrólise de materiais lignocelulósicos.

Palavras-chave: Celulase fúngica; Biomassa lignocelulósica, Caracterização enzimática; Pré-tratamento; Hidrólise biomassa

Informação de contato: a: Universidade Federal do Tocantins, Campus de Palmas; Laboratório de Pesquisa em Química Ambiental e de Biocombustíveis (LAPEQ); Av. NS 15 ALCNO 14, 109 Norte; Plano Diretor Norte, Palmas- TO; CEP: 77001090.; b: Universidade Federal do Tocantins, Campus de Palmas; Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia; Av. NS 15 ALCNO 14, 109 Norte; Plano Diretor Norte, Palmas- TO; CEP: 77001090; *Autor correspondente: aureaw@mail.uft.edu.br

5.1 INTRODUÇÃO

Materiais lignocelulósicos constituem recursos energéticos alternativos que, além de fontes viáveis de bioenergia, desempenham um papel importante na redução dos riscos ambientais advindos da queima de combustíveis fósseis em regiões industrializadas do mundo (Dahunsi e Enyinnaya 2019).

A característica recalcitrante nativa da lignocelulose requer um processo de pré-tratamento, o qual promove a deslignificação, reduz o grau de cristalinidade da celulose e assim aumenta a superfície de contato de celulases. Sendo assim, ao facilitar a ligação de celulases ao substrato, aumenta a quantidade de glicose no hidrolisado passível de fermentação por leveduras, o que melhora o rendimento na produção de etanol (Kumar e Sharma 2017; Madadi *et al.* 2017).

Celulases são enzimas-chave no processo de bioconversão de material celulósico, processo cuja demanda aumentou exponencialmente, conforme recente relatório do mercado global de celulases (Jayasekara e Ratnayake 2019). Portanto, a necessidade de biocatalizadores na sacarificação de lignocelulose tem estimulado

51 a descoberta e caracterização de enzimas do complexo celulolítico (Anwar *et al.*
52 2014; Reyes-Sosa *et al.* 2017).

53 O fungo filamentoso *Trichoderma reesei* é um dos principais produtores de
54 celulasas e hemicelulasas utilizadas em escala industrial, especialmente na
55 produção de biocombustível a partir de lignocelulose. Além de celulasas clássicas,
56 *T. reesei*, produz proteínas do tipo expansina swollenina e expansina/família
57 endoglicanase-like, que não só aumentam o desempenho, mas também a
58 complexidade do coquetel enzimático (Vinzant *et al.* 2001; Verbeke *et al.* 2009;
59 Hakkinen *et al.* 2012).

60 Isoformas de celulasas frequentemente têm sobreposição ou mesmo
61 atividades redundantes que permitem ao organismo produtor se adaptar a
62 mudanças nas condições ambientais (Glass *et al.* 2013). Porém, em escala
63 comercial, a diversidade de celulasas com atividades sobrepostas pode ser
64 contraproducente, uma vez que, sob condições industriais, somente aquelas
65 enzimas cuja atividade ótima corresponde a das condições operacionais, geralmente
66 em torno de 50 °C e pH 5,0 (Tao *et al.* 2014), serão capazes de contribuir para o
67 desempenho do coquetel enzimático na hidrólise (Alcántara *et al.* 2016; Reyes-Sosa
68 *et al.* 2017).

69 Sabe-se que em meio reacional, isoformas de celulasas secretadas por
70 diversas espécies de fungos filamentosos apresentam comportamentos distintos
71 quanto a estabilidade e atividade ótima em diferentes temperaturas e pH (Okoye *et al.*
72 2013; Da Silva *et al.* 2016, Bhatia *et al.* 2018). Logo, conhecer estas
73 características se torna necessário para um melhor desempenho de extratos
74 enzimáticos celulolíticos na liberação de açúcares fermentescíveis a partir de
75 lignocelulose, e conseqüentemente maximizar a produção de biocombustíveis.

76 No presente trabalho, foi produzido por meio de fermentação submersa, o
77 extrato enzimático bruto do fungo filamentoso *Paraphaeosphaeria arecacearum*, e
78 após caracterização bioquímica parcial, este foi empregado na hidrólise do bagaço
79 de cana-de-açúcar e da casca de arroz, ambos pré-tratados com peróxido de
80 hidrogênio alcalino.

81

82

83 **5.2 EXPERIMENTAL**

84

85 **5.2.1 Microrganismo**

86 O fungo filamentoso *Paraphaeosphaeria arecacearum* (número de acesso ao
87 Genbank: MH801881) foi fornecido pela Coleção de Culturas Microbianas Carlos
88 Rosa do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia – LAMBIO, da
89 Universidade Federal do Tocantins, Campus de Palmas – TO.

90

91 **5.2.2 Pré-tratamento dos resíduos agroindustriais**

92 O bagaço de cana-de-açúcar (BCA) e casca de arroz obtidos de um produtor
93 de Palmas-TO, foram pré-tratados com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) alcalino
94 (Rabelo *et al.* 2014; Assumpção *et al.* 2016). Os materiais *in natura* foram lavados
95 em água e secados em estufa a 60°C até a estabilização da massa. Em seguida,
96 foram triturados em moinho de facas sendo que a 2g destes foram
97 acrescentados, 100 mL de solução 1% de H₂O₂, pH 11,5 (ajustado com uma solução
98 5,0 mol·L⁻¹ de NaOH). Os ensaios foram mantidos em incubadora shaker por 24h, a
99 temperatura de 25°C e agitação constante de 150 rpm e então filtrados com o auxílio
100 de bomba a vácuo. As frações sólidas remanescentes foram lavadas com água

101 destilada fervente e secadas em estufa a 60 °C até atingir peso constante. A
102 celulose, estimada segundo metodologia de Rodrigues (2010), foi de 46,8% para o
103 BCA e 37,3% para casca de arroz, após pré-tratamento.

104 105 **5.2.3 Produção de celulases por fermentação submersa**

106 A reativação do fungo foi realizada em meio Ágar Batata Dextrose (BDA) sendo
107 incubado a 28°C por sete dias. A partir deste material cultivado, foi preparada uma
108 suspensão de esporos (1×10^6 esporos/mL), sendo esta inoculada em frascos
109 Erlenmeyer com 50mL do meio contendo 5 g de BCA pré-tratado, peptona (4.0 gL^{-1}),
110 solução de sais segundo Mandels e Weber (1969), com modificações, composta por
111 KH_2PO_4 (2.0 gL^{-1}), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,3 \text{ gL}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,3 \text{ gL}^{-1}$), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($5,0$
112 gL^{-1}), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($1,6 \text{ gL}^{-1}$), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1,4 \text{ gL}^{-1}$), pH 4,0. Os frascos foram
113 mantidos em incubadora a 35°C, agitação constante de 150 rpm por 11 dias. O
114 extrato enzimático bruto foi obtido após a separação da fase líquida por meio de
115 filtração, com o auxílio de bomba a vácuo e utilizado nos ensaios de caracterização
116 bioquímica e na hidrólise de biomassa celulósica.

117 118 **5.2.4 Atividade das enzimas celulolíticas**

119 A atividade das celulases foi determinada de acordo com a metodologia
120 proposta por Ghose (1987). A atividade de celulase total (FPase) foi avaliada
121 utilizando como substrato, papel Whatman Nº 1 em forma de tiras de 1,0 x 6,0 cm
122 (aproximadamente 50 mg) ao qual foi adicionado 0,5 mL do extrato enzimático e 1,0
123 mL de tampão citrato-fosfato $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 4,8. A atividade de endoglicanase
124 (CMCase) foi estimada usando uma mistura reacional contendo 0,5 ml do extrato da
125 enzima e 0,5 ml de 2% de carboximetilcelulose (CMC) em tampão citrato $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$,
126 pH 4,8. A atividade de exoglicanase foi avaliada utilizando 1 mL do extrato da
127 enzima e 1 mL de solução 1% de celulose microcristalina em tampão citrato-fosfato
128 $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 4,8. Todos os ensaios foram realizados a 50 °C por 30 min. Os
129 açúcares redutores totais (ART) formados foram estimados pelo método do ácido
130 3,5-dinitrosalicílico (DNS), descrito por Miller (1959) e calculados de acordo com
131 uma curva padrão de glicose. Para conversão da glicose em valores de atividade
132 enzimática, foi considerada uma unidade (U) de atividade enzimática como a
133 quantidade de enzima que libera 1 μmol de açúcares redutores totais (medido como
134 glicose) a partir do substrato, por minuto da reação, sob as condições do ensaio. As
135 atividades enzimáticas foram expressas em U.g^{-1} de substrato seco ($\text{U.g}^{-1} \text{ ss}$)
136 utilizado no processo.

137 138 **5.2.5 Caracterização parcial do extrato bruto de *Paraphaeosphaeria arecacearum***

139 140 **5.2.5.1 Efeito do pH e da temperatura**

141 O pH ótimo da atividade do complexo celulolítico foi avaliado utilizando o ensaio
142 padrão (Ghose 1987) descrito anteriormente, variando somente o pH (3,0-8,0), pelo
143 uso de solução tampão ácido cítrico/fosfato de sódio (McIlvaine 1921). A
144 temperatura ótima da atividade de celulases foi avaliada na condição de pH de
145 melhor atividade enzimática (FPase e CMCase pH 5,5; exoglicanase pH 5,0),
146 incubando o meio reacional em temperatura que variou de 30 a 60 °C. Os ART
147 formados foram estimados pelo método do DNS, descrito por Miller (1959). A
148 atividade relativa foi calculada em relação a condição de ensaio de maior atividade
149 enzimática e os resultados foram expressos em porcentagem da atividade relativa.

150 Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados médios são
151 apresentados.

152

153 5.2.5.2 Estabilidade térmica e ao pH

154 A estabilidade das enzimas em diferentes condições de pH foi avaliada utilizando o
155 ensaio padrão (Ghose 1987) descrito anteriormente. Para tanto, o extrato enzimático
156 bruto foi pré-incubado em tampão McIlvaine (pH 3,0 a 8,0), na ausência de
157 substrato, a 4°C por 24h. Para avaliar a estabilidade à temperatura, o extrato
158 enzimático foi pré-incubado na ausência de substrato, em diferentes temperaturas
159 (30, 40, 50, 60°C) e em intervalos de 4, 8, 12, 16 e 24h foram realizadas coletas
160 para avaliar a atividade enzimática residual. Os ART formados foram estimados pelo
161 método do DNS, descrito por Miller (1959). Os resultados foram apresentados em
162 porcentagem de atividade residual, calculada a partir da razão entre a atividade
163 enzimática final (após o período de incubação) e atividade enzimática inicial. Os
164 experimentos foram realizados em duplicata e os resultados médios são
165 apresentados.

166

167 5.2.6 Hidrólise enzimática de resíduos agroindustriais

168 A hidrólise do BCA e da casca de arroz pré-tratados foi realizada utilizando o
169 extrato bruto de *P. arecacearum* e uma preparação de celulase comercial (Cellic®
170 CTec2, Novozymes Inc., Bagsvard, Dinamarca), seguindo o procedimento de
171 Guilherme *at al.* (2017), com modificações. Ao material pré-tratado (2g), foi
172 adicionada uma quantidade enzimática equivalente a 5 unidades de papel de filtro.g⁻¹
173 (FPU g⁻¹) de biomassa e 50mL de tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹, pH 5,5. A mistura
174 reacional foi mantida em incubadora a 50°C sob agitação constante de 150 rpm e,
175 em intervalos de tempo regulares, foram coletadas amostras para avaliar os ART
176 liberados conforme método do DNS, descrito por Miller (1959). Os experimentos
177 foram realizados em triplicata e os valores médios de ART (mg.g⁻¹ de substrato
178 seco) ± desvio padrão são apresentados.

179

180 5.2.7 Análise estatística

181 Os dados de hidrólise das biomassas foram submetidos à análise de variância
182 (ANOVA), utilizando o STATISTICA® versão 12 (StatSoft, Inc. 2014) e as médias
183 entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, com 5% de
184 probabilidade de erro ($p \leq 0,05$).

185

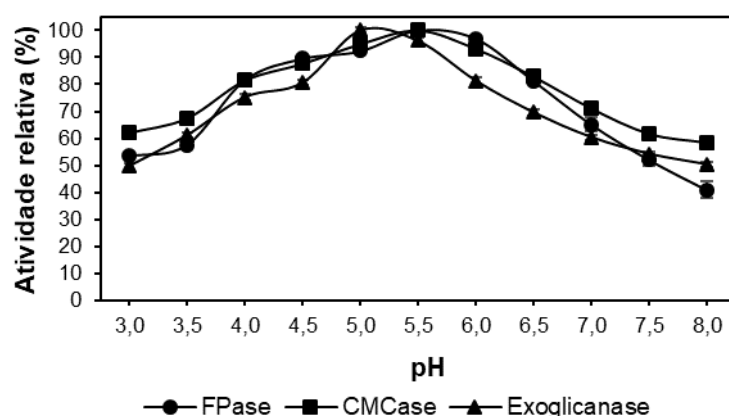
186 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

187

188 5.3.1 Caracterização bioquímica

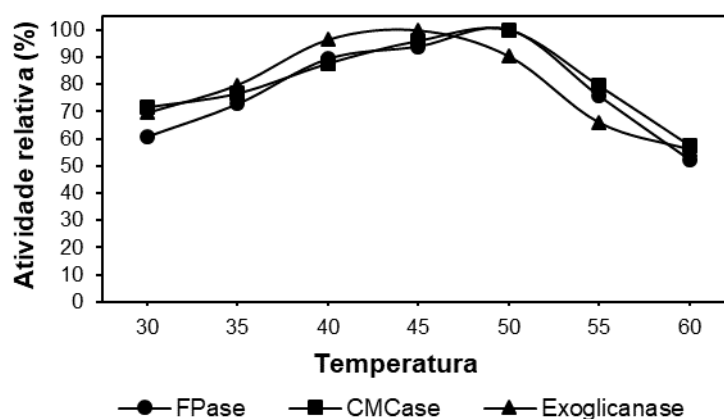
189 5.3.1.1 Efeito do pH e da temperatura na atividade das celulases

190 A influência do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática das celulases
191 produzidas por *P. arecacearum* foi estudada variando o pH de 3,0 a 8,0, e a
192 temperatura de 30 a 60 °C (Fig. 1 e 2).



193
194
195
196
197
198

Fig. 1. Influência do pH na atividade de FPase, CMCase e exoglicanase de *P. arecacearum*. Condições de ensaio: incubação em tampão Mcllvaine (pH 3.0-8.0), a 50°C, por 30 min. As atividades máximas de FPase, CMCase e exoglicanase foram, respectivamente 6,65; 7,63; 4,91 U.g⁻¹ substrato seco.



199
200
201
202
203
204

Fig. 2. Influência da temperatura na atividade de FPase, CMCase e exoglicanase de *P. arecacearum*. Condições de ensaio: incubação em tampão Mcllvaine pH 5.0 (para exoglicanase) ou pH 5.5 (para FPase e CMCase), temperatura entre 30-60°C, por 30 min. As atividades máximas de FPase, CMCase e exoglicanase foram, respectivamente 6,13; 7,67; 5,25 U.g⁻¹ substrato seco.

205
206
207
208
209
210

A atividade ótima de exoglicanase foi em pH 5,0, porém manteve mais de 80% de sua atividade máxima na faixa de pH de 4,5 a 6,0. Para FPase e CMCase, o pH ótimo de atividade foi 5,5, e na faixa de pH 4 a 6,5, permaneceram com 80% de sua atividade máxima. No entanto, há perda substancial na atividade de todas as enzimas em pH inferior a 4,0 e superior a 7, quando a atividade passa a ser menos que 70% da atividade ótima (Fig. 1).

211
212
213
214
215
216
217
218
219
220

Os resultados aqui relatados ratificam os da literatura, uma vez que mostram que a maioria das celulasas produzidas por fungos tem melhor atividade enzimática em condições ácidas. Esta característica confere as celulasas o título de enzimas acidofílicas (Zhu *et al.* 2011). Singh *et al.* (2009) verificaram que em pH 4,8, houve máxima atividade de celulasas secretadas por *Aspergillus heteromorphus*. Para celulasas produzidas por *Aspergillus fumigatus* e *Trichoderma* sp. IS-05, o pH que maximizou a atividade catalítica foi 3,0 (Andrade *et al.* 2011; Delabona *et al.* 2013). Já para *Trichoderma reesei* QM 9414 e *Rhizopus oryzae* CCT 7560, o pH ótimo foi respectivamente, 5,0 e 6,0 para celulase total e 6,0 e 5,0 para endoglicanase (Kupski *et al.* 2014).

221
222

Sabe-se que a atividade enzimática geralmente é fortemente influenciada pelo pH, pois, o sítio ativo das enzimas depende da presença de espécies iônicas

223 para manter conformações que permitem a ligação eficiente ao substrato (Farinas *et*
224 *al.* 2010). Condições de pH diferentes daquela em que a enzima apresenta atividade
225 ótima, embora possam não levar a mudanças na estrutura covalente muito estável
226 da proteína, podem produzir mudanças na conformação original e portanto,
227 comprometer a atividade catalítica (Robinson 2015).

228 A ampla faixa de pH ótimo de atividade de uma enzima a torna atrativa em
229 termos industriais, pois em um biorreator de alta capacidade é difícil a manutenção
230 de condições homogêneas em todo o reator e neste caso, uma ampla faixa de
231 valores de pH ótimo não acarreta perda de eficiência por pequenas variações de pH
232 (Lucarini *et al.* 2017).

233 Em relação a temperatura ótima de atividade de celulasas de *P. arecacearum*,
234 verificou-se que para exoglicanase esta foi de 45 °C, e para FPase e CMCase, 50
235 °C. Entre 35 e 50 °C, exoglicanase manteve mais de 70% de sua atividade ótima, o
236 que para FPase e CMCase, ocorreu entre 35 e 55° C (Fig. 2).

237 A temperatura ótima de atividade para celulasas produzidas por diferentes
238 espécies de fungos, segundo dados da literatura, é ampla. Exoglicanase de
239 *Penicillium oxalicum* demonstrou atividade ótima a 50 °C, enquanto esta foi a 45 °C
240 para CMCase (Bomtempo *et al.* 2017). Já para celulasas produzidas por
241 *Trichoderma reesei* QM 9414 e *Rhizopus oryzae* CCT 7560, a atividade ótima foi na
242 temperatura de 60°C (Kupski *et al.* 2014) e no caso de *Aspergillus flavus*, esta foi de
243 70°C (Okonkwo 2018).

244 Sabe-se que à medida que a temperatura se eleva, a taxa de movimento
245 molecular e, portanto, a taxa de reação aumenta, mas ao mesmo tempo há uma
246 inativação progressiva causada pela desnaturação da enzima (Robinson 2015).
247 Portanto, conhecer os efeitos do pH e da temperatura na atividade das celulasas de
248 *P. arecacearum* são fundamentais para se entender o comportamento enzimático e
249 assim determinar as condições ótimas de trabalho em processos industriais, como na
250 hidrólise de biomassas lignocelulósicas.

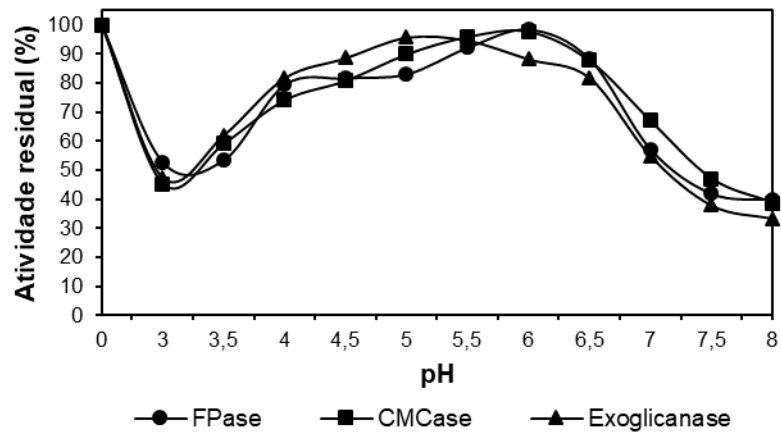
251 Considerando as condições ótimas de temperatura das celulasas de *P.*
252 *arecacearum*, o sistema ideal para a aplicação deste extrato enzimático objetivando
253 a produção de bioetanol, seria o de hidrólise e fermentação separado, já que a
254 temperatura de hidrólise geralmente empregada é de 50 °C (Faga *et al.* 2010). No
255 entanto, também poderia ser empregado na hidrólise e fermentação simultânea,
256 mas, este requer condições compatíveis para a atuação tanto das enzimas
257 responsáveis pela sacarificação como das leveduras envolvidas na fermentação, já
258 que os processos ocorrem simultaneamente. Como a condição de pH em que as
259 celulasas atuam geralmente é a mesma das leveduras, ou seja, na faixa de 4,5 a
260 5,5, a condição de pH não seria um entrave. Porém, a temperatura ótima (em torno
261 de 50 °C) de atividade das celulasas é muito superior à das leveduras (30 a 37°C)
262 empregadas na produção de etanol (Szczo drak e Fiedurek, 1996). Logo, seria
263 necessário o emprego de leveduras termotolerantes, as quais fermentam glicose em
264 temperatura superior a 40 °C, que é próxima a ótima atividade do complexo
265 celulolítico (Ballesteros *et al.* 2004).

266

267 5.3.1.2 Efeito do pH e da temperatura na estabilidade das celulasas

268

269 A estabilidade das celulasas de *P. arecacearum* submetidas por um período de
270 até 24h a diferentes faixas de pH (Fig. 3) e temperatura (Fig. 4a,b,c) é apresentada a
271 seguir.



272

273

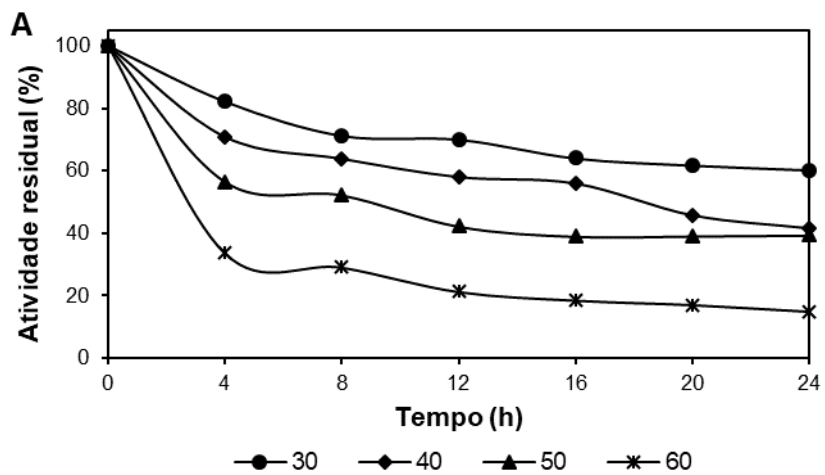
274

275

276

277

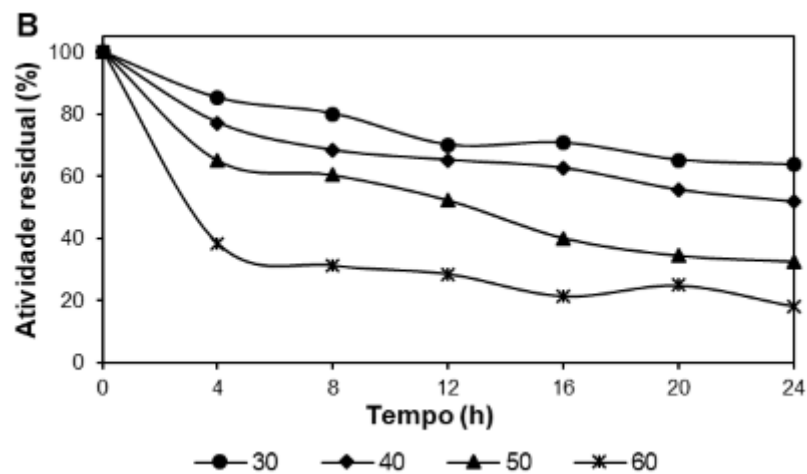
Fig. 3. Estabilidade do extrato enzimático bruto de *P. arecacearum* em diferentes valores de pH. Condições de ensaio: pré-incubação na ausência de substrato, em tampão McIlvaine (pH 3.0-8.0), a 4°C, por 24h. As atividades iniciais de FPase, CMCase e exoglicanase foram, respectivamente, 6,17; 7,53; 4,86 U.g⁻¹ substrato seco.



278

279

280



281

282

283

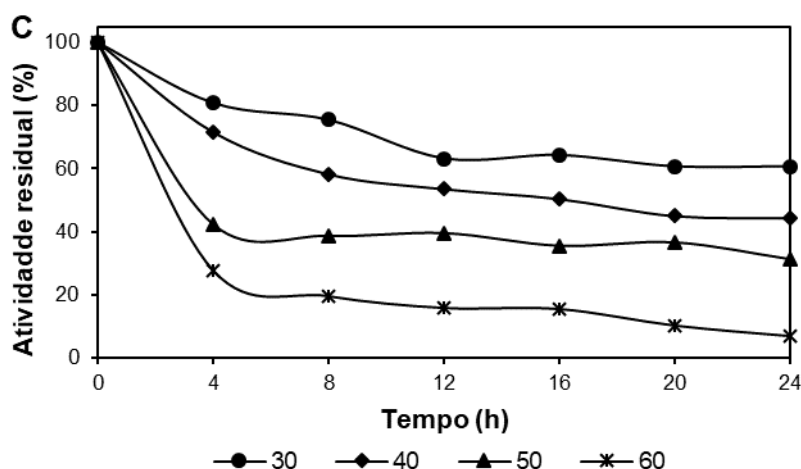


Fig. 4 Termostabilidade do extrato enzimático bruto de *P. arecacearum*. (A) Atividade residual de FPase. (B) Atividade residual de CMCse. (C) Atividade residual de exoglicanase. Condições de ensaio: pré-incubação em tampão McIlvaine pH 5.0 (para exoglicanase) ou pH 6.0 (para FPase CMCse), temperatura entre 30-60°C, por 4, 8, 12, 16, 20 ou 24h. As atividades iniciais de FPase, CMCse e exoglicanase foram, respectivamente, 6,44; 7,3; 5,16 U.g⁻¹ substrato seco.

Ao avaliar o efeito do pH na estabilidade de celulases de *P. arecacearum*., em diferentes valores de pH, verifica-se que a exoglicanase e FPase foram estáveis dentro de uma faixa de pH de 4,0-6,5 e a CMCse em pH de 4,5 a 6,5, retendo mais de 80% da atividade inicial (Fig.3).

Ao avaliar a estabilidade de celulases de *Aspergillus niger* e *Rhizopus* sp constatou-se que em pH 5 e 6, por um período de 4h, a atividade residual de CMCse e FPase de *Aspergillus niger* foi de aproximadamente 100% da atividade inicial, e em pH 4, 7 e 8, manteve atividade residual superior a 80%. Já para *Rhizopus* sp, atividade de CMCse e FPase em pH 5, após um período de 4h, foi reduzida em 10% em relação a inicial e em pH 4, 7 e 8, após 4h esta redução foi de 30% (Santos *et al.* 2016).

Celulases de *P. arecacearum* assim como as produzidas por *Aspergillus niger* e *Rhizopus* sp, se mantem estáveis em ambiente ácido. Uma vez que enzimas que apresentam estabilidade em condições ácidas possuem um grande potencial para aplicação em processos de biotecnologia realizados em condições de baixo pH (Liao *et al.*, 2015), esta característica é interessante do ponto de vista de emprego do complexo enzimático *P. arecacearum* em processos industriais.

Quanto a termostabilidade, a retenção de atividade para todas as enzimas de *P. arecacearum* avaliadas foi acima de 70%, nas temperaturas de 30 e 40 °C, por 4 h. Já na temperatura de 50°C, a atividade residual permaneceu acima de 50% nas primeiras 4 h de incubação somente para FPase e CMCse. A 60 °C, após 4 h, a retenção de atividade do complexo celulolítico foi inferior a 40%. Ao término de 24 h de incubação, a atividade residual foi superior a 60% apenas a 30°C.

Na avaliação da termostabilidade de FPase e da CMCse de *Aspergillus niger* e *Rhizopus* sp s, verificou-se que a retenção de atividade destas a 60°C, por 4 h, foi de 100% para *Rhizopus* sp e 80% para *Aspergillus niger*. Já na temperatura de 80 °C, após 4 h de incubação, FPase e CMCse de *Rhizopus* sp apresentaram atividade residual superior a, respectivamente, 70 e 80% (Santos *et al.* 2016). Logo,

319 *Aspergillus niger* em relação a *Rhizopus* sp, mostrou maior estabilidade em pHs
320 extremos, porém menos estável em temperatura superior a 60 °C.

321 NG *et al.* (2010), ao avaliarem a estabilidade térmica de β -glicosidase
322 purificada obtida de *Penicillium citrinum* YS40-5, na temperatura de 58 °C,
323 verificaram que a atividade desta foi reduzida em 50% após duas horas de reação.
324 Já a FPase de *Aspergillus flavus* reteve 50% e 80% de sua atividade inicial, após
325 exposição por 1 h respectivamente, a 100°C e 80°C (Okonkwo 2018).

326 A partir dos dados do presente estudo conclui-se que celulases produzidas por
327 *P. arecacearum* possuem menor estabilidade em temperaturas elevadas. Ainda, que
328 o pH e a temperatura no qual a desnaturação se torna importante, varia de uma
329 enzima celulolítica para outra e, difere para uma mesma enzima, entre
330 microrganismos distintos.

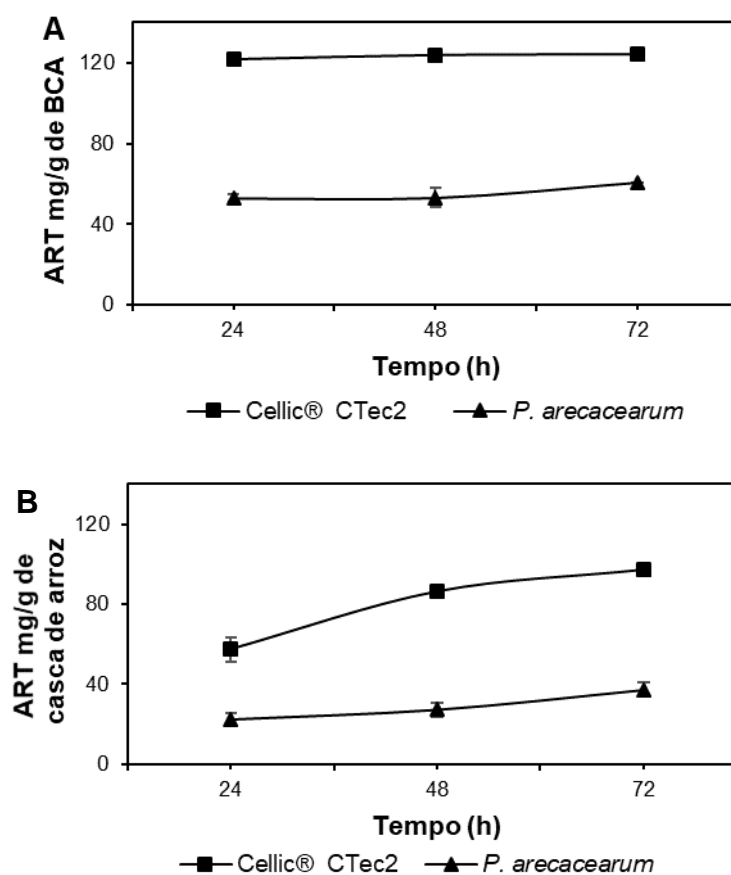
331

332 5.3.2 Sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais

333

334 O extrato enzimático bruto *P. arecacearum* e uma preparação de enzimas
335 comercial foram utilizados na sacarificação do BCA e casca de arroz pré-tratados
336 com H₂O₂ alcalino (Figura 5).

337



338

339

340 **Fig. 5** Produção de ART na hidrólise de (A) BCA e (B) casca de arroz pré-tratados com peróxido de
341 hidrogênio alcalino utilizando extrato bruto de *P. arecacearum* e preparação enzimática comercial.

342

343 Transcorrido o período de 72h de hidrólise na presença do extrato bruto *P.*
344 *arecacearum*, o rendimento de ART para BCA e casca de arroz foi, respectivamente,
345 60,7 mg.g⁻¹ e 37,2 mg.g⁻¹ de substrato seco pré-tratado, valores estes
346 significativamente diferentes ($p < 0,05$) (Fig. 5).

347 Na hidrólise de BCA empregando 10 FPU g⁻¹ de extrato bruto de *Penicillium*
348 *echinulatum*, foi verificada uma produção de 150 mg.g⁻¹ de ART após 72h de
349 reação (Pereira *et al.* 2013). Ao utilizar o extrato bruto de *Penicillium oxalicum* ou a
350 mesma enzima comercial do presente estudo, ambos na concentração de 10 FPU g⁻¹
351 ¹, a produção de ART a partir de BCA, após 72 h de hidrólise, foi de 168,4 mg.g⁻¹
352 quando do emprego do extrato bruto, o que representou uma eficiência em torno de
353 55% menor em relação a enzima comercial (Bomtempo *et al.* 2017). A menor
354 quantidade de ART produzidos a partir da hidrólise do BCA, no presente estudo, se
355 comparado aos acima mencionados pode ser atribuído a uma eficiência catalítica
356 inferior do extrato bruto *P. arecacearum* e menor concentração (5 FPU g⁻¹ de
357 substrato) utilizada.

358 A partir da hidrólise a casca de arroz pré-tratada (hidróxido de amônio 15%)
359 utilizando o extrato bruto de *Aspergillus aculeatus* Iizuka FR60, foi verificada uma
360 produção de ART de 33 mg.g⁻¹ de substrato seco (Boonmee 2012), quantidade
361 próxima a encontrada no presente estudo. A casca de arroz é uma das biomassas,
362 que contém alta quantidade de lignina (26 a 31%) além da presença de sílica (15 a
363 24%), o que é um diferencial em relação as demais biomassas (Lau *et al.* 2015). Um
364 estudo avaliou a remoção da sílica da casca de arroz quando foram utilizados
365 diferentes tratamentos alcalinos, mostrando que a redução desta no material
366 melhorou o rendimento de glicose e conseqüentemente de etanol mais que a
367 deslignificação (Khaleghian *et al.* 2017). Logo, a menor produção de ART a partir da
368 casca de arroz se comparado ao BCA (Fig. 5), pode ter sido influenciada pelo efeito
369 protetor da camada de sílica, o que refletiu em menor acesso das celulasas para
370 hidrólise da fibra celulósica.

371 A heterogeneidade e complexidade das biomassas lignocelulósicas requer
372 múltiplas atividades enzimáticas no processo de bioconversão. Portanto, para que
373 um sistema de enzimas seja eficiente, este deve conter atividades balanceadas das
374 celulasas (endoglicanase, exoglicanases e β-glicosidade) e outras enzimas, como
375 por exemplo, a xilanase (Liu *et al.* 2015). A interação destas aumenta o desempenho
376 do processo de hidrólise enzimática, já que atuam em sinergia promovendo a
377 bioconversão do material lignocelulósico a açúcares fermentescíveis (Brijwani *et al.*
378 2010; Alvira *et al.* 2011; Chandel *et al.* 2012).

379 A preparação de enzimas comercial utilizada no presente estudo, assim como
380 outras usadas em aplicações industriais, produzidas por fungos filamentosos como
381 *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. e *Trichoderma reesei*, possui
382 quantidades equilibradas de celulasas, garantindo assim máxima efetividade
383 biocatalítica (Robak e Balcerek 2018). Em vista disso, a celulase comercial viabilizou
384 uma maior liberação de ART, a partir do BCA e casca de arroz, se comparado com o
385 extrato bruto de *P. arecacearum*. Além disso, as condições utilizadas no processo de
386 hidrólise, ou seja, 50 °C, pH 5,5 e tempo reacional de 72 horas, são as ótimas de
387 trabalho preconizadas pelo fabricante (Lucarini *et al.* 2017).

388 No presente estudo, não foi avaliada a atividade de β-glicosidase do extrato
389 bruto. No entanto, o elevado teor desta melhora o desempenho na hidrólise de
390 substratos lignocelulósicos pré-tratados, pois possibilita a rápida conversão dos
391 oligossacarídeos formados a partir da celulose, tais como celobiose, em glicose,
392 minimizando a inibição da exoglicanase pelo acúmulo de celobiose (Sun e Cheng
393 2002; Lucarini *et al.* 2017). Logo, uma reduzida atividade de β-glicosidase, pode ter
394 contribuído para a menor eficiência do extrato de *P. arecacearum* na sacarificação
395 das biomassas, se comparado a preparação comercial.

396 A atividade ótima de FPase e CMCase do extrato bruto de *P. arecacearum* foi
397 verificada na temperatura de 50 °C e pH 5,5 (Fig. 1 e 2) e no caso da exoglicanase,
398 esta foi a 45°C e pH 5,0 (Fig.1 e 2). As condições de ensaio utilizadas na hidrólise
399 foram estabelecidas com base no pH (5,5) e temperatura (50 °C) em que houve
400 melhor atividade da FPase, pelo fato do substrato (papel filtro) usado na avaliação
401 desta, apresentar em sua constituição, celulose tanto amorfa como cristalina, as
402 quais são hidrolisadas por endoglicanase e exoglicanase, respectivamente. Dessa
403 forma, ao quantificar os ART liberados a partir da atividade enzimática de FPase, foi
404 possível avaliar a atividade sinérgica de celulases do extrato bruto de *P.*
405 *arecacearum* sobre BCA e casca de arroz pré-tratados, demonstrando que após um
406 período de 72 h hidrólise, a eficiência do extrato bruto foi, respectivamente, 51% e
407 61,7% menor que a da preparação comercial, sendo esta diferença significativa
408 ($p < 0,05$).

409 O BCA pré-tratado com H₂O₂ alcalino apresenta de 39,9% a 71,2% de
410 celulose (Rabelo *et al.* 2014; De Aguiar *et al.* 2017) e a casca de arroz de 35% a
411 53,2% (Reyes *et al.* 1998; Yu *et al.* 2009), variação que pode ser justificada pela
412 concentração de H₂O₂ utilizada e tipo de técnica empregada na quantificação
413 (Santos *et al.* 2014; Assumpção *et al.* 2016). No presente estudo, após pré-
414 tratamento com H₂O₂ alcalino, o teor de celulose no BCA foi 46,8% e na casca de
415 arroz 37,3% (dados não mostrados), valores concordantes com os relatados na
416 literatura. Sendo assim, a maior disponibilidade de celulose para sacarificação no
417 BCA em relação a casca de arroz, posterior ao pré-tratamento, pode ter contribuído
418 na produção de ART (Fig. 5).

419 A liberação de ART a partir da hidrólise do BCA aumentou rapidamente na
420 fase inicial (0 a 24 h), independente se na presença de complexo de enzimas
421 comercial ou extrato bruto de *P. arecacearum*, o que não foi verificado para a casca
422 de arroz, nas mesmas condições, uma vez que houve aumento gradativo. No caso
423 do BCA, a liberação de ART variou de 121,7 mg.g⁻¹ (24 h) a 124,1 mg.g⁻¹ (72h) na
424 presença de enzima comercial e ao utilizar o extrato bruto, esta liberação foi de 53
425 mg.g⁻¹ (24 h) a 60,7 mg.g⁻¹ (72h), sendo em ambas condições e tempos
426 significativamente diferentes ($p < 0,05$). Para a casca de arroz, também se verificou
427 diferença ($p < 0,05$) na produção de ART, sendo que esta variou de 57,3 mg.g⁻¹ (24 h)
428 a 97,2 mg.g⁻¹ (72h) para a enzima comercial e de 22,3 mg.g⁻¹ (24 h) a 37,2 mg.g⁻¹
429 (72h), quando utilizado o extrato bruto *P. arecacearum*.

430 A maior deslignificação e uma cristalinidade inferior do BCA, em relação a
431 casca de arroz, pode ter facilitado o acesso das celulases à fibra, acelerando a
432 sacarificação. O comportamento de enzimas celulolíticas pode diferir devido ao tipo
433 de substrato, o que pode ser atribuído as características estruturais da lignocelulose
434 e ao mecanismo e interação das enzimas celulolíticas (Eibinger *et al.* 2014).

435 Com relação as características da lignocelulose, sabe-se que a arquitetura
436 fibrilar altamente ordenada, constitui uma das maiores barreiras enfrentadas pelas
437 enzimas durante a sacarificação (Yu *et al.* 2015; Guilherme *et al.* 2017). Logo, uma
438 biomassa completamente amorfa pode ser hidrolisada muito mais rapidamente do
439 que uma parcialmente cristalina, uma vez que aumenta a área de superfície para o
440 ataque enzimático (Zhang e Lynd 2004; Branco *et al.* 2019). Sendo assim, o grau
441 inicial de cristalinidade da celulose desempenha um papel importante e determinante
442 na velocidade da reação de hidrólise.

443 Em referência a fatores relacionados ao mecanismo e interação de celulases,
444 estudos mostram que a presença de lignina, embora em pequena quantidade, atua
445 como uma barreira física, restringindo o acesso de celulases à fibra além de ser

capaz de adsorver enzimas. Além disso, a hemicelulose e pectina atuam limitando a ação enzimática ou reduzindo a atividade da água local (Eibinger *et al.* 2014).

5.4 CONCLUSÕES

1. O complexo enzimático de *P. arecacearum* apresentou atividade ótima em ampla faixa de pH (4,5 a 6,5) e temperatura (40 a 55 °C), o que possibilita aplicação industrial em processos que requerem elevada temperatura e variação de pH.

2. O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino pode ter promovido maior acessibilidade das celulases do extrato de *P. arecacearum*, a fibra de celulose do BCA se comparado a casca de arroz, o que contribuiu no incremento de açúcares redutores totais.

3. O extrato bruto de *P. arecacearum* se mostrou mais efetivo na hidrólise do BCA em comparação a casca de arroz, sendo a liberação de açúcares redutores respectivamente, 60,7 mg.g⁻¹ e 37,2 mg.g⁻¹. Logo, este pode ser aplicado na sacarificação de resíduos agroindustriais objetivando a produção de etanol.

AGRADECIMENTOS: Os autores agradecem a UFT, REDE BIONORTE, LAPEQ e LAMBIO.

REFERÊNCIAS CITADAS

- Alcántara, M. Á. B., Dobruchowska, J., Azadi, P., García, B. D., Molina-Heredia, F.P., e Reyes-Sosa, F. M. (2016). Recalcitrant carbohydrates after enzymatic hydrolysis of pretreated lignocellulosic biomass. *Biotechnol Biofuels*.16(9), 1–10.
- Alvira, P., Negro, M. J., e Ballesteros, M. (2011). Effect of endoxylanase and α -l-arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw. *Bioresour Technol*. 102(6), 4552-8.
- Andrade, J. P., Bispo, A. S. R., Marbach, P. A. S., e Nascimento, R. P. (2011) Production and partial characterization of cellulases from *Trichoderma* sp. IS-05 isolated from sandy coastal plains of Northeast Brazil. *Enzyme Research*. article ID-167248. 1-7.
- Anwar, Z., Gulfranz, M., e Irshad, M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 7, 163-173.
- Assumpção, S. M. N., Pontes, L. A. M., Carvalho, L. S., Campos, L. M. A., De Andrade, J. C. F., e Da Silva, E. G. (2016). Pré-Tratamento Combinado H₂SO₄/H₂O₂/NaOH para Obtenção das Frações Lignocelulósicas do Bagaço da Cana-de-Açúcar. *Revista Virtual de Química*. 8(3), 803-822.
- Ballesteros, M., Oliva, J. M., Negro, M. J., Manzanares, P., e Ballesteros, I. (2004). Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry*. 39(12),1843-1848.
- Bhatia, S., Kaur, B., Phutela, U. G., e Kumar, P. (2018). Kinetic and thermodynamic behavior of partially purified cellobiase from *Humicola fuscoatra* MTCC 1409. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. 55, 163-172.
- Bomtempo, F. V. S., Santin, F. M. M. S., Pimenta, R. S., Oliveira, D. P., e Guarda, E. A. (2017). Production of cellulases by *Penicillium oxalicum* through solid state

- 498 fermentation using agroindustrial substrates. *Acta Scientiarum. Biological*
499 *Sciences*; 39(3), 321-329.
- 500 Boonmee, A. (2012). Hydrolysis of variou thai agricultural biomasses using the crude
501 enzyme from *Aspergillus aculeatus* lizuka FR60 isolated from soil. *Brazilian*
502 *Journal of Microbiology*.43(2), 456-466.
- 503 Branco, R. H. R., Serafim, L. S., e Xavier, A. M. R. B. (2019). Second generation
504 bioethanol production: on the use of pulp and paper industry wastes as
505 feedstock. *Fermentation*. 5(4), 2-30.
- 506 Brijwani, K., Rigdon, A., e Vadlani, V. P. (2010). Fungal laccases: production,
507 function, and applications in food processing. *Enzyme Resource*. 10, 1-10.
- 508 Chandel, A. K., Chandrasekhar, G., Silva, M. B., e da Silva, S. S. (2011). The realm
509 of cellulases in biorefinery development. *Critical Reviews in Biotechnology*. 31, 1-16.
- 510 Da Silva, V. C. T., Coto, A. L. S., Souza, R. C., Neves, M. B. S., Gomes, E., e
511 Bonilla-Rodriguez, G. O. (2016). Effect of pH, temperature, and chemicals on the
512 endoglucanases and β -glucosidases from the thermophilic fungus
513 *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 obtained by solid-state and submerged
514 cultivation. *Biochemistry Research International*. 2016, Article ID 9781216, 9.
- 515 Dahunsi, O. S., e Enyinnaya, M. (2019). The bioenergy potentials of lignocelluloses.
516 In: Energy conversion - current technologies and future trends. *IntechOpen*. 93-
517 104.
- 518 De Aguiar, C. A., and Hasan, S. D. M., and De Lucena, S. L. (2017). Efeito do pré-
519 tratamento alcalino e do alcalino-oxidativo na hidrólise enzimática de resíduos
520 lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas por *Aspergillus niger*. *Revista*
521 *Brasileira de Produtos Agroindustriais*. 19(2), 123-129.
- 522 Delabona, P. S., Pirota, R. D. P. B., Codima, C. A., Tremacoldi, C. R., Rodrigues, A.
523 e Farinas, C. S. (2013). Effect of initial moisture content on two Amazon
524 rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-
525 degrading enzymes production and characterization. *Industrial Crops and*
526 *Products*. 42, 236-242.
- 527 Eibinger, M., Ganner, T., Bubner, P., Rošker, S., Kracher, D., Haltrich, D., Ludwig,
528 R., Plank, H., Nidetzky, B. (2014). Cellulose surface degradation by a lytic
529 polysaccharide monooxygenase and its effect on cellulase hydrolytic efficiency. *J*
530 *Biol Chem*. 289(52), 35929-38.
- 531 Faga, B. A., Wilkins, M. R., e Banat, I. M. (2010). Ethanol production through
532 simultaneous saccharification and fermentation of switchgrass using
533 *Saccharomyces cerevisiae* D5A and thermotolerant *Kluyveromyces marxianus*
534 IMB strains. *Bioresource Technology*. 101, 2273-2279.
- 535 Farinas, C.S., Loyo, M. M., Baraldo Junior, A., Tardioli, P. W., Bertucci Neto, B., e
536 Couri, S., (2010). Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the
537 synergistic effect of pH and temperature. *N. Biotechnol*. 27(6), 810-815.
- 538 Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem*. 59(2),
539 257-268.
- 540 Glass, N. L., Schmoll, M., Cate, J. H. D., e Coradetti, S. (2013). Plant cell wall
541 deconstruction by ascomycete fungi. *Annu Rev Microbiol*. 67, 477-98.
- 542 Guilherme, A. de A., Dantas, P. V. F., Soares, J. C. J., Santos, E. S. dos, Fernandes,
543 F. A. N., e Macedo, G. R. de. (2017). Pretreatments and enzymatic hydrolysis of
544 sugarcane bagasse aiming at the enhancement of the yield of glucose and
545 xylose. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 34(04), 937-947.

- 546 Hakkinen, M., Arvas, M., Oja, M., Aro, N., Penttila, M., Saloheimo, M., e Pakula, T.
547 (2012). Re-annotation of the CAZy genes of *Trichoderma reesei* and transcription
548 in the presence of lignocellulosic substrates. *Microb Cell Fact.* 11,134.
- 549 Jayasekara, S., e Ratnayake, R. (2019). Microbial Cellulases: an overview and
550 applications. In: Cellulase. *IntechOpen.* 1-21.
- 551 Khaleghian, H., Molaverdi, M., e Karimi, K. (2017). Silica removal from rice Straw to
552 improve its hydrolysis and ethanol production. *Industrial & Engineering Chemistry
553 Research.* 56(35), 9793-9798.
- 554 Kumar, A. K., e Sharma, S. (2017). Recent updates on different methods of
555 pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresources and
556 Bioprocessing.* 4(7), 1-19.
- 557 Kupski, I., Pagnussatt, F. A., Buffon, J. G., e Furlong, E. B. (2014). Endoglucanase
558 and total cellulase from newly isolated *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma
559 reesei*: production, characterization, and thermal stability. *Applied Biochemistry
560 and Biotechnology.* 172(1), 458-468.
- 561 Liao, B. B., Luis, E. T., Hossain, M. M., Hart, W. E. Cencia-Lay, B. Black, J. J. To, T.
562 Q. e Aldous, L. (2015). Facile, room-temperature pre-treatment of rice husks with
563 tetrabutylphosphonium hydroxide: Enhanced enzymatic and acid hydrolysis
564 yields. *Bioresour. Technol.* 197, 252-259.
- 565 Liu, X., Ma, Y., e Zhang, M. (2015). Research advances in expansins and
566 expansionlik proteins involved in lignocellulose degradation. *Biotechnol Lett.* 37,
567 1541-51.
- 568 Lucarini, A. C.; Delquiaro, A. C. T.; Vidoca, L.C.P.T.; Braz, R.; Martins, R. M., Alves,
569 T. P. (2017). Estudo da hidrólise enzimática da palha da cana de açúcar para a
570 produção de etanol de segunda geração. *The Journal of Engineering and Exact
571 Sciences.* 03(02), 242-25.
- 572 Madadi, M., Tu, Y., e Hin, P. (2017). Pretreatment of lignocellulosic biomass based
573 on improving enzymatic hydrolysis. *Int. J. Appl. Sci. Biotechnol.* 5(1), 1-11.
- 574 Mandels, M., e Weber, J. (1969). The production of cellulases. *Advances in
575 Chemistry Series.* 95, 391-414.
- 576 Mcilvaine, T. (1921). A buffer solution for colorimetric comparison. *Journal of
577 Biological Chemistry.* 49, 183-186.
- 578 Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of
579 reducing sugar. *Analytical Chemistry.* 31, 426-428.
- 580 Okonkwo, I. F. (2018). The stability pattern of the cellulase enzyme produced by
581 *Aspergillus flavus*. *Ann Exp Mol Biol.* 1(1), 000103.
- 582 Okoye, I. G., Ezugwu, A. L., Udenwobe, D. I., Eze, S. O. O., Anyawu, C. U., e
583 Chilaka, F. C. (2013). Production and partial characterization of cellulases from
584 *Apergillus fumigatus* using two distinct parts of corn cob as carbon sources. *Nig
585 J. Biotech.* 2, 50-59.
- 586 Pereira, B. M. P., Alvarez, T. M., Delabona, P. S., Dillon, A. J. P., Squina, F. M., e
587 Pradella, J. G. C., (2013). Cellulase on-site production from sugar cane bagasse
588 using *Penicillium echinulatum*. *Bioenergy Res.* 6, 1052-062.
- 589 Rabelo, S. C., Andrade, R. R., Maciel Filho, R., e Costa, A. C. (2014). Alkaline
590 hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of
591 sugarcane bagasse to etanol. *Fuel.* 4, 349-357.
- 592 Reyes, J., Peralta-Zamora, P e Durán, N. (1998) Hidrólise enzimática de casca de
593 arroz utilizando-se celulasas. Efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos.
594 *Química Nova.* 21(2), 140-143.

- 595 Reyes-Sosa, F. M., Morales, M. L., Gómez, A. I. P., Crespo, N. V., Zamorano, L. S.,
596 Rocha-Martin, J., Molina-Heredia, F. P., e García, B. D. (2017). Management of
597 enzyme diversity in high-performance cellulolytic cocktails. *Biotechnol Biofuels*.
598 10(156), 1-10.
- 599 Robak, K., e Balcerek, M. (2018). Review of second generation bioethanol
600 production from residual biomass. *Food Technol. Biotechnol.* 56(2), 174-187.
- 601 Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications.
602 *Essays Biochem.* 59, 1-41.
- 603 Rodrigues, R. C. (2010). *Métodos de Análises Bromatológicas de Alimentos:*
604 *Métodos Físicos, Químicos e Bromatológicos.* Documentos 306, Embrapa Clima
605 Temperado, Pelotas-RS.
- 606 Santos, H., Junger, D. L., e Soares, A. B. (2014). Cascas de arroz: uma alternativa
607 promissora. *Orbital: Electron. J. Chem.* 6(4), 267-275.
- 608 Santos, T. C. D., Arbreu Filho, G., Brito, A. R. D., Pires, A. J. V., Bonomo, R. C.E., e
609 Franco, M. (2016). Production and characterization of cellulolytic enzymes by
610 *Aspergillus niger* and *Rhizopus*. *Revista Caatinga.* 29(1), 222-233.
- 611 Sinng, R., Kumar, R., Bishnol, K., e Bisshnol, N. R. (2009). Optimization of
612 synergistic parameters for thermostable cellulase activity of *Aspergillus*
613 *heteromorphus* using response surface methodology. *Biochemical Engineering*
614 *Journal.* 48, 28-35.
- 615 StatSoft, Inc. (2014). STATISTICA (data analysis software system), version 12.
- 616 Sun, Y., e Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol
617 production: a review. *Bioresource Technology.* 83, 1-11.
- 618 Szczodrak, J., e Fiedurek, J. (1996). Technology for conversion of lignocellulosic
619 biomass to ethanol. *Biomass and Bioenergy.* 10(5/6), 367-375.
- 620 Tao, L., Schell, D., Davis, R., Tan, E., Elander, R., e Bratis, A. (2014). NREL 2012
621 achievement of ethanol cost targets: biochemical ethanol fermentation via dilute-
622 acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. NREL/TP-5100-
623 61563. Golden CO: *National Renewable Energy Laboratory.*
- 624 Verbeke, J., Coutinho, P., Mathis, H., Quenot, A., Record, E., Asther, M., e Heiss-
625 Blanquet, S. (2009). Transcriptional profiling of cellulase and expansin-related
626 genes in a hypercellulolytic *Trichoderma reesei*. *Biotechnol Lett.* 31, 1399-1405.
- 627 Vinzant, T. B., Adney, W. S., Decker, S. R., Baker, J. O., Kinter, M. T., Sherman, N.
628 E., Fox, J. W., e Himmel, M. E. (2001). Fingerprinting *Trichoderma reesei*
629 hydrolases in a commercial cellulase preparation. *Appl Biochem Biotechnol.*
630 91(3), 99-107.
- 631 Yu, H., You, Y., Le, F., Liu, Z., Zhang, W., e Jiang, J. (2015). Comparative study of
632 alkaline hydrogen peroxide and organosolv pretreatments of sugarcane bagasse
633 to improve the overall sugar yield. *Bioresource Technology.* 187, 161-166.
- 634 Yu, J., Zhang, J., He, J., Liu, Z., e Yu, Z. (2009). Combinations of mild physical or
635 chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of
636 rice hull. *Bioresource Technology.* 100, 903-908.
- 637 Zhang, Y. H., e Lynd, L. R. (2004). Toward an aggregated understanding of
638 enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems.
639 *Biotechnology and Bioengineering,* 88(7), 797-824.
- 640 Zhu, C., Xu, Z., e Song, R. (2011). The endoglucanase from *Bacillus subtilis* BEC-1
641 bears halo-tolerant, acidophilic and dithiothreitol-stimulated enzyme activity.
642 *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 27, 2863-2871.
- 643

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A carboximetilcelulose, uma fonte de carbono complexa, mostrou ser um bom substrato para fins de triagem de fungos filamentos produtores de celulases por meio de fermentação submersa.

Os 27 isolados estudados produziram celulases, porém oito se destacaram com maior atividade de celulase total, o que sugere uma melhor ação sinérgica de exo e endoglicanases bem como β - glicosidades na degradação de celulase.

Dentre os fungos identificados por sequenciamento da região ITS do rDNA, *Aspergillus sydowii*, *Cladosporium* sp., *Penicillium simplicissimum* e *Penicillium citrinum* já foram citados como produtores de celulases na literatura. No entanto, não havia estudos, até a presente data, acerca da produção de celulases por *Paraphaeosphaeria arecacearum*, o que justifica a escolha deste isolado para a continuidade do trabalho.

O planejamento Placket-Burman foi uma ferramenta útil para identificar as variáveis independentes que exerciam influência na produção de celulases e a partir deste, foi possível aplicar o delineamento composto central rotacional visando otimizar as variáveis. O modelo matemático gerado a partir deste estudo, permitiu correlacionar as variáveis independentes estudadas com a resposta, ou seja, produção de celulase total, endoglicanase e exoglicanase, e assim predizer a produção destas por *Paraphaeosphaeria arecacearum*, nas condições adotadas no processo.

Como resultado final do processo, após obtenção do extrato enzimático bruto produzido por *Paraphaeosphaeria arecacearum*, nas condições de cultivo otimizadas, foi demonstrada a aplicabilidade deste na hidrólise de resíduos agroindustriais pré-tratados com peróxido de hidrogênio alcalino. Este mostrou-se promissor na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar e, dessa forma, viabiliza futuros estudos quanto ao seu emprego na produção de etanol de segunda geração, em escala laboratorial.

Por fim, o presente estudo contribuiu na prospecção de novos microrganismos produtores de celulases associados a material vegetal em decomposição em ecossistema aquático. Logo, a partir desta fonte foi possível identificar *Paraphaeosphaeria arecacearum*, um isolado que até o presente momento não havia sido mencionado na literatura como produtor de celulases, o

que abriu uma infinidade de possibilidades para o estudo da micota associada a material vegetal em decomposição em riachos, objetivando buscar outras enzimas de interesse industrial além das celulasas, como xilanases, amilases e lipases.

APÊNDICE A



Copyright © da Editora CRV Ltda.
Editor-chefe: Railson Moura
Diagramação e Capa: Editora CRV
Revisão: Os Autores

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
CATALOGAÇÃO NA FONTE

T673

Tópicos especiais em biotecnologia e biodiversidade – Volume 1 / Cleilson Antonio da Silva, Victor Hugo Gomes Sales, Danylo Bezerra Mendes, Celso Hackenhaar, Evandro Reina, Áurea Welter (Orgs.). – Curitiba: CRV, 2017.
146 p. (Coleção Tópicos especiais em biotecnologia e biodiversidade, v. 1)

Bibliografia

ISBN COLEÇÃO 978-85-444-2150-5

ISBN VOLUME 978-85-444-2151-2

DOI 10.24824/978854442151.2

1. Biotecnologia 2. Biodiversidade I. Silva, Cleilson Antonio da. org. II. Sales, Victor Hugo Gomes. org. III. Mendes, Danylo Bezerra org. IV. Hackenhaar, Celso. org. V. Reina, Evandro. org. VI. Welter, Áurea. org. VII. Título VIII. Série.

CDU 606

CDD 660.6

Índice para catálogo sistemático

1. Biotecnologia 660.6

ESTA OBRA TAMBÉM ENCONTRA-SE DISPONÍVEL EM FORMATO DIGITAL.
CONHEÇA E BAIXE NOSSO APLICATIVO!



2017

Foi feito o depósito legal conf. Lei 10.994 de 14/12/2004
Proibida a reprodução parcial ou total desta obra sem autorização da Editora CRV
Todos os direitos desta edição reservados pela: Editora CRV
Tel.: (41) 3039-6418 - E-mail: sac@editoracrv.com.br
Conheça os nossos lançamentos: www.editoracrv.com.br

Conselho Editorial: Comitê Científico:

- Aldira Guimarães Duarte Domínguez (UNB)
 Andréia da Silva Quintanilha Sousa (UNIR/UFRN)
 Antônio Pereira Gaio Júnior (UFRRJ)
 Carlos Alberto Vilar Estêvão (UMINHO - PT)
 Carlos Federico Dominguez Avila (UNIEURO)
 Carmen Tereza Velanga (UNIR)
 Celso Conti (UFSCar)
 Cesar Gerónimo Tello (Univer. Nacional
 Três de Febrero - Argentina)
 Eduardo Fernandes Barbosa (UFMG)
 Elione Maria Nogueira Diogenes (UFAL)
 Êlsio José Corá (UFFS)
 Elizeu Clementino (UNEB)
 Fernando Antônio Gonçalves Alcoforado (IPB)
 Francisco Carlos Duarte (PUC-PR)
 Gloria Fariñas León (Universidade de La Havana – Cuba)
 Guillermo Arias Beatón (Universidade de La Havana – Cuba)
 Jailson Alves dos Santos (UFRJ)
 João Adalberto Campato Junior (UNESP)
 Josania Portela (UFPI)
 Leonel Severo Rocha (UNISINOS)
 Lídia de Oliveira Xavier (UNIEURO)
 Lourdes Helena da Silva (UFV)
 Maria de Lourdes Pinto de Almeida (UNICAMP)
 Maria Lília Imbiriba Sousa Colares (UFOPA)
 Maria Cristina dos Santos Bezerra (UFSCar)
 Paulo Romualdo Hernandes (UNICAMP)
 Rodrigo Pratte-Santos (UFES)
 Sérgio Nunes de Jesus (IFRO)
 Simone Rodrigues Pinto (UNB)
 Solange Helena Ximenes-Rocha (UFOPA)
 Sydione Santos (UEPG)
 Tadeu Oliver Gonçalves (UFPA)
 Tania Suely Azevedo Brasileiro (UFOPA)
- Claudio Lorenzo (Université de Sherbrooke, USherbrooke, Canadá)
 Dirceu Bartolomeu Greco (UFMG)
 Dora Porto (UNB)
 Eduardo Rueda (Colômbia)
 Flávio Rocha Lima Paranhos (UNB)
 Helena Carneiro Leão (PUC/SP)
 J. M. de Barros Dias (Universidade de Evora/Portugal)
 Jose Eduardo Siqueira (PUC/PR)
 José Roque Junges (UNISINOS)
 Mario Antônio Sanches (PUC/PR)
 Marlene Braz (FIOCRUZ)
 Regina Ribeiro Parizi Carvalho (UNESCO)
 Sergio Ibiapina Ferreira Costa (ICF)
 Sérgio Rogério Azevedo Junqueira (Universitá
 Pontificia Salesiana di Roma, UPS, Itália)
 Susana Vidal (UNESA)
 Thiago Rocha da Cunha (UNB)
 Volnei Garrafa (UNESP)

Este livro foi avaliado e aprovado por pareceristas *ad hoc*.

ANEXO 1 – DIRETRIZES PARA AUTORES DO PERIÓDICO BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY

Types of Articles

The **Brazilian Journal of Microbiology** accepts submissions of the following article types:

- **Research Papers:**
report results of original research, which has not been published elsewhere.
- **Short communications:**
a short communication is new and significant findings. Submit form is the same way as research paper. They receive the same review, they are not published more rapidly than research paper.
- **Reviews:**
Review articles should deal with microbiological subjects of broad interest. Authors are requested to contact the Editor-in-Chief (bjm.chief@gmail.com) before submission.
- **Letters to the editor:**
letters to the editor are intended only for comments on final, typeset articles published in the journal (manuscripts posted online are not accepted) and must cite published references to support the writer's argument.
Your manuscript must be written clearly, in comprehensible, and linguistically correct English. Manuscripts written in poor English will not be accepted. Please check the section "English Language Support" how to get assistance.

Sections

The **Brazilian Journal of Microbiology** has the following sections (one them should be selected during the electronic submission process):

- **Biotechnology and Industrial Microbiology**
Biosynthesis and bioconversion of natural products, including antibiotics, xenobiotics, and macromolecules produced by bacteria. Biosynthesis and bioconversion of natural products, including antibiotics, xenobiotics, and macromolecules produced by fungi. Molecular aspects of fungal biotechnology. Molecular aspects of bacterial biotechnology.
- **Food Microbiology**
Applications of microorganisms (bacteria and fungi) for food production. Food borne diseases, food spoilage, and microbial ecology in foods.
- **Bacterial and Fungal Pathogenesis**
The genetic, biochemical, and structural basis of bacterial pathogenesis.
- **Clinical Microbiology**
Studies of medically-important bacteria, fungi and virus.
- **Environmental Microbiology**
Ecology of natural microbial assemblages, microbial diversity of natural environments such as water, soil, sediments and higher organisms. Microbial interactions. Biodegradation, Bioremediation, and Environmental considerations for genetically engineered microorganisms.
- **Veterinary Microbiology**

Diseases of animals, Control and/or treatment of animals, Animal pathogen diagnostics, and Veterinary or zoonotic pathogens

- Fungal and Bacterial Physiology
Biochemistry, biophysics, metabolism, cell structure, stress response, growth, differentiation and other related process.
- Bacterial, Fungal and Virus Molecular Biology
Fungal and bacterial genetics, molecular biology, gene regulation, DNA replication and repair, genomics, proteomics, transcriptomics.
- Education in Microbiology
Original research papers and reviews covering education and learning technologies in Microbiology. Reporting experiences of learning methods with undergraduate or graduate students; effectiveness of pedagogical approaches; development and assessment of trends in education in microbiology.

Manuscript Submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Plagiarism prevention with CrossCheck

Springer is a participant of CrossCheck, a multi-publisher plagiarism detection initiative to screen published and submitted content for originality. CrossCheck consists of two products: a database of scholarly publications (CrossCheck) and a web-based tool (iThenticate) to check an authored work against that database. This journal uses the plagiarism tool to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts and your manuscript may be screened upon submission for plagiarism against previously published works.

Authorship Policy

Authorship should incorporate and should be restricted to those who have contributed substantially to the work in one or more of the following categories:

- Conceived of or designed study
- Performed research
- Analyzed Data
- Contributed new methods or models

- Wrote the paper

Editorial procedure

Single-blind peer review

This journal follows a single-blind reviewing procedure.

Title page

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

Scientific style

- Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).
- Genus and species names should be in italics.
- Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

- Journal article
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>
Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:
Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329
- Article by DOI
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>
- Book
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
- Book chapter
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- Online document
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- Dissertation
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- [ISSN.org LTWA](#)
- If you are unsure, please use the full journal title.
- For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.
- [EndNote style \(zip, 2 kB\)](#)
- Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file `spbasic.bst` which is included in Springer's LaTeX macro package.

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

After Acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints. Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Open Choice

Open Choice allows you to publish open access in more than 1850 Springer Nature journals, making your research more visible and accessible immediately on publication.

Article processing charges (APCs) vary by journal – [view the full list](#)

Benefits:

- Increased researcher engagement: Open Choice enables access by anyone with an internet connection, immediately on publication.
- Higher visibility and impact: In Springer hybrid journals, OA articles are accessed 4 times more often on average, and cited 1.7 more times on average*.
- Easy compliance with funder and institutional mandates: Many funders require open access publishing, and some take compliance into account when assessing future grant applications.
- It is easy to find funding to support open access – please see our funding and support pages for more information.
- *) Within the first three years of publication. Springer Nature hybrid journal OA impact analysis, 2018.
- [Open Choice](#)
- [Funding and Support pages](#)

Copyright and license term – CC BY

- Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.
- [Find more about the license agreement](#)

Research Data Policy

A submission to the journal implies that materials described in the manuscript, including all relevant raw data, will be freely available to any researcher wishing to use them for non-commercial purposes, without breaching participant confidentiality.

The journal strongly encourages that all datasets on which the conclusions of the paper rely should be available to readers. We encourage authors to ensure that their datasets are either deposited in publicly available repositories (where available and appropriate) or presented in the main manuscript or additional supporting files

whenever possible. Please see Springer Nature's information on recommended repositories.

- [List of Repositories](#)
- [Research Data Policy](#)

General repositories - for all types of research data - such as figshare and Dryad may be used where appropriate.

Datasets that are assigned digital object identifiers (DOIs) by a data repository may be cited in the reference list. Data citations should include the minimum information recommended by DataCite: authors, title, publisher (repository name), identifier.

- [DataCite](#)

Where a widely established research community expectation for data archiving in public repositories exists, submission to a community-endorsed, public repository is mandatory. Persistent identifiers (such as DOIs and accession numbers) for relevant datasets must be provided in the paper

For the following types of data set, submission to a community-endorsed, public repository is mandatory:

Mandatory deposition	Suitable repositories
Protein sequences	Uniprot
DNA and RNA sequences	Genbank DNA DataBank of Japan (DDBJ) EMBL Nucleotide Sequence Database (ENA)
DNA and RNA sequencing data	NCBI Trace Archive NCBI Sequence Read Archive (SRA)
Genetic polymorphisms	dbSNP dbVar European Variation Archive (EVA)
Linked genotype and phenotype data	dbGAP The European Genome-phenome Archive (EGA)
Macromolecular structure	Worldwide Protein Data Bank (wwPDB) Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB) Electron Microscopy Data Bank (EMDB)
Microarray data (must be MIAME compliant)	Gene Expression Omnibus (GEO) ArrayExpress
Crystallographic data for small molecules	Cambridge Structural Database

For more information:

- [Research Data Policy Frequently Asked Questions](#)

Data availability

The journal encourages authors to provide a statement of Data availability in their article. Data availability statements should include information on where data supporting the results reported in the article can be found, including, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or generated during the

study. Data availability statements can also indicate whether data are available on request from the authors and where no data are available, if appropriate.

Data Availability statements can take one of the following forms (or a combination of more than one if required for multiple datasets):

- 1. The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS]
- 2. The datasets generated during and/or analysed during the current study are not publicly available due [REASON WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request.
- 3. The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.
- 4. Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.
- 5. All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].
- More examples of template data availability statements, which include examples of openly available and restricted access datasets, are available:
- [Data availability statements](#)
- This service provides advice on research data policy compliance and on finding research data repositories. It is independent of journal, book and conference proceedings editorial offices and does not advise on specific manuscripts.
- [Helpdesk](#)

Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation is helped by following the rules of good scientific practice, which include*:

- The manuscript should not be submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The submitted work should be original and should not have been published elsewhere in any form or language (partially or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work. (Please provide transparency on the re-use of material to avoid the concerns about text-recycling ('self-plagiarism').
- A single study should not be split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (i.e. 'salami-slicing/publishing').
- Concurrent or secondary publication is sometimes justifiable, provided certain conditions are met. Examples include: translations or a manuscript that is intended for a different group of readers.
- Results should be presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification or inappropriate data manipulation (including image based manipulation). Authors should adhere to discipline-specific rules for acquiring, selecting and processing data.

- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ('plagiarism'). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks (to indicate words taken from another source) are used for verbatim copying of material, and permissions secured for material that is copyrighted.
- **Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.**
- Authors should make sure they have permissions for the use of software, questionnaires/(web) surveys and scales in their studies (if appropriate).
- Authors should avoid untrue statements about an entity (who can be an individual person or a company) or descriptions of their behavior or actions that could potentially be seen as personal attacks or allegations about that person.
- Research that may be misapplied to pose a threat to public health or national security should be clearly identified in the manuscript (e.g. dual use of research). Examples include creation of harmful consequences of biological agents or toxins, disruption of immunity of vaccines, unusual hazards in the use of chemicals, weaponization of research/technology (amongst others).
- Authors are strongly advised to ensure the author group, the Corresponding Author, and the order of authors are all correct at submission. Adding and/or deleting authors during the revision stages is generally not permitted, but in some cases may be warranted. Reasons for changes in authorship should be explained in detail. Please note that changes to authorship cannot be made after acceptance of a manuscript.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results presented. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential or proprietary data is excluded.

*All of the above are guidelines and authors need to make sure to respect third parties rights such as copyright and/or moral rights.

If there is suspicion of misbehavior or alleged fraud the Journal and/or Publisher will carry out an investigation following COPE guidelines. If, after investigation, there are valid concerns, the author(s) concerned will be contacted under their given e-mail address and given an opportunity to address the issue. Depending on the situation, this may result in the Journal's and/or Publisher's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the manuscript is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction:
 - an erratum/correction may be placed with the article
 - an expression of concern may be placed with the article
 - or in severe cases retraction of the article may occur. The reason will be given in the published erratum, expression of concern or retraction note. Please note that retraction means that the article is **maintained on the platform**, watermarked "retracted" and the explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.
- The author's institution may be informed

- A notice of suspected transgression of ethical standards in the peer review system may be included as part of the author's and article's bibliographic record.

Fundamental errors

Authors have an obligation to correct mistakes once they discover a significant error or inaccuracy in their published article. The author(s) is/are requested to contact the journal and explain in what sense the error is impacting the article. A decision on how to correct the literature will depend on the nature of the error. This may be a correction or retraction. The retraction note should provide transparency which parts of the article are impacted by the error.

Suggesting / excluding reviewers

Authors are welcome to suggest suitable reviewers and/or request the exclusion of certain individuals when they submit their manuscripts. When suggesting reviewers, authors should make sure they are totally independent and not connected to the work in any way. It is strongly recommended to suggest a mix of reviewers from different countries and different institutions. When suggesting reviewers, the Corresponding Author must provide an institutional email address for each suggested reviewer, or, if this is not possible to include other means of verifying the identity such as a link to a personal homepage, a link to the publication record or a researcher or author ID in the submission letter. Please note that the Journal may not use the suggestions, but suggestions are appreciated and may help facilitate the peer review process.

Compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals. Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

Disclosure of potential conflicts of interest

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any

conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found [here](#):

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

I

informed consent

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of

the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

Informed consent: “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

“Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”

English Language Support

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

- Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.
- Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.
- Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts. Springer authors are entitled to a 10% discount on their first submission to either of these services, simply follow the links below
 - [English language tutorial](#)
 - [Nature Research Editing Service](#)
 - [American Journal Experts](#)

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

ANEXO 2 – DIRETRIZES PARA AUTORES DO PERIÓDICO BIORESOURCES

PEER-REVIEWED ARTICLE

bioresources.com

Your Title Goes Here with 16-Point Bold Arial Font

First A. Author,^a Given Name Surname,^{a,*} 12-Pt_TNRoman Font,^b and
Fourth D. F. Author^c

Your abstract, in 10-point Arial font, indented 0.5 inches, having a maximum length of 200 words (ideally 150 words), goes here. The abstract briefly summarizes your main findings, using terms that are understandable to a general scientific audience. Briefly summarize the context and the significance of the findings, describing how your results contribute to the field of science and potential or actual applications. Remember that the journal's audience is multidisciplinary. Acronyms are discouraged in the Abstract. Special characters are not permitted. The present document has been set up to serve as a template for the format of your own research article that you are submitting for publication in *BioResources*. It is recommended to start with a fresh copy of this template document, save a copy of a new version of it, and then replace the contents with your own contents.

Keywords: Format; Author guidelines; TNRoman 10-point italic; Up to 10 brief terms

*Contact information: a: Department of Times New Roman 10-Pt italic Font, Acme University, P. O. Box 1000, Acme, OH 44308 USA; b: Department of Forest Biomaterials, Raleigh State University, Box 8005, Durham, NC 27695-8005 USA; c: Ace Biomass Solutions, Inc., 1234 Main Drag, Yourtown, Your State 89453 Your Country; *Corresponding author: liujb3@ncsu.edu*

INTRODUCTION

Skip one line after each major heading (as shown here, but not after subheadings). Indent all paragraphs. Your introduction should provide sufficient background in your topic area so that the reader will be able to understand the context and importance of your research findings. The text should be justified at the right margin, in addition to the left margin. The first few paragraphs of your research article should lay out the motivation and importance of the work and show how the work relates to other recent advances in science or technology. The explanations should be sufficiently broad so that scientists and technologists who are unfamiliar with your subject area can gain an appreciation of how your research results might be applied, if they are further developed and successfully implemented.

Subsequent paragraphs are indented also. Your introduction should make reference to key publications, emphasizing work that is most relevant to your research results (Bell *et al.* 1954; Chu and Knoll 2003; Mallouk 2004a; Cook 2013). The format of the citations should match the system used in *J. Water Resources Planning and Management*. Notice the form in which different kinds of citations appear at the end of the article (Adams and Spencer 2001; Arunkumar 2002; Bannix *et al.* 2003; Maminski *et al.* 2015; Montoya 2015). Within parenthetical citations, references are listed in chronological order, reverting to alphabetical order when they contain the same year.

Italics should be used for Latin words and contractions (*i.e.*, *viz.*, *e.g.*, *et al.*, *etc.*), for journal titles (*J. Phys. Chem.*), and for genus and species (*Pinus taeda*). Make sure to define acronyms and abbreviations when they are first utilized, *e.g.*, scanning electron microscopy (SEM).

Manuscripts must be prepared and submitted in one of the following editable formats: MS WORD (using either the “doc” or “docx” suffix), or Open Office Writer (any version). The purpose of requiring one of these formats is to facilitate the editing process and minimize the time between submission and publication. For purposes of the review process, the editorial staff will convert drafts to portable document format (PDF) files. In cases where the editors recommend a revised version to be submitted, the revised document, once again, needs to be submitted in one of the editable text systems listed.

The editors request that the file name begin with the primary author’s surname (family name) or at least the first six letters of that name. You don’t need to worry about the material in the Header and the Footer; the editorial staff will take care of those items after an article has been reviewed, any issues raised by the reviewers have been satisfactorily addressed, and the article has been approved for publication. Authors are responsible for formatting all of the pages, including accurate formatting of the title, author list, the abstract (including indentation), key words, main headings (as provided), optional subheadings, text, figures, graphs, and citations. All of these must match the format of the examples shown in this template article.

Except in the case of review articles, it is recommended that introductory material be kept suitably brief, usually between one and three pages. Reviewers will be required to answer a question about whether your article can be improved by shortening, and the editors will act upon such recommendations. An exception will be made in cases where the background material of an article includes a substantial advance in theory that needs to be explained for the first time.

It is recommended that the overall length of a research article submitted for publication in *BioResources* be between 6 and 25 pages, still with the understanding that a majority of articles as long as 25 pages probably can be improved in quality by judicious culling and rewriting. The editors reserve the right to accept even longer articles in cases of exceptional quality, novelty, and importance of the work.

Subheading in 12-point Arial Bold

Use subheadings sparingly to set off different subject matter, especially in parts of your article that extend beyond one page in length. Notice that the subheading is in “Title Case,” with major words capitalized.

Skip 2 spaces before a major (**ALL CAPS**) heading, and one space after, as shown below.

EXPERIMENTAL

Your Subheading, e.g., Materials

Provide sufficient detail so that another researcher in your field would be able to repeat the work. Brand names of chemicals and other materials are to be mentioned once in the Experimental section, where appropriate, to make it possible for future researchers to obtain the same starting materials or equipment. Brand names are not to be used elsewhere in the article, including the Abstract or the Conclusions sections. Rather, authors should employ appropriate generic nomenclature, chemical names, or descriptive names. Alternatively, the Experimental section may include a table in which brand name products or devices are

assigned suitable generic labels based on their chemical composition. Please see the Editorial Policies on the website regarding the non-commercial, scientific nature of items to be submitted to *BioResources*.

Please include the supplier's name and location (City, Country) for all specialized reagents, equipment, and software.

Your third-level heading

In case you want three levels of headings, please use non-bolded italics, with a Times New Roman 12-point font for the lowest level headings. Capitalize only the first word in the heading.

Another third-level heading

Most articles are likely to have only two levels of headings.

Equations

Sometimes it is appropriate to show an equation in the Introduction, Experimental, or Results and Discussion section. Here is an example of Eq. 1,

$$E = mc^2 \tag{1}$$

where E is energy (kJ), m is mass (kg), and c is the speed of light (m/s). Note that the variables are in italics; the equation is left-indented with one tab. The units are included when the variable is defined.

Test Standards

All test standards used should be referenced in the Experimental section. In-text citations should include the year of publication. For example, you may choose to cite the TAPPI T222 om-11 standard (2011), ISO 9087 (1998), ASTM D570-098 (2010), and GB/T 2677.20 (1995). See the References Cited for the correct formatting.

Your Subheading, e.g., Methods

Because *BioResources* is intended for a broad range of readers, authors are encouraged to provide brief background explanations of experimental procedures and theories that, though well known to some, may not generally be well known to a random group of college-educated people having an interest in biomass utilization technology.

RESULTS AND DISCUSSION

Results should be presented clearly and concisely. Please use past tense when describing the work that was carried out. For example, "Four milliliters of NaOH solution (0.1 N) was added...". Present tense can be used when making a statement that the authors believe to have general validity, especially when supported by other publications. For example, "The addition of NaOH increases the swelling of this type of lignocellulosic material (Chu and Knoll 2003)." Please use your best judgment when using other verb tenses to clearly convey your intended meaning.

Note that the term "significant" usually implies statistical significance. If this is your intended meaning when discussing your results, please include a description of your statistical analysis in the Experimental section. Otherwise, please use the terms "noticeable", "remarkable", "major", *etc.*, to indicate important changes in results.

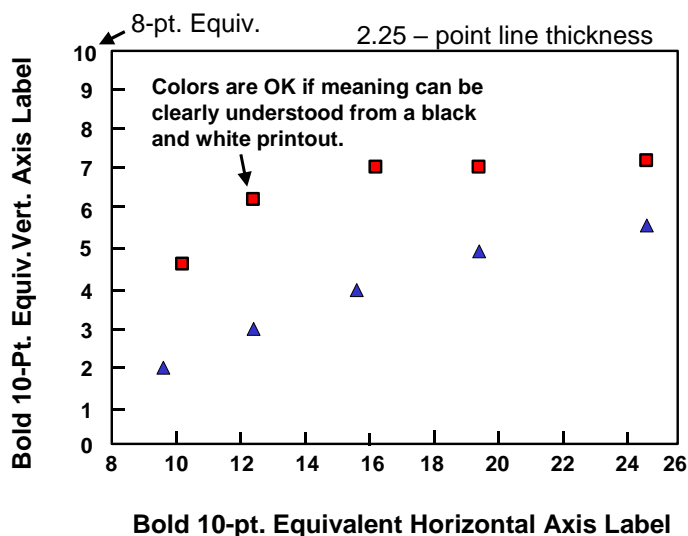


Fig. 1. Example of a figure, prepared so that the axis labels are near to the size of the surrounding text. Note that the caption is 10-point Arial font with left justification.

Authors are encouraged to use figures or tables, whichever are the most appropriate, to clearly elucidate the research findings. The graph above (Fig. 1) shows the expected format of plotted information in terms of the following parameters. The vertical and horizontal labels should be prepared in bold Arial font of a suitable size so that they appear in the page view with a size equivalent to a 10-point font or somewhat larger in the final view (noting that this present text is in 12-point Times New Roman font). Number axis labels can appear somewhat smaller, *e.g.*, equivalent to 8-point font. Although colors are encouraged, graphics must be prepared so that symbols and lines show up clearly in a black-and-white printout, and they should remain clearly differentiated from each other in such a format. Authors will have control of both the size and positioning of figures, although the example shown below can be used for general guidance. Figures or tables should be placed close to the location where they are first mentioned in the text.

The next set of results is reported in tabular form. The following table serves as a representative example of how the heading and the remaining table might appear, depending on the nature of the data. Note that “title case” format, with capitalization of major words, is used for the table headings. Notes and abbreviations are listed below the table. Tables should fit within the page margins, *i.e.*, they are aligned with text on both sides. All rows of the table should fit on one page. As appropriate, results should be discussed and interpreted in the context of other published work.

Table 1. Example of Tabular Results (12-point Arial here)

Biomaterials In (kg)	Parameter A *	Parameter B	Bioproduct Out (kg)
0.0	8.3	0.2	0.0
30.2	9.7	99.3	0.5
35.8	10-point Arial here	-46.8	0.6
42.6	6.1	5.0	0.7
52.6	7.3	0.1	0.7

* This parameter normalized according to the procedure of Mallouk (2004b)

Notes about References Cited

Authors are requested to take whatever time is needed to format the References cited section (at the end of the article) accurately in the format of the examples given. Please do not use EndNote® or other citation management software. All of the authors should be listed, unless there are more than ten of them. As can be seen, there are somewhat different systems used in case of a journal article, a book, a chapter in an edited book, a paper in a proceedings, or an item from the Internet. The names of scientific journals either can be spelled out completely or abbreviated using the forms in common use, but please be consistent. Journal abbreviations can be found at <http://www.efm.leeds.ac.uk/~mark/ISIabbr/>.

All articles must include “DOI” codes (if they exist) for each cited work. As shown in the examples, the DOI code goes at the end of the citation record, using the same format as provided in the Web of Science database. The Internet can be used to quickly obtain the correct DOI information, if it exists: go to the website <http://www.crossref.org/SimpleTextQuery/> and follow the instructions given there. This service is free, but it does require signing up with a valid email account.

Note again, there are two spaces before a major heading.

CONCLUSIONS

1. Your conclusions should be numbered. Although there is no fixed rule, it is preferred that the strongest or most general conclusion supported by the research results should be placed first.
2. Additional conclusions, especially if they deal with more particular issues of the research, would be placed later in the list, though authors may use their own discretion.
3. Speculative statements, opinions, or statements about future work do not belong in the Conclusions section. Such statements often may be appropriate in the Results and Discussions section, especially if they can help readers understand the potential implications of the research findings.
4. Note that there is a half-space (6 points) between each of the numbered conclusions. There are also two spaces between this text and the major heading that follows. The purpose of this formatting is to enhance readability. The style of the reference cited information matches the style used in the *Journal of Water Resources Planning and Management* or *Journal of Water Resources Management*.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful for the support of the U.S. Department of Biomaterials Research, Grant No. 2005-1234.

REFERENCES CITED

- Adams, B. A., and Spencer, P. G. (2001). “Title of chapter,” in: *Textbook of Miscellaneous Information*, B. S. Peesley (ed.), McGraw Hill, New York, NY. DOI: 10.1093/ocmed/kqs192
- Arunkumar, T. (2002). *Final Technical Government Report of the GMXT Project*, Environmental Protection Agency, (<http://www.epa.gov/gmxt.htm>).

- ASTM D570-98 (2010). "Standard test method for water absorption of plastics," ASTM International, West Conshohocken, PA.
- Bell, E. R., Peck, E. C., and Krueger, N. T. (1954). *Modulus of Elasticity of Wood Determined by Dynamic Methods* (Report No. 1977), U. S. Department of Agriculture, Forest Products Laboratory, Madison, WI.
- Chu, X. C., and Knoll, M. (2003). "Utilization of wood-derived biomass as a liquid fuel source: Part 2," *J. Biotechnol. Bioenergy* 12(2), 153-162. DOI: 10.1016/0144-4565(90)90070-Z
- Cook, J. R. (2013). *Amine Functionalization of Bacterial Cellulose for Targeted Delivery Applications*, Master's Thesis, University of Western Ontario, London, ON, Canada.
- GB/T 2677.20. (1995). "Fibrous material - Determination of holocellulose," Standardization Administration of China, Beijing, China.
- ISO 9087. (1998). "Wood determination of nail and screw holding power under axial load application," International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Mallouk, J. G. K. (2004a). "Meeting the coming energy challenge through green technology," *Biotechnol. Biomass Acta* 34(4), 334-358. DOI: 10.1016/j.rser.2014.01.025
- Mallouk, J. G. K. (2004b). "Further progress in meeting the coming energy challenge through green technology," *Biotechnol. Biomass Acta* 34(5), 403-418. DOI: 10.1007/s12155-013-9372-x
- Maminski, M., Parzuchowski, P., Borysiuk, P., and Boruszewski, P. (2015). "Hyperbranched macromolecules as modifiers of urea-formaldehyde resins," in: *Proceedings of the Wood Adhesives 2009 Conference*, 8-11 June, Lake Tahoe, NV, pp. 424-426.
- Montoya, I. (2015). "Fencing," (<http://www.keepusingthatword.com>), accessed 28 July 2015.
- TAPPI T222 om-11. (2011). "Acid-insoluble lignin in wood and pulp," TAPPI Press, Atlanta, GA.

Article submitted: