

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

ESTEFFANY DE SOUZA CANDEO

**FITOPATÓGENOS DE CANA-DE-AÇÚCAR: CARACTERIZAÇÃO DO  
POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO

2019

ESTEFFFANY DE SOUZA CANDEO

**FITOPATÓGENOS DE CANA-DE-AÇÚCAR: CARACTERIZAÇÃO DO  
POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – câmpus Toledo.

Orientadora: Dra. Patricia Dayane Carvalho Schaker.

TOLEDO

2019

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

ESTEFFFANY DE SOUZA CANDEO

### **FITOPATÓGENOS DE CANA-DE-AÇÚCAR: CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no dia 27 de junho de 2019 como requisito à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – câmpus Toledo. O presente trabalho foi considerado aprovado pela banca examinadora abaixo.

---

Dra. Patricia Dayane Carvalho Schaker  
Orientadora - UTFPR

---

Dr. Cleverson Busso  
UTFPR

---

Dr. Fabiano Bisinella Scheufele  
UTFPR

A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.

## AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo e ao Instituto Agronômico de Campinas – Centro de Cana, pelo fornecimento dos isolados utilizados no presente estudo.

A todos professores do curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, câmpus Toledo, que contribuíram grandemente para minha formação profissional. Em especial aos professores Dr. Jones Erni Schmitz, Dr. Fabiano Bisinella Scheufele e Dr. Cleverson Busso por todo o conhecimento transmitido e pelas conversas amigáveis e descontraídas.

Aos técnicos de laboratório, Danielle, Caroline, Bruna, Rafael e Iraúza pela ajuda nas etapas de experimentação, incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney por todo o esforço tido em me ensinar desde o primeiro ano da graduação, pelas oportunidades de aprendizados dadas e pela colaboração profissional.

A doce Profa. Dra. Patricia Dayane Carvalho Schaker, minha orientadora, pela confiança, encorajamento, carinho e sobretudo por seus valiosos ensinamentos. Sua orientação foi insubstituível, agradeço a oportunidade!

Às minhas amigas Amanda, Gabriela, Luciana, Juliana, Latoya e Adrieli, por partilharem comigo e me apoiarem sempre que necessário. Devo grande parte a vocês!

Ao meu namorado e acima de tudo amigo, Julio Bosa, pelo amor, companheirismo e segurança transmitidos durante os últimos anos de graduação. Seu apoio e carinho me transformam em um ser melhor! Meu coração é seu!

Por fim, agradeço toda minha família. Especialmente meus pais, Julio e Mery, meus irmãos, Nicolas e Matheus, meus avós, Candeo e Odalsiza, e meus tios Altevir, Simone e Lucas. Obrigada por acreditarem em mim, às vezes até mais do que eu mesma, e por serem fonte de amor puro. Amo vocês!

Muito obrigada...

## RESUMO

A produção de etanol de segunda geração a partir de biomassas lignocelulósicas depende de etapas de pré-tratamento físicas, químicas e enzimáticas, nas quais são liberados açúcares simples dos constituintes da celulose e da hemicelulose. No entanto, esses processos necessitam de otimização a fim de se evitar a produção de moléculas inibidoras da fermentação e aumentar a concentração de açúcares fermentescíveis, sendo que uma forma de se atingir tal objetivo é pela diversificação do *pool* enzimático lignocelulolítico existente. Desse modo, o presente estudo objetivou analisar o potencial dos patógenos da cana-de-açúcar *Sporisorium scitamineum*, *Colletotrichum falcatum* e *Thielaviopsis paradoxa* na produção de enzimas lignocelulolíticas. Inicialmente, ensaios qualitativos indicaram a produção de celulasas e fenoloxidasas *in vitro* por *C. falcatum* e *T. paradoxa*, sendo então submetidas à fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato. Utilizou-se um planejamento fatorial completo, a fim de determinar a influência da adição de extrato de levedura (0-5%), umidade (85-95%) e tempo de cultivo (4-12 dias) sobre a atividade enzimática de endoglucanase, celulasas totais, lacase e lignina peroxidase. Para *T. paradoxa*, verificou-se que a condição operacional de 95% de umidade, extrato de levedura a 5% e 4 dias de cultivo, maximizaram a produção de endoglucanase e celulasas totais, sendo ( $\text{U mL}^{-1}$ ) 0,690 e 0,307 as máximas atividades alcançadas, respectivamente. Já para *C. falcatum*, 90% de umidade e extrato de levedura a 5%, sem influência do tempo de cultivo, geraram melhores atividades de endoglucanase e celulasas totais, sendo as máximas obtidas de ( $\text{U mL}^{-1}$ ) 2,754 e 0,183, respectivamente. Atividade de lacase foi verificada apenas no extrato de *C. falcatum* (95% umidade, 5% extrato de levedura, 12 dias), atingindo  $473,85 \text{ UI L}^{-1}$ . Não se verificou atividade de lignina peroxidase em nenhum extrato analisado. Adicionalmente, uma análise *in silico* do conjunto de proteínas codificadas pelos três patógenos foram comparados ao de *Trichoderma reesei*, a fim de se identificar as proteínas com domínio CAZy. Os dados mostram que *C. falcatum* apresenta o maior número de proteínas ativas em carboidratos e pode suplementar os extratos enzimáticos de *T. reesei* com atividades relacionadas à quebra de pectina e lignina, principalmente.

**Palavras-chave:** Celulasas. Lacase. Lignina peroxidase. Lignocelulose. Análise *in silico*. Sacarificação enzimática.

## ABSTRACT

The production of second generation ethanol from lignocellulosic biomasses depends on physical, chemical and enzymatic pretreatment steps, in which simple sugars are released from the constituents of cellulose and hemicellulose. However, these processes require optimization in order to avoid the production of inhibitory molecules of fermentation and increase the concentration of fermentable sugars, an alternative to achieve this objective is by diversifying the existing lignocellulolytic enzyme pool. Thus, the present study aimed to analyze the potential of sugarcane pathogens *Sporisorium scitamineum*, *Colletotrichum falcatum* and *Thielaviopsis paradoxa* in the production of lignocellulolytic enzymes. Initially, qualitative assays indicated the production of cellulases and phenoloxidases *in vitro* by *C. falcatum* and *T. paradoxa*, and were further submitted to solid-state fermentation using sugarcane bagasse as a substrate. A complete factorial design was used to determine the influence of the addition of yeast extract (0-5%), moisture (85-95%) and culture time (4-12 days) on the enzymatic activity of endoglucanase, total cellulase, laccase and lignin peroxidase. For *T. paradoxa*, the operational condition of 95% moisture, 5% yeast extract and 4 days of cultivation, maximized the production of endoglucanase and total cellulase, being (U mL<sup>-1</sup>) 0.690 and 0.307 the maximum activities achieved, respectively. For *C. falcatum*, 90% moisture and 5% yeast extract, without influence of the culture time, generated better endoglucanase and total cellulase activity, with the maximum yields obtained (U mL<sup>-1</sup>) being 2,754 and 0,183, respectively. Laccase activity was verified only in the extract of *C. falcatum* (95% moisture, 5% yeast extract, 12 days), reaching 473.85 IU L<sup>-1</sup>. Lignin peroxidase activity was not observed in any analyzed extract. In addition, an *in silico* analysis of the set of proteins encoded by the three pathogens was compared to that of *Trichoderma reesei*, in order to identify the CAZy domain proteins. The data show that *C. falcatum* has the highest number of proteins active in carbohydrates and can supplement the enzymatic extracts of *T. reesei* with activities related to the pectin and lignin break, mainly.

**Keywords:** Cellulases. Laccase. Lignin peroxidase. Lignocellulose. *In silico* analysis. Enzymatic saccharification.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Estrutura da parede celular secundária. Hemicelulose é mostrada em azul e rosa, microfibrilas de celulose em alaranjado e a lignina de forma incorporada na hemicelulose. ...	<b>20</b>
<b>Figura 2</b> – Cadeia linear de celulose formada pela união de dímeros de D-glicose chamados de celobiose.....	<b>21</b>
<b>Figura 3</b> – Estrutura dos monômeros constituintes de cadeias de hemicelulose. ....	<b>22</b>
<b>Figura 4</b> – Estrutura de cadeia de hemicelulose formada por moléculas de D-xilose, acetil (Ac) e ácido $\alpha$ -D-4-O-metilglucurônico ( $\alpha$ -4-O-Me-GlcA).....	<b>22</b>
<b>Figura 5</b> – Estrutura química dos principais precursores das moléculas de lignina. ....	<b>23</b>
<b>Figura 6</b> – Fluxograma simplificado da obtenção de etanol de segunda geração por fermentação de bagaços ou palhas.....	<b>25</b>
<b>Figura 7</b> – Ação catalítica conjunta de celulases para hidrólise enzimática de celulose. ....	<b>28</b>
<b>Figura 8</b> – Ação enzimática de enzimas pertencentes ao complexo das hemicelulases. ....	<b>29</b>
<b>Figura 9</b> – <i>Sporisorium scitamineum</i> e a doença do carvão da cana-de-açúcar. A) Estrutura na forma de chicote onde ocorre a dispersão de esporos do fungo, sua ocorrência é característica típica de plantas suscetíveis infectadas pelo fungo. B) Ciclo da doença do carvão da cana-de-açúcar: esporos (2n) formados no chicote germinam dando origem ao probasídio, que por meiose dá origem a basidiósporos (n). A formação da hifa dicariótica (2n) ocorre com a anastomose de hifas de células de mating-types opostos.....	<b>32</b>
<b>Figura 10</b> – Podridão vermelha de cana-de-açúcar. A) Sintoma de podridão vermelha na nervura central de folhas de cana-de-açúcar infectadas por <i>Colletotrichum falcatum</i> . B) Conídios de <i>C. falcatum</i> corados com azul de algodão. ....	<b>34</b>
<b>Figura 11</b> – A) Vista parcial de microconídios em cadeia de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> na objetiva de 100x. B) Vista parcial de macroconídios em primeiro plano de <i>T. paradoxa</i> na objetiva de 100x. C) Colmos de cana-de-açúcar contaminada por <i>T. paradoxa</i> .....	<b>35</b>
<b>Figura 12</b> – Esquema representativo da análise resultante da fermentação em estado sólido por <i>Sporisorium scitamineum</i> , <i>Colletotrichum falcatum</i> e <i>Thielaviopsis paradoxa</i> . ....	<b>43</b>
<b>Figura 13</b> – Metodologia simplificada para a determinação de atividade enzimática de endoglucanase em extratos brutos por método de reagente de DNS. ....	<b>46</b>
<b>Figura 14</b> – Metodologia simplificada para a determinação de atividade enzimática de celulase total.....	<b>47</b>
<b>Figura 15</b> – Placas de Petri com culturas de fungos em meio BDA após 96 horas de incubação para avaliação morfológica. A) Anverso do cultivo de <i>Colletotrichum falcatum</i> em placa de	

Petri inoculado na forma de disco de micélio. B) Anverso do cultivo de <i>Sporisorium scitamineum</i> em placa de Petri inoculado na forma de solução de esporos. C) Anverso do cultivo de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> em placa de Petri inoculado na forma de disco de micélio. ....	51
<b>Figura 16</b> – Estruturas de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> observadas na objetiva de 40x em microscópio óptico. A) Conídios em cadeia. B) Clamidiósporos maduros (seta). C) Conidióforo liberando conídios através de extremidade aberta (seta). E) Conidióforo liberando conídios (seta preta) e hifa fúngica (seta branca).....	52
<b>Figura 17</b> – Estruturas de <i>Colletotrichum falcatum</i> observadas na objetiva de 40x em microscópio óptico. A) Conídio vacuolizado. B) Emaranhado de hifas e conidióforo (seta)..	53
<b>Figura 18</b> – Avaliação da produção extracelular de celulases em meio CMC corado com solução de vermelho congo (2,5 g L <sup>-1</sup> ) em tampão Tris HCl (0,1 mol L <sup>-1</sup> , pH 8,0). A) Meio CMC corado sem inóculo de microrganismo, para controle negativo de análise. B) Cultivo de <i>Sporisorium scitamineum</i> inoculado na forma de esporos em meio CMC corado. C) Cultivo de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> inoculado como disco de micélio em meio CMC corado. D) Cultivo de <i>Colletotrichum falcatum</i> inoculado como disco de micélio em meio CMC corado.....	54
<b>Figura 19</b> – Avaliação da produção extracelular de fenoloxidasas em meio Ágar extrato de malte suplementado com ácido tânico. A) Cultivo de <i>Sporisorium scitamineum</i> inoculado na forma de esporos em meio Ágar extrato de malte. B) Cultivo de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> inoculado como disco de micélio em meio Ágar extrato de malte. C) Cultivo de <i>Colletotrichum falcatum</i> inoculado como disco de micélio em meio Ágar extrato de malte. ....	56
<b>Figura 20</b> – Distribuição granulométrica de bagaço de cana-de-açúcar, previamente seco em estufa a 50°C e moído em moinho de facas, realizada com peneiramento em série de Taylor. ....	57
<b>Figura 21</b> – Placa de 96 poços com extratos enzimáticos, obtidos de fermentações em estado sólido de bagaço de cana-de-açúcar por fungos fitopatógenos, submetidos a <i>screening</i> de atividade enzimática de lacase. Resultado positivo de atividade indicado pela seta. ....	58
<b>Figura 22</b> – Diagrama de Pareto dos dados de atividade enzimática de endoglucanase em decorrência da variação da umidade, extrato de levedura (YE) e tempo de cultivo de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> . ....	63
<b>Figura 23</b> – Superfície de resposta da atividade enzimática de endoglucanase (AE <sub>ENDOG.</sub> ) de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> . A) AE <sub>ENDOG.</sub> em função do tempo e umidade. B) AE <sub>ENDOG.</sub> em função do tempo e extrato de levedura (YE). ....	65



<b>Figura 24</b> – Diagrama de Pareto dos dados de atividade enzimática de celulases totais em decorrência da variação da umidade, extrato de levedura (YE) e tempo de cultivo de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> . .....	<b>67</b>
<b>Figura 25</b> – Superfície de resposta da atividade enzimática de celulases totais ( $AE_{FPase}$ ) de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> . A) $AE_{FPase}$ em função do tempo e umidade. B) $AE_{FPase}$ em função do tempo e extrato de levedura (YE). .....	<b>69</b>
<b>Figura 26</b> – Comportamento das variáveis umidade, extrato de levedura (YE) e tempo de cultivo para maximização das atividades enzimáticas de endoglucanase ( $AE_{ENDOGL.}$ ) e celulases totais ( $AE_{FPase}$ ) secretadas por <i>Thielaviopsis paradoxa</i> . .....	<b>70</b>
<b>Figura 27</b> – Diagrama de Pareto dos dados de atividade enzimática de endoglucanase em decorrência da variação da umidade, extrato de levedura (YE) e tempo de cultivo de <i>Colletotrichum falcatum</i> . .....	<b>72</b>
<b>Figura 28</b> – Superfície de resposta da atividade enzimática de endoglucanase ( $AE_{ENDOGL.}$ ) de <i>Colletotrichum falcatum</i> . A) $AE_{ENDOGL.}$ em função do tempo e umidade. B) $AE_{ENDOGL.}$ em função do tempo e extrato de levedura (YE). .....	<b>74</b>
<b>Figura 29</b> – Diagrama de Pareto dos dados de atividade enzimática de celulases totais em decorrência da variação da umidade, extrato de levedura (YE) e tempo de cultivo de <i>Colletotrichum falcatum</i> . .....	<b>75</b>
<b>Figura 30</b> – Superfície de resposta da atividade enzimática de celulases totais ( $AE_{FPase}$ ) de <i>Colletotrichum falcatum</i> . A) $AE_{FPase}$ em função do tempo e umidade. B) $AE_{FPase}$ em função do tempo e extrato de levedura (YE). .....	<b>77</b>
<b>Figura 31</b> – Comportamento das variáveis umidade, extrato de levedura (YE) e tempo de cultivo para maximização das atividades enzimáticas de endoglucanase ( $AE_{ENDOGL.}$ ) e celulases totais ( $AE_{FPase}$ ) secretadas por <i>Colletotrichum falcatum</i> . .....	<b>78</b>
<b>Figura 32</b> – Análise <i>in silico</i> do potencial de produção de enzimas lignocelulolíticas por fungos causadores de doenças em cana-de-açúcar em comparação com o fungo <i>Trichoderma reesei</i> . A) Número de proteínas identificadas na plataforma dbCAN em cada uma das famílias de enzimas que apresentam atividade em carboidratos. Ss: <i>Sporisorium scitamineum</i> , Tp: <i>Thielaviopsis paradoxa</i> , Cf: <i>Colletotrichum falcatum</i> , Tr: <i>Trichoderma reesei</i> e os seus respectivos alvos na parede celular vegetal, quando já elucidado. B) Número total de proteínas de cada classe de enzimas com atividade em carboidratos, demonstrando o potencial do fungo <i>C. falcatum</i> em relação a <i>T. reesei</i> . C) Diagrama de Venn comparando as famílias ativas em carboidratos compartilhadas e específicas para cada um dos fungos analisados, indicando o	

potencial de complementação do complexo enzimático lignocelulolítico de *T. reesei* pelos  
fungos analisados..... **83**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Composição do meio de cultivo CMC para avaliação da produção de celulase. ...	<b>38</b>
<b>Tabela 2</b> – Composição do meio de cultura Ágar extrato de malte suplementado com ácido tânico.....	<b>39</b>
<b>Tabela 3</b> – Variáveis codificadas e não-codificadas do planejamento fatorial completo $2^3$ aplicado com espécies fúngicas utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato.....	<b>42</b>
<b>Tabela 4</b> – Matriz do planejamento fatorial completo $2^3$ aplicado com espécies fúngicas para avaliação da atividade enzimática resultante.....	<b>42</b>
<b>Tabela 5</b> – Genomas de linhagem de <i>Sporisorium scitamineum</i> , <i>Thielaviopsis paradoxa</i> e <i>Colletotrichum falcatum</i> publicados e disponíveis no banco de dados público <i>Joint Genome Institute</i> (JGI). ND*: Não determinada. ....	<b>50</b>
<b>Tabela 6</b> – Atividade enzimática de endoglucanase ( $AE_{Endogl.}$ ) e celulasas totais ( $AE_{FPase}$ ) obtidas por fermentações em estado sólido a 28 °C de bagaço de cana-de-açúcar por <i>Thielaviopsis paradoxa</i> e <i>Colletotrichum falcatum</i> .....	<b>60</b>
<b>Tabela 7</b> – Efeito causado pelas condições de umidade, extrato de levedura (YE) e tempo de cultivo de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> na atividade enzimática de endoglucanase e estimativa dos coeficientes do modelo ajustado do planejamento $2^3$ completo.....	<b>62</b>
<b>Tabela 8</b> – Análise de Variância (ANOVA) dos dados de atividade enzimática de endoglucanase por <i>Thielaviopsis paradoxa</i> . Onde, SS corresponde a soma quadrática; gl aos graus de liberdade do sistema; MS a média quadrática; F o valor da estatística; YE a extrato de levedura. ....	<b>64</b>
<b>Tabela 9</b> – Efeito causado pelas condições de umidade, extrato de levedura (YE) e tempo de cultivo de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> na atividade enzimática de celulasas totais (FPase) e estimativa dos coeficientes do modelo ajustado do planejamento $2^3$ completo.....	<b>66</b>
<b>Tabela 10</b> – Análise de Variância (ANOVA) dos dados de atividade enzimática de celulasas totais por <i>Thielaviopsis paradoxa</i> . Em que, SS corresponde a soma quadrática; gl aos graus de liberdade do sistema; MS a média quadrática; F o valor da estatística; YE a extrato de levedura. ....	<b>67</b>
<b>Tabela 11</b> – Efeito causado pelas condições de umidade, extrato de levedura (YE) e tempo de cultivo de <i>Colletotrichum falcatum</i> na atividade enzimática de endoglucanase e estimativa dos coeficientes do modelo ajustado do planejamento $2^3$ completo.....	<b>71</b>
<b>Tabela 12</b> – Análise de Variância (ANOVA) dos dados de atividade enzimática de endoglucanase por <i>Colletotrichum falcatum</i> . Em que, SS corresponde a soma quadrática; gl aos	

graus de liberdade do sistema; MS a média quadrática; F o valor da estatística; YE a extrato de levedura. .... 72

**Tabela 13** – Efeito causado pelas condições de umidade, extrato de levedura (YE) e tempo de cultivo de *Colletotrichum falcatum* na atividade enzimática de celulases totais e estimativa dos coeficientes do modelo ajustado do planejamento  $2^3$  completo. .... 74

**Tabela 14** – Análise de Variância (ANOVA) dos dados de atividade enzimática de celulases totais por *Colletotrichum falcatum*. Em que, SS corresponde a soma quadrática; gl aos graus de liberdade do sistema; MS a média quadrática; F o valor da estatística; YE a extrato de levedura. .... 76

**Tabela 15** – Anotação de proteínas pelo banco de dados público dbCAN. \* Número total de proteínas anotadas automaticamente disponíveis no banco de dados JGI. \*\* Número de proteínas que apresentam domínios CAZy identificados pelas três ferramentas disponíveis no dbCAN. \*\*\* Número de proteínas entre aquelas com domínios CAZy que possuem peptídeo sinal para exportação (localização extracelular). .... 79

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
2.1 ETANOL COMO FONTE ENERGÉTICA RENOVÁVEL: CONTEXTUALIZAÇÃO HISTÓRICA-ECONÔMICA .....	16
2.2 RESÍDUOS DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO FONTE DE ENERGIA .....	17
2.3 COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR VEGETAL .....	19
2.3.1 Celulose .....	20
2.3.2 Hemicelulose.....	21
2.3.3 Lignina.....	23
2.4 FRACIONAMENTO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA PARA OBTENÇÃO DO ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO .....	24
2.5 POOL ENZIMÁTICO ENVOLVIDO NA DEGRADAÇÃO DE BIOMASSA VEGETAL .....	27
2.5.1 Celulases .....	28
2.5.2 Hemicelulases .....	29
2.5.3 Ligninases .....	30
2.6 FITOPATÓGENOS DA CANA-DE-AÇÚCAR: FONTE DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS .....	30
2.6.1 <i>Sporisorium scitamineum</i> .....	31
2.6.2 <i>Colletotrichum falcatum</i> .....	33
2.6.3 <i>Thielaviopsis paradoxa</i> .....	34
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	36
3.1 OBJETIVO GERAL .....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	37
4.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS .....	37
4.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROCULTIVO .....	37
4.3 ANÁLISE ENZIMÁTICA QUALITATIVA .....	38
4.3.1 Celulase .....	38
4.3.2 Fenoxidases.....	39
4.4 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES).....	40
4.4.1 Substrato .....	40

4.4.2 Inóculo .....	40
4.4.3 Fermentação .....	41
4.4.4 Planejamento experimental.....	41
4.4.5 Obtenção do extrato enzimático.....	43
4.5 ANÁLISE ENZIMÁTICA QUANTITATIVA .....	43
4.5.1 Endoglucanase .....	44
4.5.1.1 Curva padrão de glicose.....	44
4.5.1.2 Determinação da atividade enzimática de endoglucanase .....	44
4.5.2 Celulase total.....	46
4.5.3 Lacase .....	48
4.5.4 Lignina peroxidase .....	48
4.6 QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS .....	49
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
4.8 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> .....	50
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
5.1 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA.....	51
5.2 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE CELULASES E FENOLOXIDASES .....	53
5.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES).....	56
5.3.1 Caracterização granulométrica de bagaço de cana-de-açúcar .....	56
5.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LIGNINA PEROXIDASE.....	57
5.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LACASE.....	58
5.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CELULASES.....	59
5.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	62
5.7.1 Produção de celulases por <i>Thielaviopsis paradoxa</i> .....	62
5.7.2 Produção de celulases por <i>Colletotrichum falcatum</i> .....	70
5.7.3 Síntese geral da atividade de celulases .....	78
5.8 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> .....	79
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>85</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O aumento da demanda de combustíveis para atender o setor de transportes impulsiona cada vez mais investimentos e estudos de instituições públicas e privadas relacionados à otimização da produção de biocombustíveis e inovação no setor, como é o caso do etanol de segunda geração. Nesse contexto, o Brasil, por ser o maior produtor de cana-de-açúcar e também referência mundial na produção de etanol, gera em abundância um subproduto de alta carga energética, o bagaço de cana-de-açúcar, composto essencialmente por lignocelulose. Esse material é utilizado para cogeração de energia por meio da queima e, ainda em nível insignificante, para a produção de biocombustível.

Um dos vieses da obtenção de etanol de segunda geração por fermentação de resíduos lignocelulósicos é a etapa de pré-tratamento, a qual é necessária para a liberação de carboidratos fermentescíveis. Essa etapa é realizada industrialmente empregando-se soluções ácidas ou alcalinas ou então promovendo a expansão das fibras da biomassa por bruscas mudanças de pressão e temperatura no sistema. Tais processos representam alto custo no processo, sendo que a utilização das soluções gera, ainda, grande volume de efluente de difícil tratamento, o que estimula pesquisas acerca da hidrólise de biomassa por enzimas lignocelulolíticas.

Comercialmente, já se tem disponível o extrato enzimático de *Trichoderma reesei* capaz de degradar biomassa rica em celulose. Entretanto, há necessidade de se diversificar o *pool* enzimático do extrato por adição de enzimas provenientes de outras fontes microbianas, visando otimização da liberação de açúcares das cadeias de celulose e hemicelulose e consequente eliminação ou redução das etapas de pré-tratamento necessárias.

Nesse contexto, fitopatógenos representam uma das classes microbianas de maior potencial de excreção de enzimas lignocelulolíticas, visto que esses possuem capacidade de hidrolisar eficientemente os tecidos vegetais que colonizam. Destacam-se os fungos *Sporisorium scitamineum*, *Colletotrichum falcatum* e *Thielaviopsis paradoxa*, que causam doenças em cana-de-açúcar chamadas: carvão, podridão vermelha e podridão do abacaxi, respectivamente.

Diante do exposto, a produção de enzimas lignocelulolíticas eficientes na hidrólise de biomassa *in natura*, é de grande importância tecnológica para a efetiva inclusão do etanol de segunda geração na matriz energética brasileira. Assim, o desenvolvimento do presente estudo consiste na avaliação do potencial de produção dessas enzimas pelos fungos supracitados em fermentação em estado sólido, associada à caracterização do potencial genético dos microrganismos em relação à codificação de enzimas ativas em carboidratos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ETANOL COMO FONTE ENERGÉTICA RENOVÁVEL: CONTEXTUALIZAÇÃO HISTÓRICA-ECONÔMICA

Em resposta à escassez das fontes energéticas não renováveis, a busca por opções sustentáveis, baseadas no uso de matérias-primas abundantes e de regeneração natural, ditas renováveis, é foco de investimentos na área de pesquisa e desenvolvimento em todo o mundo (RASOOL; HEMALATHA, 2016).

Nesse contexto, as fontes de energia renováveis podem ser classificadas em convencional ou moderna. A obtenção de energia renovável convencional é baseada na queima de lenha de desmatamento e nos processos de hidroeletricidade de médio e grande porte (SCHUTZ; MASSUQUETTI; ALVES, 2013). Por outro lado, as fontes modernas englobam os processos de conversão da biomassa, como é o caso da produção de biocombustíveis, sendo o etanol e o biodiesel os principais representantes dessa classe. Os Estados Unidos são o principal produtor mundial de etanol a partir de milho, com uma média de produção de 977 mil barris dia<sup>-1</sup>, seguido pelo Brasil, onde a produção de etanol usa essencialmente cana-de-açúcar como matéria-prima, representando 16,4% demanda brasileira de energia para transporte no ano de 2017, com produção de 460 mil barris dia<sup>-1</sup> (BETA, 2017; EPE, 2018).

O potencial do uso da cana-de-açúcar para produção de energia renovável tem sido reconhecido no Brasil desde 1931, quando passou a ser obrigatória a adição de álcool de cana a gasolina, até 5% de acordo com a sua disponibilidade pelo Decreto-Lei n. 19.717 (BRASIL, 1931). Ainda assim o Brasil continuava dependente de energia não renovável, quando na década de 70, apesar da existência da Petrobrás, o Brasil importava 80% do petróleo que consumia e foi diretamente afetado pelo primeiro choque do petróleo, quando os preços passaram de US\$ 1,9 barril<sup>-1</sup> para US\$ 11,2 barril<sup>-1</sup>. Esse cenário impulsionou a criação do Programa ProÁlcool, em 1973, por meio do Decreto n. 76.593, que visava ampliar o uso de etanol combustível e a substituição gradual da matriz energética por fontes renováveis, contando com a união do setor público e privado para instituição de um dos maiores programas de inovação científica e tecnológica voltada à energia renovável do mundo (CORTEZ et al., 2016).

Inicialmente, o ProÁlcool estabeleceu que 20% de etanol deveriam ser obrigatoriamente adicionados à gasolina, fixou o preço do litro de gasolina conferindo vantagem competitiva ao etanol, forneceu empréstimos a juros baixos para construção de novas unidades produtoras de



álcool e, dentre outros, estimulou o uso de álcool por meio de propagandas oficiais (GEHLING, 2007). Cenário esse que Bastos (2007) evidencia ser responsável pelo aumento de mais de 500% na produção de etanol entre 1975 e 1979. No início da década de 1980, a política do ProÁlcool tornou o preço do etanol inferior ao da gasolina, triplicando sua produção para utilização em carros movidos a álcool.

Já em 1982 com a assinatura do protocolo de Kyoto, fundamentou-se a necessidade de aumento percentual do uso de fontes renováveis a fim de expandir a composição da matriz energética mundial e minimizar as emissões atmosféricas de gases causadores do efeito estufa. Fato esse que estimulou o desenvolvimento das tecnologias e produção voltadas ao mercado do etanol de primeira geração (CAPRIGLIONE, 2007). Em 1984, a produção dos carros a álcool em montadoras, correspondia a 94% da produção total (BASTOS, 2007).

De acordo com Bastos (2007), outro fator de estímulo à produção alcooleira para fins carburantes, foi a introdução de veículos *flexible fuel*, nos anos 2000. A partir de então houve viabilização da utilização de misturas gasolina-álcool com até 100% de álcool (GEHLING, 2007), sendo que no mercado estão disponíveis misturas de gasolina-etanol de 5 (gasolina E5), 10 (E10), 85 (E85) e 100% (E100) de etanol.

A fim de expandir a produção deste biocombustível, atualmente, busca-se pelo máximo aproveitamento da cana-de-açúcar (bagaço e palha), o chamado etanol de segunda geração. De acordo com Andrade (2017), a tecnologia do etanol de segunda geração poderá dobrar a quantidade de etanol produzida por unidade de área plantada, mantendo a autossuficiência energética do país. Também, estima-se que o etanol de segunda geração de bagaço de cana, substituiria 3,4% do consumo global de gasolina (KIM; DALE, 2004).

## 2.2 RESÍDUOS DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO FONTE DE ENERGIA

O Brasil encontra-se atualmente na posição de maior produtor mundial de cana-de-açúcar, tendo cerca de 8,73 milhões hectares de área colhida na safra de 2017/18, que foram utilizados para produção de mais de 37 milhões de toneladas de açúcar e 27 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2018).

Para a produção de álcool e açúcar, ainda em campo, os colmos de cana-de-açúcar são separados das folhas, gerando a primeira classe de resíduos significativos: a palha de cana. Na indústria sucroalcooleira, os colmos são submetidos ao processo de extração do caldo – enviado aos demais processos até geração de açúcar e/ou etanol – originando o subproduto chamado de

bagaço (OGATA, 2013). Segundo Nascimento (2007), para cada tonelada de cana processada, geram-se aproximadamente 280 kg de bagaço úmido. No Brasil, durante a safra de 2013/14, de acordo com estimativas da CONAB (2017), foram geradas 173.329.000 toneladas de bagaço de cana-de-açúcar.

Atualmente, o bagaço gerado pelas usinas sucroalcooleiras é queimado em caldeiras e convertido em energia na forma de vapor – utilizado durante a concentração do caldo de cana afluente – e elétrica – consumida durante os processos da usina – nas etapas de cogeração de energia (SOUZA; AZEVEDO, 2006), entretanto um volume excedente de bagaço não é completamente utilizado e poderia ser destinado a outros fins. Já a palha da cana-de-açúcar é mantida no campo como proteção do solo (TROMBETA; CAIXETA FILHO, 2017).

De acordo com Pauly e Keegstra (2008), tanto a palha quanto o bagaço da cana-de-açúcar são materiais ditos lignocelulósicos, por terem composição majoritária formada pelos constituintes da parede celular vegetal, abordada no item 2.3. Essa característica os torna como potenciais fontes para obtenção de produtos de valor agregado (PITARELO, 2007), como por exemplo, seu uso na suplementação de ração animal e a completa hidrólise em mono e dissacarídeos, para fermentação e produção de etanol de segunda geração (VILELA, 2013).

As tecnologias para produção de etanol de segunda geração enfrentam diversos gargalos de viabilidade e competitividade comercial, como exemplo se tem os dispendiosos processos de pré-tratamento da biomassa *in natura* e a eficiência da fermentação de hexoses e pentoses liberadas das frações de celulose e hemicelulose (NIGAM; SINGH, 2011). Devido a isso tem-se estabelecido no Brasil inúmeras pesquisas e políticas inerentes ao tema, a fim de se integrar efetivamente a tecnologia de produção na matriz energética (LORENZI, 2018).

Há em desenvolvimento programas e políticas com o objetivo de contribuir direta ou indiretamente com a pesquisa, desenvolvimento e produção de bioetanol no Brasil. Em 2006 houve a criação da Embrapa Agroenergia, objetivando contribuições na obtenção e caracterização de matérias-primas para a produção de etanol de segunda geração, bem como no desenvolvimento de enzima capaz de fermentar pentoses. A instituição do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) permitiu a realização de estudos inerentes a tecnologia de biocombustíveis, para minimização dos gargalos e deficiências do bioetanol e aumento de sua produção em território brasileiro (LORENZI, 2018).

Já no setor privado notam-se estímulos referentes a produção do biocombustível em larga escala. A Raízen S.A., uma das principais empresas privadas produtoras de etanol de cana-de-açúcar, possui planta de etanol celulósico localizada em Piracicaba (SP), sendo que o processo utiliza somente o bagaço como matéria-prima, explosão a vapor para o pré-tratamento, hidrólise

enzimática com enzimas advindas da empresa Novozymes e fermentação de pentoses e hexoses. A planta industrial tem capacidade de produzir aproximadamente 40 milhões de litros de etanol celulósico por ano (CORRÊA, 2014).

Outra iniciativa privada diz respeito a planta industrial de etanol de segunda geração da GranBio Investimentos S.A, que tem capacidade de produzir cerca de 82 milhões de litros por ano. Nessa planta o processo utiliza bagaço e palha de cana-de-açúcar como matéria-prima, alta temperatura e pressão para o pré-tratamento hidrotérmico da biomassa, enzimas da empresa Novozymes para a hidrólise e leveduras específicas para a fermentação de pentoses e hexoses (CORRÊA, 2014; SOARES, 2016).

### 2.3 COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR VEGETAL

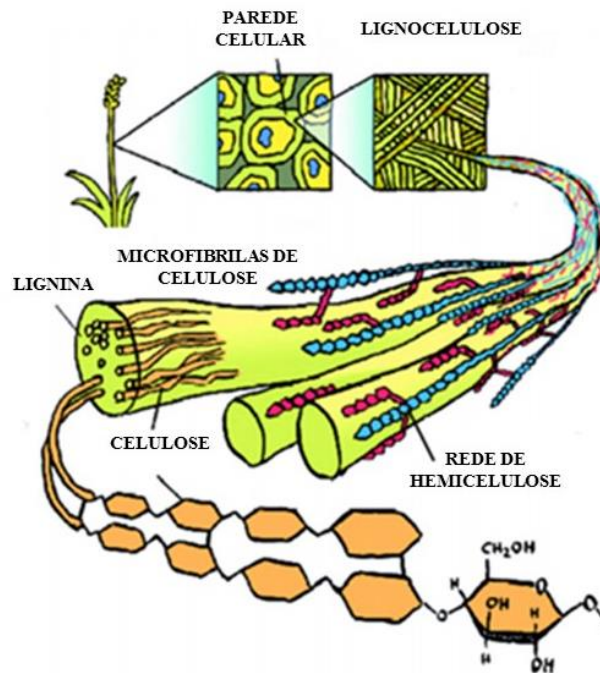
Na planta, a parede celular tem função de manter a morfologia da célula, proporcionar rigidez contra choques mecânicos, controlar a expansão celular, regular a comunicação e o transporte intracelular e atuar na proteção da célula contra patógenos (BRAGATTO, 2007).

Majoritariamente, os resíduos lignocelulósicos são formados por parede celular, a qual é composta por fibras de celulose, polissacarídeos, proteínas e lipídeos, formando três camadas: lamela média, parede primária e secundária (PAIS; BARROSO, 2010). A composição da parede celular é dinâmica, diferindo entre linhagens vegetais e também com a idade fisiológica da planta (SARKAR; BOSNEAGA; AUER, 2009).

A lamela média é a região de ligação entre células adjacentes e tem composição formada por pectina e lipídeos. A parede primária se caracteriza por estado transitório de expansão celular, permitindo crescimento difuso ou orientado da célula. Sua constituição aproximada é dada por (%) celulose (30), hemicelulose (30), pectina (30) e proteínas estruturais (10) (RAVEN, 2001; APPEZZATO-DA-GLORIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006).

Quando a célula vegetal inicia o processo de diferenciação celular, após o término do crescimento, a parede primária recebe incrementos de celulose, hemicelulose, lignina e reduz a porcentagem de pectina. A composição final – (%) celulose (50-80), hemicelulose (5-30), lignina (15-35) e ausência de pectina – caracteriza a parede celular secundária (RAVEN, 2001), evidenciada na Figura 1. O bagaço da cana-de-açúcar, por sua vez, contém de 25 a 40% de celulose, 20 a 35% de hemicelulose e 15 a 35% de lignina (COWLING; KIRK, 1976), porcentagens essas, que variam de acordo com a variedade e idade da planta, características do solo e condições de cultivo (SILVA, 2010).

Figura 1 – Estrutura da parede celular secundária. Hemicelulose é mostrada em azul e rosa, microfibrilas de celulose em alaranjado e a lignina de forma incorporada na hemicelulose.



Fonte: Adaptado de Rosgaard & Meyer (2007).

As microfibrilas de celulose são ligadas às cadeias de hemicelulose por ligações de hidrogênio e ao final da diferenciação celular ocorre o processo de lignificação. Nesse momento ocorre a formação de complexos carboidrato-lignina por meio de ligações covalentes e não-covalentes entre a lignina e as cadeias de hemicelulose (LAWOKO; HENRIKSSON; GELLERSTEDT, 2005; ROSGAARD; MEYER, 2007). De acordo com Carpita (1996) e Vogel (2008), no caso das angiospermas, as microfibrilas de celulose, juntamente com a hemicelulose e a lignina, são incorporadas em matriz de pectina e proteínas estruturais.

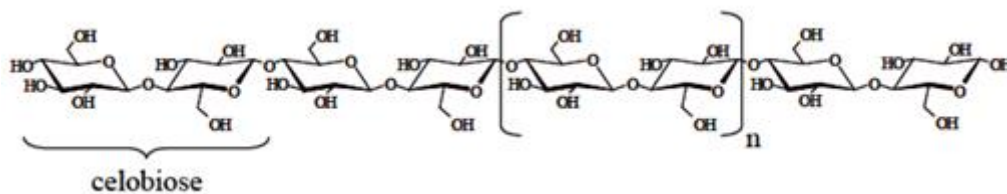
Especificamente a parede celular de monocotiledôneas comelinídeas, como por exemplo a cana-de-açúcar, contém glucuronoarabinoxilano como o principal polissacarídeo não-celulósico e são as únicas plantas com ligação mista de  $\beta$ -1,3(1,4)-glucanos, indicando singularidades entre as paredes celulares vegetais de diferentes linhagens (KING et al., 2011).

### 2.3.1 Celulose

Monômeros de D-glicose unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 dão origem ao polissacarídeo mais abundante na natureza, a celulose (ARANTES; SADDLER, 2010).

A celulose (Figura 2) é um polímero de cadeia linear que se arranja paralelamente com outras cadeias por meio múltiplas ligações de hidrogênio inter e intracadeias, formando tubos chamados de microfibrilas (MATULOVA et al., 2005). Ao formar as microfibrilas de celulose, o número de hidroxilas disponíveis para interagir com a água diminui, assim a celulose apresenta característica de insolubilidade, apesar de sua polaridade (SOUZA, 2012). A forte interação entre as moléculas de celulose confere alto grau de cristalinidade no componente (MARCHESSAULT; HOWSMON, 1957).

Figura 2 – Cadeia linear de celulose formada pela união de dímeros de D-glicose chamados de celobiose.



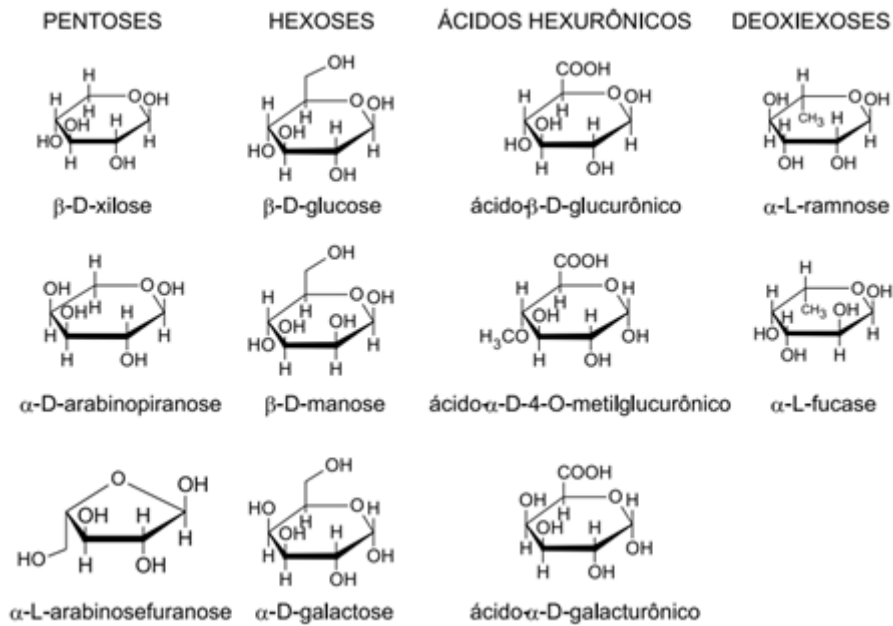
Fonte: Adaptado de Ogata (2013).

A consequência da cristalinidade das moléculas de celulose é a alta resistência à tração, à solvatação, ao alongamento e ao ataque hidrolítico, ocasionando sua lenta digestão enzimática (D'ALMEIDA, 1981; VOET, VOET, 1995). O índice de cristalinidade, referente a reatividade do substrato, o grau de polimerização, referente ao número médio de monômeros, juntamente com a proporção de lignina representam uma barreira ao uso de substratos lignocelulósicos em diversas aplicações. A fim de minimizá-la, pode-se empregar processos de tratamento da celulose, como por exemplo a redução física do tamanho da biomassa, diminuindo o índice de cristalinidade e favorecendo a degradação enzimática (D'ALMEIDA, 1981; ADITIYA et al., 2016).

### 2.3.2 Hemicelulose

A cadeia polimérica de hemicelulose é constituída por uma combinação aleatória de diferentes monômeros (Figura 3), incluindo pentoses ( $\beta$ -D-xilose,  $\beta$ -L-arabinose), hexoses ( $\beta$ -D-glicose,  $\beta$ -D-manose,  $\beta$ -D-galactose) e ácidos urônicos (D-glucurônico, D-galacturônico,  $\alpha$ -D-4-O-metilglucurônico). O polímero heterogêneo formado se liga, então, às cadeias de celulose (MORAIS; NASCIMENTO; MELO, 2005).

Figura 3 – Estrutura dos monômeros constituintes de cadeias de hemicelulose.

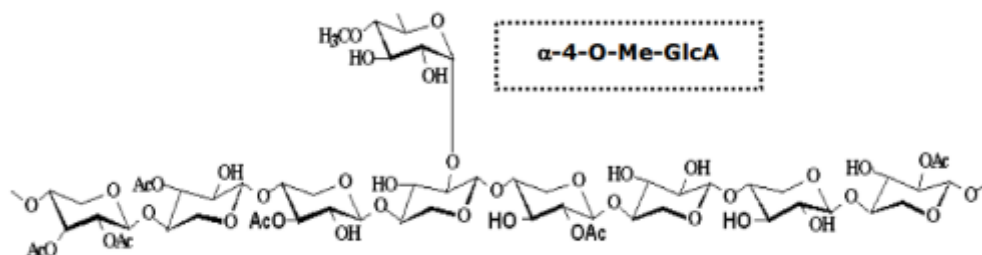


Fonte: Morais, Nascimento & Melo (2005).

Nas angiospermas, por exemplo a cana-de-açúcar, o principal monômero constituinte da cadeia principal da hemicelulose é a xilose, caracterizando uma xilana (Figura 4). Já as substituições – originando as ramificações da cadeia – são variáveis dependendo do material vegetal (SOUZA, 2012).

O polímero hemicelulósico formado apresenta considerável grau de ramificação e, portanto, baixa cristalinidade, promovendo uma melhor eficiência ao ataque hidrolítico por enzimas de degradação (PEREIRA JUNIOR, COUTO, ANNA, 2008). Tal fato, representa a principal diferença entre cadeias de celulose e hemicelulose (PÉREZ et al., 2002).

Figura 4 – Estrutura de cadeia de hemicelulose formada por moléculas de D-xilose, acetil (Ac) e ácido  $\alpha$ -D-4-O-metilglucurônico ( $\alpha$ -4-O-Me-GlcA).

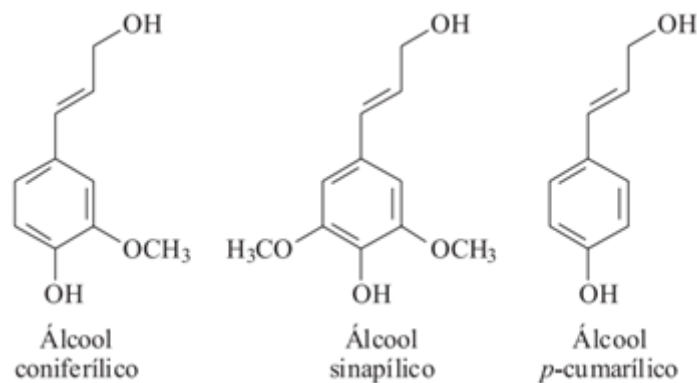


Fonte: Adaptado de Pereira Junior, Couto & Anna (2008).

### 2.3.3 Lignina

Na planta, a lignina é o constituinte que fornece rigidez à parede celular, servindo como suporte estrutural, impermeabilizante e resistência aos insetos e a degradação microbiana (TUOMELA et al., 2000). Estruturalmente é definida como um polímero amorfo, altamente complexo e recalcitrante, formado principalmente por moléculas de fenilproprano, como por exemplo: álcool coniferílico, sinapílico e *p*-cumarílico, mostrados na Figura 5 (NASCIMENTO, 2007).

Figura 5 – Estrutura química dos principais precursores das moléculas de lignina.



Fonte: Barbosa, Maltha & Silva (2008).

A síntese da lignina se dá pela geração de radicais livres, liberados durante o processo de polimerização desidrogenativa dos álcoois precursores supracitados, formando as unidades básicas: guaiacil, siringil, *p*-hidrofenil (GRABBER et al., 2004).

O processo de inclusão da lignina ocorre no último estágio de desenvolvimento da parede celular vegetal e denomina-se lignificação. O resultado é uma estrutura heterogênea, altamente diversificada, cujas unidades básicas são formadas por ligações C-C e ariléter ( $\beta$ -O-4 e  $\alpha$ -O-4) (PÉREZ et al., 2002; MARABEZI, 2009).

A lignina se associa com as cadeias de hemicelulose tanto por interações físicas como por ligações covalentes (SOUZA, 2012). Nas gramíneas – família da cana-de-açúcar – há teores substanciais de ácido ferúlico esterificados e eterificados na parede celular vegetal, que se acredita ser uma molécula que permite a interação da lignina com os demais constituintes. Outra diferença entre a composição da lignina das gramíneas é a proporção significativa de guaiacil (95%) e *p*-hidroxifenil e somente vestígios de siringil, sendo que os teores de siringil, guaiacil

e p-hidroxifenil nas gramíneas varia de acordo com a idade e tecido da planta e também difere entre as paredes primária e secundária (GRABBER et al., 2004).

Esse polímero é considerado um material aglutinante, capaz adsorver enzimas que possam atuar na degradação da biomassa. Ao se ligar às celulasas (item 2.5.1), por exemplo, a lignina e seus derivados formam uma ligação irreversível não-produtiva que limita o acesso das enzimas às cadeias de celulose, minimizando assim o processo de liberação de açúcares fermentescíveis. Para reverter esse quadro é necessário o emprego de maior número de celulasas no processo de sacarificação (HOGSETT et al., 2010; LIMAYEM; RICKE, 2012). A hidrofobicidade da lignina também representa um entrave na ação das celulasas, visto que desse modo, a superfície acessível da celulose é diminuída (DAMASCENO, 2010).

#### 2.4 FRACIONAMENTO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA PARA OBTENÇÃO DO ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Considerado um biocombustível promissor, o etanol de segunda geração é obtido por meio do uso de biomassa vegetal, como o bagaço e a palha de cana-de-açúcar devidamente pré-tratados, no processo produtivo tradicional de etanol de primeira geração.

O uso de biomassa para obtenção de energia é atrativo, pois segundo Demirbas (2007), trata-se de um recurso renovável de fácil obtenção, apresenta significativo potencial econômico, e especialmente, não resulta em liberação líquida de dióxido de carbono, visto que o conteúdo carbônico emitido pela queima do combustível resultante é derivado daquele consumido pelas plantas durante seu crescimento, consistindo no ciclo útil de CO<sub>2</sub>.

No caso do etanol de segunda geração a partir de biomassa de cana-de-açúcar, a matéria-prima é convertida em açúcares fermentescíveis por processos de hidrólise. Os carboidratos simples seguem processo de fermentação similar à obtenção de etanol de primeira geração (RASTOGI; SHRIVASTAVA, 2017). Como os resíduos lignocelulósicos são compostos por cadeias diferentes – celulose, hemicelulose e lignina – faz-se necessário realizar o fracionamento da biomassa, com intenção de se obter insumos fermentescíveis para produção de etanol.

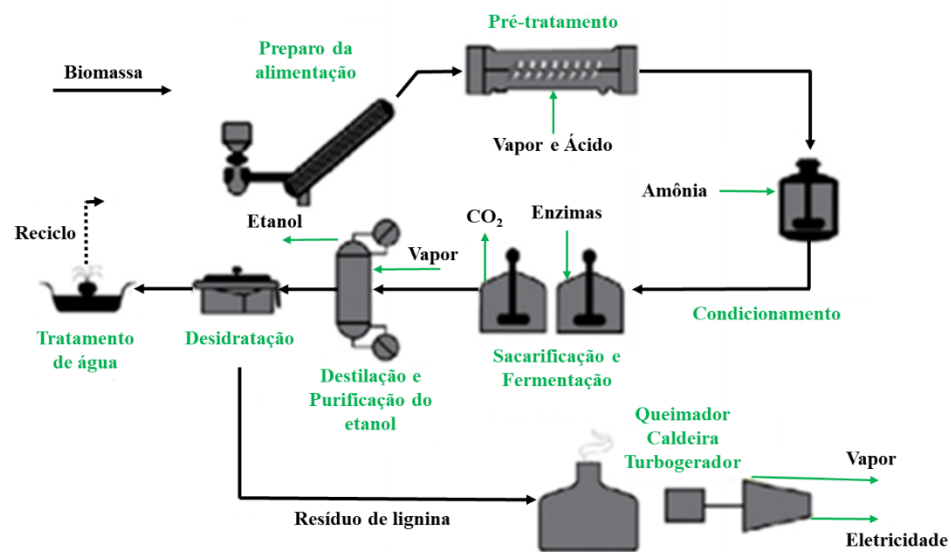
O primeiro passo do fracionamento consiste no pré-tratamento, onde o principal objetivo a ser alcançado é a desorganização do complexo lignocelulósico, a fim de se aumentar a susceptibilidade à hidrólise enzimática de celulasas (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; ADITIYA et al., 2016). Esse processo por ser classificado em físico (fragmentação); físico-químico



(explosão a vapor); químico (hidrólise por ácidos diluídos e oxidativa); ou biológico (uso de enzimas microbianas) (PEREIRA JUNIOR; COUTO; ANNA, 2008; ADITIYA et al., 2016).

O processo de obtenção simplificado de etanol de segunda geração por fermentação de bagaço ou palha de cana-de-açúcar é mostrado na Figura 6.

Figura 6 – Fluxograma simplificado da obtenção de etanol de segunda geração por fermentação de bagaços ou palhas.



Fonte: Lima (2011).

O pré-tratamento com ácidos diluídos promove a despolimerização da hemicelulose, melhora o ataque enzimático às cadeias de celulose e a precipitação da lignina, originando carboidratos em solução (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; ADITIYA et al., 2016). Outra forma utilizada para pré-tratar a biomassa é a expansão das fibras por amônia, que diminuirá o grau de cristalinidade da molécula e promoverá a solubilização da lignina (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; SANTOS et al., 2012). Esses métodos são considerados economicamente inviáveis devido ao custo dos solventes e equipamentos de alta resistência, portanto, utiliza-se majoritariamente pré-tratamentos à base de água, seja no estado de vapor ou no estado líquido (MOSIER et al., 2005).

A opção de pré-tratamento utilizando água quente no estado líquido em condições supercríticas, chamado de hidrotérmico, maximiza a solubilização da fração de hemicelulose em oligossacarídeos, enquanto minimiza a formação de monômeros de açúcares. Esse fato é positivo pois, em condições supercríticas, a água forma um ambiente propício para a

degradação dos monossacarídeos em furanos e ácidos indesejáveis, reduzindo o rendimento de açúcares fermentescíveis e formando produtos que atuam como inibidores da fermentação (MOSIER et al., 2005; ZENG et al., 2007). O pré-tratamento hidrotérmico também favorece a atividade das enzimas utilizadas no processo posterior de sacarificação, tornando a celulose acessível na ausência de compostos inibitórios (ZENG et al., 2007; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

No pré-tratamento denominado explosão a vapor, ocorre a solubilização da hemicelulose e consequente disponibilização de pentoses para fermentação alcoólica (SOCCOL et al., 2010). Nesse processo, partes da hemicelulose hidrolisam formando ácidos, decorrente da composição altamente acetilada do polímero, que podem catalisar a hidrólise adicional da hemicelulose em um processo denominado “auto-quebra”. Com tal pré-tratamento, pode se ter recuperação de carboidratos na faixa de 45 a 65% e quando esse é catalisado pela adição de gases ácidos, se tem de 80 a 90% de recuperação dos açúcares na fase líquida (PEREIRA JUNIOR; COUTO; ANNA, 2008; ADITIYA et al., 2016).

Em comparação com o pré-tratamento hidrotérmico, a desvantagem da explosão a vapor é que os produtos solubilizados da hemicelulose e da lignina são encontrados em maiores concentrações, devido a menor quantidade de água no estado líquido e consequente menor diluição do meio. Tais produtos, devido às condições extremas do sistema, são convertidos a aldeídos tóxicos às leveduras de fermentação, como o furfural e o hidroximetilfurfural (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). De ambos os processos restam ainda frações de celulose e lignina polimerizadas (ZENG et al., 2007; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Das frações restantes, a lignina pode ser totalmente separada – consistindo na deslignificação da biomassa – pelo uso de solventes catalisados por ácidos inorgânicos (ZHAO; CHENG; LIU, 2009). Entretanto, a utilização industrial deste método é inviável devido à volatilidade e custo dos solventes e ao custo da planta industrial com alta resistência a corrosividade (ADITIYA et al., 2016).

A deslignificação também pode ser obtida por meio de hidrólises oxidativas utilizando peróxido de hidrogênio em meio alcalino, esse processo gera moléculas altamente reativas que degradam a lignina. Outro agente oxidante é o ácido peracético, que libera ácidos dicarboxílicos e lactonas. A principal desvantagem da oxidação é a possível formação de inibidores microbianos e substratos não fermentescíveis (PEREIRA JUNIOR; COUTO; ANNA, 2008; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Para o tratamento da celulose restante se emprega o processo de sacarificação da biomassa resultante do processo de pré-tratamento e deslignificação (RASTOGI; SHRIVASTAVA,

2017). A sacarificação pode ser feita utilizando processos químicos, com ácidos diluídos ou concentrados, bem como por hidrólise enzimática (DEMIRBAS, 2007). A sacarificação ácida gera substâncias tóxicas que inibem os microrganismos que atuam no processo fermentativo e, portanto, necessita de processo de destoxificação para posterior fermentação (PEREIRA JUNIOR; COUTO; ANNA, 2008). Outros problemas relacionados à hidrólise ácida, são o custo de manutenção dos equipamentos corroídos e a possibilidade dos ácidos empregados degradarem os açúcares gerados, devido a hostilidade do ambiente (ADITIYA et al., 2016).

No método de hidrólise enzimática, se utiliza um complexo de enzimas capazes de promover a degradação dos polímeros de celulose e resquícios de hemicelulose, resultando em caldos ricos em carboidratos fermentescíveis. O produto de celulases comercial, Celluclast®, destinado a tal fim e com eficiente despolimerização das cadeias de celulose, é proveniente do fungo *T. reesei* (ROSGAARD; MEYER, 2007; SEIBOTH; IVANOVA; SEIDL-SEIBOTH, 2011). Esse fungo secreta diversas enzimas envolvidas na degradação de biomassa celulósica. Entre elas, cinco enzimas  $\beta$ -1,4-endoglucanases (EG I - EG V), duas  $\beta$ -1,4-exoglucanases (CBH I e CBH II), duas xilanases (XYN I e XYN II), uma  $\beta$ -glicosidade, uma  $\alpha$ -L-arbinofuranosidase, uma acetil-xilano-esterase, uma  $\beta$ -mananase e uma  $\alpha$ -glucuronidase (VINZANT et al., 2001).

Uma alternativa aos processos de pré-tratamento supracitados é o emprego de um *pool* enzimático capaz de promover a hidrólise completa do material lignocelulósico. Apesar de atualmente serem aplicadas enzimas em biomassas pré-tratadas, há necessidade de se melhorar o extrato existente – suplementando com a diversidade enzimática de outros microrganismos produtores – com o objetivo de empregá-lo para despolimerização de biomassa *in natura*. O desenvolvimento tecnológico de hemicelulases e ligninases eficientes ainda carece de estudos (ROSGAARD; MEYER, 2007; KING et al., 2011).

## 2.5 POOL ENZIMÁTICO ENVOLVIDO NA DEGRADAÇÃO DE BIOMASSA VEGETAL

A degradação da biomassa vegetal não submetida a pré-tratamento, dita *in natura*, consiste no pleno desenvolvimento tecnológico. Para tal fim, todas as enzimas necessárias à hidrólise enzimática e à fermentação a etanol devem ser produzidas no mesmo biorreator por um único organismo (RASTOGI; SHRIVASTAVA, 2017) ou então por diferentes microrganismos com capacidade de se desenvolver em sinergia.

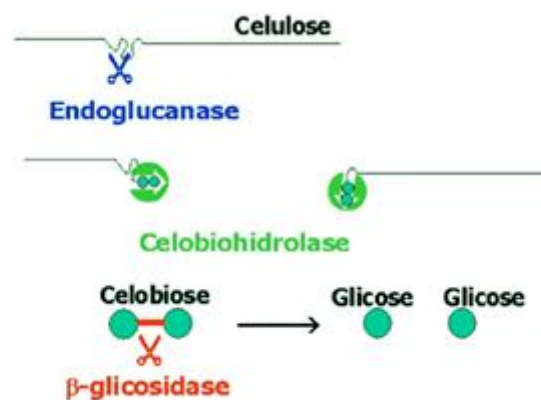
Com as ferramentas da biologia molecular há possibilidade de produzir proteínas recombinantes para todas as atividades enzimáticas necessárias – enzimas lignocelulolíticas e

fermentativas de pentoses e hexoses – em um único microrganismo tolerante às condições industriais. Com o desenvolvimento de tal bioprocesso, se atinge a plena evolução das tecnologias de conversão de biomassa lignocelulósica a etanol de segunda geração (PEREIRA JUNIOR; COUTO; ANNA, 2008).

### 2.5.1 Celulases

Para romper as ligações químicas da celulose e liberar carboidratos simples, os microrganismos ditos celulolíticos sintetizam um conjunto de enzimas denominadas celulases. De modo geral, as celulases apresentam especificidade por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 e atuam de modo sinérgico (Figura 7) (LYND et al., 2002).

Figura 7 – Ação catalítica conjunta de celulases para hidrólise enzimática de celulose.



Fonte: Ogeda & Petri (2010).

A hidrólise primária é realizada em conjunto por enzimas endo e exoglucanases. As endoglucanases (EC 3.2.1.4) rompem randomicamente as cadeias de celulose em sítios amorfos internos diminuindo o grau de polimerização, originando unidades redutoras que servem de substratos para as exoglucanases (BARCELOS et al., 2015; CAO; TAN, 2002). Dentre as endoglucanases destaca-se a carboximetilcelulase (CMCase), que origina oligossacarídeos de vários tamanhos (LYND et al., 2002; MENEZES; BARRETO, 2015).

Entre as exoglucanases (EC 3.2.1.91), destacam-se as celobiohidrolases, que atuam de modo a liberar celobiose da extremidade redutora ou não-redutora da celulose cristalina. A ação catalítica destas enzimas promove maior taxa de hidrólise da celulose, isso porque aumenta o acesso das celulases em regiões cristalinas (ZHANG; LYND, 2004). Entretanto, a ação das

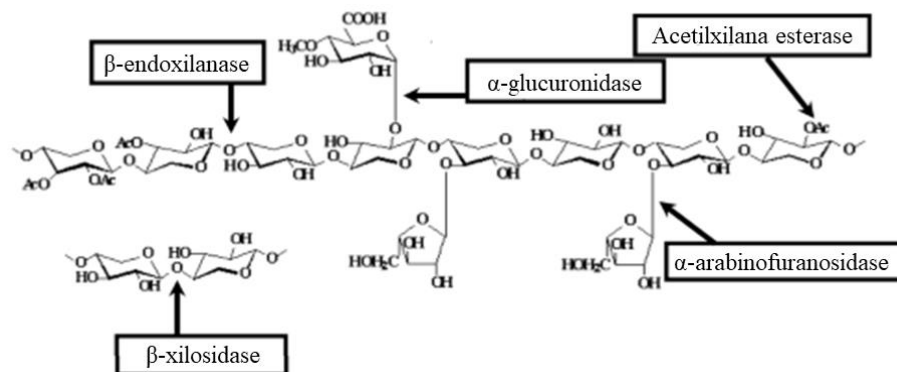
celobiohidrolases é inibida por altas concentrações de celbiose (ROSGAARD; MEYER, 2007; PEREIRA JUNIOR; COUTO; ANNA, 2008).

O segundo mecanismo de sinergia ocorre entre as celbiohidrolases e as  $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21), que agem de modo a diminuir a concentração de celbioses solúveis, originando moléculas de glicose (ROSGAARD; MEYER, 2007). As  $\beta$ -glucosidases também convertem oligossacarídeos com menos de 7 carbonos à glicose (BARCELOS et al., 2015).

### 2.5.2 Hemicelulases

A heterogeneidade das cadeias de hemicelulose requer para sua solubilização a atuação de um consórcio de enzimas (SAHA, 2003), uma vez que esta fração é composta majoritariamente por xilose, arabinose e ácido glucurônico. O complexo enzimático responsável pela despolimerização da hemicelulose é formado por  $\beta$ -endoxilânase,  $\beta$ -xilosidase,  $\alpha$ -arabinofuranosidase,  $\alpha$ -glucuronidase e acetilxilana esterase, conforme mostra a Figura 8 (MENEZES; BARRETO, 2015).

Figura 8 – Ação enzimática de enzimas pertencentes ao complexo das hemicelulases.



Fonte: Adaptado de Pereira Junior, Couto & Anna (2008).

A redução do grau de polimerização da hemicelulose é realizada pela enzima  $\beta$ -endoxilânase (EC 3.2.1.8), que atua rompendo ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 e liberando xilo-oligossacarídeos curtos (SHALLOM; SHOHAM, 2003; MENEZES; BARRETO, 2015). As  $\beta$ -xilosidases (EC 3.2.1.37) são responsáveis pela quebra de dímeros de xilobiose e xilo-oligossacarídeos curtos, dando origem a unidades de xiloses (DELICHEVA; DOBREV; PISHTIYSKI, 2008). A remoção de resíduos de arabinose – substituídos no carbono 3 das unidades de xilose – ocorre por intermédio da enzima  $\alpha$ -arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55). As

$\alpha$ -glucuronidasas (EC 3.2.1.139) hidrolisam ligações entre ácido 4-O-metil-D-glucurônico e os resíduos de xilose (SAHA, 2003). Acetilxilana esterase (EC 3.1.1.72) hidrolisa as substituições acetil nas moléculas de xilose, liberando ácido acético. Já a feruloil esterase (EC 3.1.1.73) rompe a ligação éster das substituições de arabinose e ácido ferúlico dos resíduos de arabinose (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2000). Após a hidrólise sinérgica das hemicelulases, os carboidratos fermentescíveis do polímero de hemicelulose são completamente liberados.

### 2.5.3 Ligninases

Os sistemas enzimáticos necessários para degradação de lignina incluem lignina peroxidase (EC 1.11.1.14), manganês peroxidase (EC 1.11.1.13) e lacase (EC 1.10.3.2). Essas enzimas são fenoloxidasas, que atuam na transferência de elétrons de um doador (lignina) para o oxigênio (PALONEN, 2004).

A lignina peroxidase necessita de  $H_2O_2$  para sua ação catalítica de oxidar os anéis aromáticos da lignina, tanto os fenólicos quanto os não-fenólicos. Como resultado de sua ação oxidativa sucessiva, ligações C-C e C-O são rompidas, despolimerizando a molécula de lignina (SILVA, 2006; MENEZES; BARRETO, 2015).

A manganês peroxidase é encontrada em quase todos os fungos degradadores de lignina. Sua ação catalítica é similar a lignina peroxidase, ocasionando oxidação dos anéis aromáticos (fenólicos e não-fenólicos) da lignina. Inicialmente há a oxidação de  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$  – originando  $H_2O_2$  – essa molécula formada é altamente reativa e por isso se complexa com ácidos orgânicos de modo a se estabilizar. Posteriormente, o  $Mn^{3+}$  quelado atua como mediador redox e oxida um substrato aromático, gerando radicais fenoxi (HOFRICHTER, 2002).

Quanto às lacases, a degradação da lignina ocorre por meio da oxidação dos fenóis pela abstração de um elétron, medida pela redução de  $Cu^{2+}$  a  $Cu^+$ , que por sua vez reduz  $O_2$  a  $H_2O_2$  – disponível para atuação das demais ligninases (PALONEN, 2004).

## 2.6 FITOPATÓGENOS DA CANA-DE-AÇÚCAR: FONTE DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS

As doenças que acometem plantas representam um impasse para obtenção de altos rendimentos e boa qualidade vegetal. No caso da cana-de-açúcar, existem mais de 200 doenças identificadas e cerca de 58 dessas já foram relatadas em território brasileiro. De modo geral,

fitopatologias de cana causam diminuição do teor de sacarose e da produção do cultivar (ROSSETTO; SANTIAGO, 2016; AFONSO, 2017).

Dentre as doenças de maior importância no setor sucroalcooleiro, destacam-se aquelas causadas por patógenos bacterianos e fúngicos. Os gêneros de bactéria: *Acidovorax*, *Pectobacterium*, *Herbaspirillum*, *Leifsonia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*; e os gêneros fúngicos: *Sporisorium*, *Colletotrichum*, *Thielaviopsis* constituem os microrganismos de maior impacto em cultivares de cana-de-açúcar (MEHNAZ, 2013).

Os fungos fitopatogênicos colonizam tecidos meristemáticos e para tal provocam a degradação do material vegetal pela excreção de inúmeras enzimas lignocelulolíticas (SANTOS, 2013). Esses organismos estão adaptados às condições da biomassa onde habitam, reduzindo os problemas de inibição enzimática por componentes da parede celular vegetal, principalmente da lignina (BERLIN et al., 2005). Tais fatos ressaltam o potencial dos fitopatógenos à exploração biotecnológica para a síntese de enzimas lignocelulolíticas.

#### 2.6.1 *Sporisorium scitamineum*

A doença causada pelo fungo *S. scitamineum* se caracteriza pela formação de uma estrutura na forma de “*chicote*” a partir do meristema primário das plantas suscetíveis infectadas, onde os esporos do fungo, chamados de teliósporos, se diferenciam dando aspecto de fuligem, o que dá origem ao nome da doença de “*carvão da cana-de-açúcar*” (Figura 9A). A doença já foi descrita em diversas áreas produtoras (PLANTWISE, 2018), tendo como característica plantas raquíticas com folhas e colmos mais finos, touceiras com superbrotamento e perdas no teor de sacarose (KIMATI et al., 1997; BUENO, 2010; SANTOS, 2013; QUE et al., 2014). Estima-se que as perdas de produtividade causadas pela infecção por *S. scitamineum* sejam de 30 a 40% (MEHNAZ, 2013).

A disseminação da doença ocorre principalmente pelo vento, que destaca e dispersa os teliósporos do chicote. Outras formas de dissipação é o plantio de colmos com gemas laterais infectadas por esporos dormentes e também pelo carregamento de esporos no corpo de insetos que acometem as plantações de cana-de-açúcar (MEHNAZ, 2013).

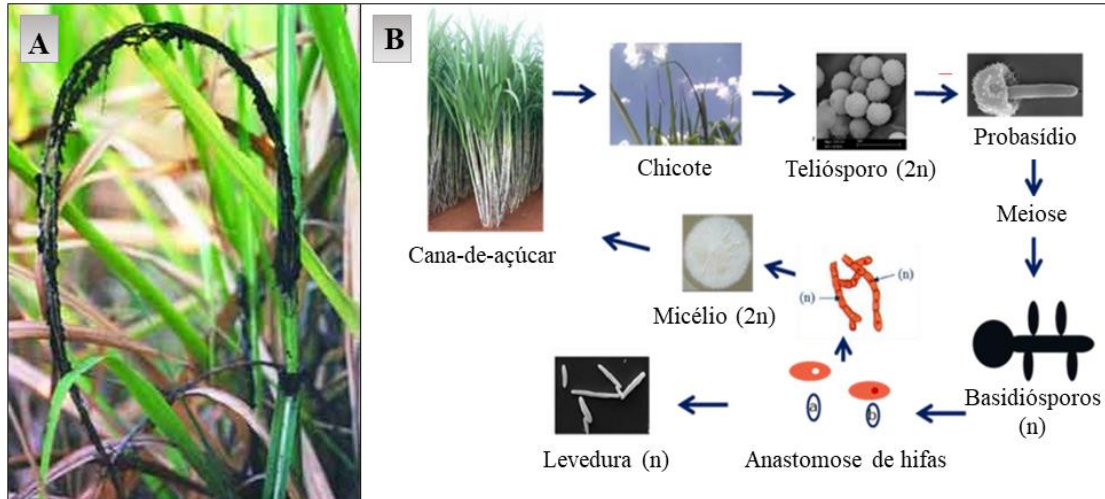
*S. scitamineum* pertence ao filo Basidiomycota, classe Ustilaginomycetes, ordem Ustilaginales e família Ustilaginaceae. Trata-se de um fungo dimórfico – variando entre fase haplóide (levedura) e dicariótica (micélio) – sendo que a penetração no meristema da planta

hospedeira é realizada por hifas dicarióticas através de tecidos não diferenciados, como gemas e folhas emergentes (KIMATI et al., 1997; BUENO, 2010).

O processo inicial de infecção se inicia com a germinação de teliósporos na epiderme das gemas e após a formação da hifa dicariótica a planta é colonizada de forma sistêmica até que ocorra a formação do chicote e esporogênese (SANTOS, 2013).

Os teliósporos são esporos de resistência dicarióticos ( $2n$ ), que ao germinarem – na planta de cana hospedeira – originam um pró-basídio. Após cariogamia e meiose, há formação de basidiósporos compatíveis ( $n$ ), ou seja, com *mating-types* opostos. Os basidiósporos compatíveis promovem anastomose de hifas, formando uma fase micelial dicariótica ( $2n$ ) e infecciosa (Figura 9B). Assim, a patogenicidade é associada à interação do fungo com a planta hospedeira (KIMATI et al., 1997; KIMIT, 2014; QUE et al., 2014).

Figura 9 – *Sporisorium scitamineum* e a doença do carvão da cana-de-açúcar. A) Estrutura na forma de chicote onde ocorre a dispersão de esporos do fungo, sua ocorrência é característica típica de plantas suscetíveis infectadas pelo fungo. B) Ciclo da doença do carvão da cana-de-açúcar: esporos ( $2n$ ) formados no chicote germinam dando origem ao probasídio, que por meiose dá origem a basidiósporos ( $n$ ). A formação da hifa dicariótica ( $2n$ ) ocorre com a anastomose de hifas de células de *mating-types* opostos.



Fonte: Adaptado de Reis (2012); Agrolink (2015).

O genoma completo do fungo *S. scitamineum* encontra-se sequenciado e depositado em bancos de dados públicos (QUE et al., 2014; TANIGUTI et al., 2015). Genes relacionados à quebra da parede celular vegetal foram identificados durante o cultivo *in vitro* da levedura e estão classificados entre os genes mais expressos durante a interação com a planta hospedeira, entre eles estão endo e exoglucanases, lacases e hemicelulases (TANIGUTI et al., 2015), indicando o potencial uso dessas linhagens para produção de enzimas lignocelulolíticas.



### 2.6.2 *Colletotrichum falcatum*

A “podridão vermelha” é uma doença fúngica causada pelo ascomiceto hemibiotrófico *C. falcatum*, sendo descrita na maioria dos países onde a cana-de-açúcar é cultivada (JAMES, 2004). É de significativa importância devido às perdas de 50 a 70% dos teores de sacarose, quando acometida juntamente com brocas da cana (*Diatraea saccharalis*) e a redução no peso da cana em até 29% (SANTOS, 2013; SHAILBALA; KUMAR, 2017).

O patógeno causador da doença é capaz de hidrolisar a sacarose em glicose e frutose por meio da síntese de invertases, resultando na inversão da sacarose e aumento na quantidade de melão (SHARMA; TAMTA, 2015). Taxonomicamente, o gênero *Colletotrichum* pertence ao domínio Eukariota, filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Sordariomycetes, ordem Phyllachorales e família Phyllachoraceae (CARDOSO, 2012).

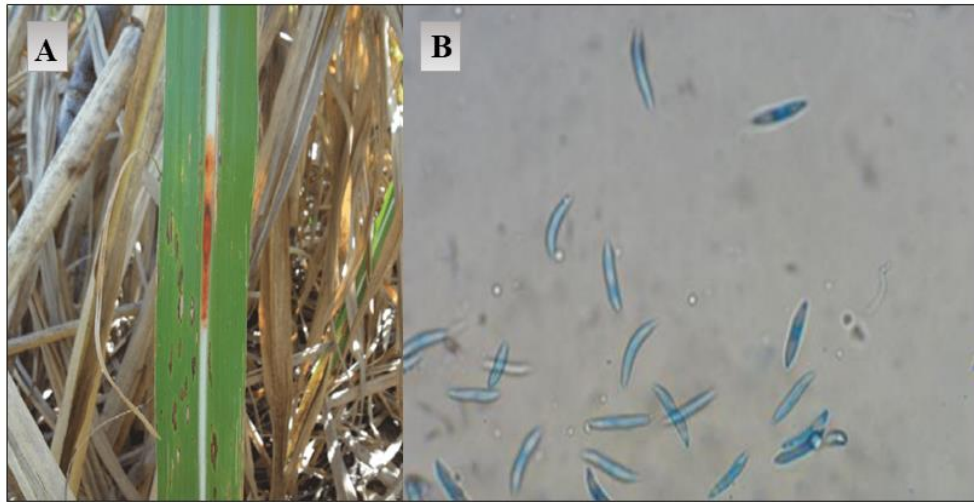
O fungo adentra o tecido meristemático da planta pelos nós dos colmos, rachaduras de crescimento, primórdios de raízes e gemas ou então por orifícios causados pela praga *D. saccharalis*. Posteriormente, o micélio de *C. falcatum* se espalha por todo o tecido através dos feixes vasculares da planta (SHARMA; TAMTA, 2005).

A infecção fúngica por *C. falcatum* em plântulas ocasiona falhas no processo de germinação e consequente morte dos brotos (KIMATI et al., 1997). A infecção da planta adulta acomete os colmos maduros, acarretando na podridão vermelha do tecido e posterior formação de bandas transversais brancas; na nervura central das folhas há aparecimento de lesões também de coloração vermelha (Figura 10A); na região nodal ou de entrada do patógeno haverá necrose do tecido. Na casca das plantas infectadas pode notar-se a presença de manchas marrom-avermelhadas (KIMATI et al., 1997; JAMES, 2004).

A disseminação da podridão vermelha ocorre pelo replantio de toletes contaminados, não havendo recorrência da doença por esporos presentes no solo, visto que esses não sobrevivem por mais de 5 meses. A dispersão pelo vento também não é eficiente, devido à natureza mucilaginosa dos esporos, que ao entrarem em contato com a umidade formam uma massa viscosa (SHARMA; TAMTA, 2005).

*C. falcatum* é uma espécie anamórfica, sendo que na fase sexuada é denominado *Glomeralla tucumanensis* e é responsável pela sobrevivência nas folhas em decomposição e novas raças virulentas (KUMAR et al., 2010). *C. falcatum* é responsável pela produção de conídios alongados, incolores, unicelulares e com formato de foice (Figura 10B).

Figura 10 – Podridão vermelha de cana-de-açúcar. A) Sintoma de podridão vermelha na nervura central de folhas de cana-de-açúcar infectadas por *Colletotrichum falcatum*. B) Conídios de *C. falcatum* corados com azul de algodão.



Fonte: Adaptado de Nechet, Ramos & Vieira (2016).

O genoma de *C. falcatum* foi recentemente sequenciado, demonstrando a presença de vários genes relacionados com a quebra da parede celular vegetal (VISWANATHAN et al., 2016). Apesar de vários trabalhos avaliarem aspectos da expressão diferencial de genes durante a interação nenhum deles analisou a expressão de genes do patógeno (SATHYABHAMA et al., 2015; VISWANATHAN et al., 2016).

### 2.6.3 *Thielaviopsis paradoxa*

O fungo *T. paradoxa* é causador da doença que afeta cultivares de cana-de-açúcar denominada “podridão do abacaxi”, também encontrada na maioria dos países produtores de cana-de-açúcar (PLANTWISE, 2018) O principal sinal da patologia vegetal é o odor característico de abacaxis maduros, gerado devido a presença de acetato de etila sintetizado pelo fungo (TALUKDER; BEGUM; AZAD, 2007).

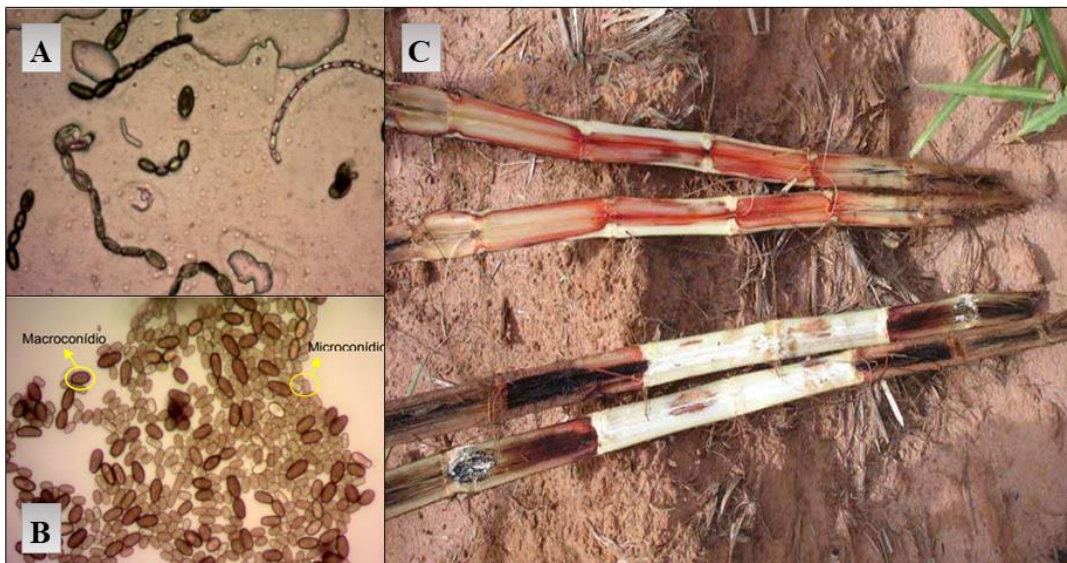
O fungo *Ceratocystis paradoxa* é uma espécie teleomórfica (estágio sexual), para a qual *T. paradoxa* corresponde a sua fase anamórfica (estágio assexual). É membro da família Ceratocystidaceae, ordem Microascales e filo Ascomycota (PAULIN-MAHADY; HARRINGTON; MCNEW, 2002). *T. paradoxa* é caracterizado pela produção de dois tipos de esporos: micro e macroconídios (Figura 11AB) (MBENOUN; BEER; WINGFIELD, 2014).

No início da infecção, o patógeno se espalha rapidamente e causa vermelhidão no tecido afetado (Figura 11C) pela excreção de substâncias de defesa pela planta. Os nós dos colmos de

cana, muitas vezes, servem como barreira mecânica para a dissipação interna do fungo, mas em cultivares susceptíveis a colonização pode acometer a planta inteira (RAID; ROTT, 2015). Mais tarde, a coloração do tecido é alterada para cinza, até atingir tons mais escuros. Também há formação de regiões ocas no interior das plantas, devido a proliferação de clamidiósporos (KIMATI, 1997; JAMES, 2004).

Nas plantas afetadas, se observa uma dificuldade na germinação de brotos e raízes em temperaturas menores, morte dos brotos emergentes, estímulo à produção de etileno (fitotóxico) e, conseqüente, diminuição da produção de cana-de-açúcar de 31 a 35% (BEGUM; TALUKDER; HOQUE, 2008; CHAPOLA, 2010; MEHNAZ, 2013). A doença se dissemina no campo por meio da dispersão de esporos pelo vento, chuva e por insetos carregadores, toletes/mudas ou instrumentos de corte infectados (SANTOS, 2013; RAID; ROTT, 2015).

Figura 11 – A) Vista parcial de microconídios em cadeia de *Thielaviopsis paradoxa* na objetiva de 100x. B) Vista parcial de macroconídios em primeiro plano de *T. paradoxa* na objetiva de 100x. C) Colmos de cana-de-açúcar contaminada por *T. paradoxa*.



Fonte: Adaptado de Santos (2013); Chanquinie (2015).

Os microconídios são hialinos, pequenos, cilíndricos e eliminados na forma de cadeias, sendo responsáveis pela dissipação do patógeno na planta, devido a característica de intensa germinação. Já os clamidiósporos são descritos como pardo-escuros, de parede celular espessa, doliformes e de tamanho de 3 a 4 vezes maior que os microconídios. Esses por sua vez são produzidos somente por hifas velhas e têm função de resistência à possíveis condições adversas (MBENOUN; BEER; WINGFIELD, 2014; CHANQUINIE, 2015).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar a produção de enzimas envolvidas na degradação da biomassa lignocelulósica de cana-de-açúcar pelos fitopatógenos *S. scitamineum*, *C. falcatum* e *T. paradoxa*, bem como identificar as proteínas que codificam para tais atividades, a fim de se ampliar o *pool* de enzimas com potencial de uso na obtenção de etanol de segunda geração.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar qualitativamente a produção de celulasas e fenoloxidasas em ensaios *in vitro*;
- Avaliar a produção das enzimas lignocelulolíticas endoglucanase, lacase, lignina peroxidase e celulasas totais em condições de fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato;
- Analisar os efeitos causados por variações no teor de umidade, teor de extrato de levedura e tempo de cultivo em ensaios de fermentação em estado sólido na produção de enzimas de interesse utilizando planejamento fatorial completo;
- Confirmar a presença de genes que codificam proteínas com atividade em carboidratos nas linhagens estudadas em comparação com *T. reesei*;
- Identificar dentre as espécies avaliadas a mais apta a produzir enzimas de capacidade de degradação de biomassa lignocelulósica de cana-de-açúcar.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de Microbiologia e Química Orgânica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, câmpus Toledo.

### 4.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS

O isolado *S. scitamineum* SSC39 foi disponibilizado pela Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (câmpus Piracicaba, SP). Já os isolados *C. falcatum* e *T. paradoxa* disponibilizadas pelo Instituto Agrônomo de Campinas – Centro de Cana (Ribeirão Preto, SP).

As linhagens fúngicas foram mantidas em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) por repiques sucessivos (a cada 30 dias), sendo crescidas a 28°C na ausência de luz, em câmara incubadora tipo BOD (DAMASCENO, 2016). O meio de cultivo foi preparado conforme indicações do fabricante (Sigma-Aldrich): 39 g de BDA para 1 L de água destilada. Após o preparo, o meio foi submetido a autoclavagem durante 15 min a 121 °C.

Para estocagem, as culturas foram armazenadas em óleo mineral (*T. paradoxa*), água (Método Castellani) (*C. falcatum*) ou esporos secos (*S. scitamineum*) em temperatura ambiente (BUENO, 2016).

### 4.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROCULTIVO

A fim de se avaliar morfológicamente as estruturas do micélio e esporos dos fungos que tenham ciclo de vida independente da planta de infecção – ou seja, para os fungos *C. falcatum* e *T. paradoxa*, que esporulam mesmo sem interação com o hospedeiro – se empregou a técnica de microcultivo (CORRÊA, 2003). Para isso, em placa de Petri contendo papel filtro sobre o fundo, colocou-se uma lâmina de vidro e lamínula e esterilizou-se o conjunto por 15 minutos a 121 °C em autoclave.

Para cultivo do microrganismo, um cubo de ágar de meio BDA com dimensões aproximadas de 1 cm foi depositado sobre a lâmina de vidro. Como inóculo se utilizou uma suspensão de esporos, provenientes do cultivo fúngico em meio BDA, ressuspensos em solução de NaCl (0,85%), semeados nas 5 faces expostas do cubo de ágar. Posteriormente, uma

lamínula foi depositada sobre a face superior do cubo (CARDOSO, 2012) e o conjunto foi incubado na ausência de luz em incubadora tipo BOD a 28 °C por 96 horas. Após, a lamínula foi transferida para uma nova lâmina contendo solução corante de azul de lactofenol e analisada em microscópio óptico na objetiva de 40x.

Em caso de não desenvolvimento fúngico na lamínula do microcultivo, raspou-se certa quantidade de micélio de placas de Petri com meio BDA e cultura com idade superior a 7 dias e visualizou-se as estruturas em microscópio óptico.

### 4.3 ANÁLISE ENZIMÁTICA QUALITATIVA

Os três isolados foram inoculados em meios de cultura específicos para determinação do potencial de produção e secreção das enzimas celulasas e fenoloxidasas por testes qualitativos.

#### 4.3.1 Celulase

Para avaliação qualitativa de produção de celulase, os fungos foram inoculados em meio sólido contendo carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono (Tabela 1). Discos de micélio (0,5 cm de diâmetro), obtidos de placas com cultivo prévio em meio BDA, foram depositados no centro de placas de Petri contendo 25 mL do meio de CMC. As placas foram mantidas a 28 °C na ausência de luz em incubadora tipo BOD por 96 h. Incubou-se também, placas sem inóculo a fim de se realizar o controle negativo do procedimento. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

Após o período de incubação, as placas foram mantidas a 50 °C em estufa durante 16 horas. Então, resfriou-se as placas até temperatura ambiente e adicionou-se 10 mL de solução de corante vermelho congo (2,5 g L<sup>-1</sup>) preparado em tampão Tris HCl (0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 8,0), à placa de Petri. O corante foi deixado em contato com o meio por 15 minutos e então descartado. As culturas coradas foram lavadas com solução de NaCl (1 mol L<sup>-1</sup>) no mesmo tampão, durante 15 minutos por duas vezes (RUEGGER; TAUKE-TORNISIELO, 2003).

Tabela 1 – Composição do meio de cultivo CMC para avaliação da produção de celulase.

<b>Componente</b>	<b>Concentração (g L<sup>-1</sup>)</b>
NaNO <sub>3</sub>	3
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub>	0,5
KCl	0,5
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01
Ágar	20
CMC	5

Fonte: Adaptado de Florencio (2011).

#### 4.3.2 Fenoloxidasas

Para avaliação da produção de fenoloxidasas os isolados de *S. scitamineum*, *C. falcatum* e *T. paradoxa* foram submetidos ao teste de Bavendamm (SILVA, 2014). Para isto, discos de micélio com 0,5 cm de diâmetro obtidos do crescimento prévio em meio BDA foram transferidos para o centro de uma placa de Petri contendo 25 mL de meio Ágar extrato de malte suplementado com ácido tânico (Tabela 2).

Tabela 2 – Composição do meio de cultura Ágar extrato de malte suplementado com ácido tânico.

<b>Componente</b>	<b>Concentração (g L<sup>-1</sup>)</b>
Extrato de malte	15
Ágar	20
Ácido tânico	5

Fonte: Adaptado de Silva (2014).

O ágar e o extrato de malte foram preparados em 850 mL de água destilada e o ácido tânico nos 150 mL restantes. A esterilização foi feita em autoclave (15 min a 121 °C) em frascos separados, a fim de se evitar a hidrólise do ágar pelo ácido (DAVIDSON; CAMPBELL; BLAISDELL, 1938).

As placas contendo inóculo foram incubadas na ausência de luz em incubadora tipo BOD (28 °C) e os efeitos produzidos avaliados após 5 dias de crescimento. Linhagens produtoras de fenoloxidasas apresentam halos marrons ao redor do crescimento micelial, decorrentes da oxidação do ácido tânico (DAVIDSON; CAMPBELL; BLAISDELL, 1938).

#### 4.4 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

##### 4.4.1 Substrato

Como substrato para a obtenção do extrato enzimático utilizou-se bagaço de cana-de-açúcar (BC) proveniente de um pequeno produtor local. O material foi submetido a sucessivas lavagens com água corrente para retirada de impurezas grosseiras e açúcares. Posteriormente o BC foi submerso em água quente a aproximadamente 70 °C por 5 minutos para retirada de açúcares residuais e então lavado com água destilada estéril.

O substrato foi seco em estufa a 55 °C por 7 dias e em sequência moído em moinho de facas. A granulometria do BC resultante foi avaliada por peneiramento com peneiras da série de Teylor (14, 20, 28, 35, 48, 65, 100 mesh), seguido do cálculo do diâmetro de Sauter pela Equação 1.

$$\bar{D}_{\text{SAUTER}} = \frac{1}{\sum_{i=1}^n \frac{X_n}{\frac{D_{n-1} + D_n}{2}}} \quad (1)$$

Na qual,

$D_{\text{SAUTER}}$ : diâmetro médio da fração analisada (mm);

$X_n$ : fração de massa retida na abertura da peneira n (g);

$D_n$ : diâmetro de abertura da peneira n (mm);

$D_{n-1}$ : diâmetro de abertura da peneira n-1 (mm).

Para utilização nos testes de fermentação, o material foi esterilizado durante 30 minutos a 121 °C em autoclave após ajuste da umidade, conforme descrito a seguir.

##### 4.4.2 Inóculo

Como inóculo da fermentação, utilizou-se discos de micélio fúngico das linhagens que apresentaram com os melhores resultados da análise qualitativa da produção de celulasas e



fenoloxidasas. Para isso, 6 discos de micélio provenientes do cultivo em placa de Petri contendo meio de cultivo BDA recentemente preparada, foram adicionados assepticamente aos frascos onde a fermentação foi realizada, conforme descrito no item 4.4.3.

#### 4.4.3 Fermentação

A FES foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 1,40 g do substrato tratado, com umidade corrigida em base úmida, por meio da Equação 2, considerando que a umidade inicial do substrato era igual a zero (FLORENCIO, 2011). Foram empregadas condições de 28 °C e ausência de luz em câmara incubadora tipo BOD (ZANCAN; BARRETO; MENEZES, 2015) para todos os tratamentos analisados (item 4.4.4).

$$m_{H_2O} = \frac{m_s (x_1 - x_2)}{(100 - x_2)} \quad (2)$$

Na qual,

$m_{H_2O}$ : massa de água a ser adicionada (gH<sub>2</sub>O);

$m_s$ : massa do substrato (gSólidoSeco);

$x_1$ : umidade inicial do substrato (gH<sub>2</sub>O/gSólidoSeco);

$x_2$ : umidade final desejada do substrato (gH<sub>2</sub>O/gSólidoSeco).

#### 4.4.4 Planejamento experimental

O delineamento fatorial completo com dois níveis e ponto central (-1, 0, +1), 2<sup>3</sup>, foi utilizado para avaliar os possíveis efeitos das variáveis de processo nas atividades enzimáticas quantificadas e também, com o propósito de estabelecer modelos estatísticos válidos que descrevessem as interações das variáveis sobre as atividades enzimáticas.

As variáveis independentes estudadas foram: teor de umidade, teor de extrato de levedura (YE) e tempo de cultivo, de acordo com os níveis indicados na Tabela 3. Como variável dependente, teve-se a resposta de atividade enzimática de endoglucanase e celulasas totais.

Tabela 3 – Especificação dos níveis do planejamento fatorial completo  $2^3$  aplicado com espécies fúngicas utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Umidade (%)	85	90	95
Extrato de levedura (%)	0	2,5	5
Tempo (dias)	4	8	12

Fonte: Autor (2019).

A matriz do planejamento fatorial completo com quadruplicata no ponto central aplicado é detalhada na Tabela 4.

Tabela 4 – Matriz do planejamento fatorial completo  $2^3$  aplicado com espécies fúngicas para avaliação da atividade enzimática resultante.

Ensaio	Variáveis		
	Umidade	Extrato de levedura	Tempo
1	-1 (85)	-1 (0)	-1 (4)
2	+1 (95)	-1 (0)	-1 (4)
3	-1 (85)	+1 (5)	-1 (4)
4	+1 (95)	+1 (5)	-1 (4)
5	-1 (85)	-1 (0)	+1 (12)
6	+1 (95)	-1 (0)	+1 (12)
7	-1 (85)	+1 (5)	+1 (12)
8	+1 (95)	+1 (5)	+1 (12)
9	0 (80)	0 (2,5)	0 (8)
10	0 (80)	0 (2,5)	0 (8)
11	0 (80)	0 (2,5)	0 (8)
12	0 (80)	0 (2,5)	0 (8)

Fonte: Autor (2019).

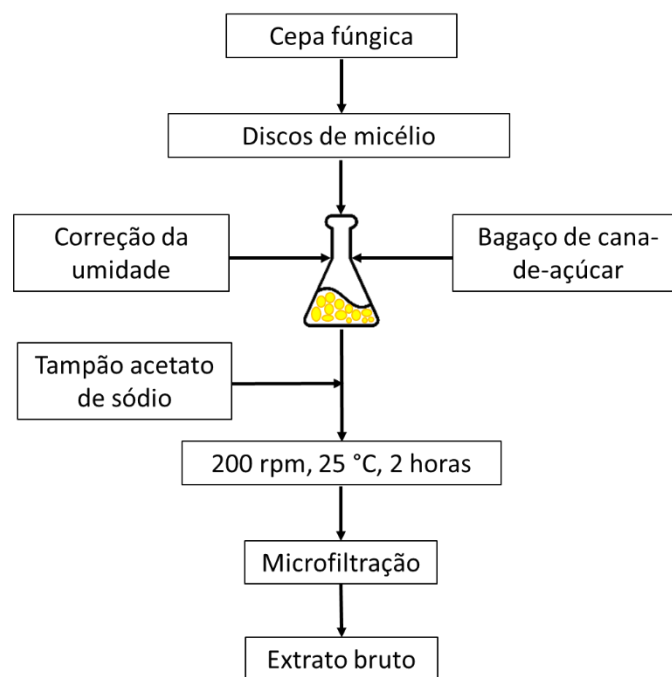
No caso dos ensaios contendo solução de extrato de levedura nos níveis 0 e +1, a solução foi adicionada ao frasco de fermentação de modo a realizar correção da umidade simultaneamente. Os resultados de atividade enzimática foram analisados estatisticamente (item 4.7).

#### 4.4.5 Obtenção do extrato enzimático

Após a FES, completou-se para 50 mL o volume de líquido presente no frasco de fermentação por meio da adição de tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5,0). Em seguida, os frascos foram mantidos em *shaker* por 2 horas a 200 rpm e 25 °C. O material extraído foi submetido a microfiltração a vácuo por filtros Stericup®, Millipore, com poro de 0,22 µm de diâmetro (DAMASCENO, 2016). O sobrenadante consistiu na solução enzimática bruta e foi armazenado em tubos Falcon em congelador a -10 °C por no máximo 4 meses.

O processo completo de fermentação em estado sólido até a obtenção do sobrenadante é descrito pela Figura 12.

Figura 12 – Esquema representativo da análise resultante da fermentação em estado sólido por *Sporisorium scitamineum*, *Colletotrichum falcatum* e *Thielaviopsis paradoxa*.



Fonte: Autor (2019).

#### 4.5 ANÁLISE ENZIMÁTICA QUANTITATIVA

Foram avaliadas de forma quantitativa as atividades de enzimas: endoglucanase, celulasas totais, lacase e lignina peroxidase.

#### 4.5.1 Endoglucanase

A atividade enzimática de endoglucanase (EC 3.2.1.4) foi determinada por quantificação de açúcares redutores obtidos após a degradação da carboximetilcelulose (CMC). Para tanto aplicou-se o método do reagente de DNS (ácido 3,5-dinitro-salicílico) de acordo com Miller (1959).

##### 4.5.1.1 Curva padrão de glicose

Para obtenção da curva analítica, preparou-se soluções padrões de glicose com concentrações de 0,00; 0,55; 1,11; 1,66; 2,22; 3,33; 4,44; 4,99  $\mu\text{mol mL}^{-1}$  em água (INFORSATO; PORTO, 2016).

Em tubos de ensaio adicionou-se 1 mL da solução de DNS e 1 mL da solução padrão de glicose. Os tubos foram agitados em vórtex e submetidos a aquecimento em banho-maria por 5 minutos a 100 °C. O resfriamento dos tubos se deu em banho de gelo e ao final adicionou-se 10 mL de água destilada.

O conteúdo reacional foi lido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. Água destilada foi utilizada como controle negativo da análise. Os valores encontrados de absorvância foram então relacionados à concentração de glicose ( $\mu\text{mol mL}^{-1}$ ) por projeção de reta padrão.

##### 4.5.1.2 Determinação da atividade enzimática de endoglucanase

Uma alíquota de 1 mL da solução enzimática bruta foi misturada à 1 mL de solução de CMC (10 g L<sup>-1</sup>) preparada em tampão acetato de sódio (50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,0). A mistura reacional foi incubada por 30 minutos a 50 °C (GHOSE, 1987).

Após o tempo de incubação, os tubos foram colocados em banho de gelo para interromper a reação. Em seguida, adicionou-se 1 mL do reagente de DNS à 1 mL da mistura reacional. A solução resultante foi aquecida em banho-maria a 100 °C por 5 minutos. Após resfriamento em banho de gelo, adicionou-se 10 mL de água destilada e a amostra foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

Como branco do espectrofotômetro foi utilizada uma solução composta por 1 mL de tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5,0) e 1 mL de DNS, submetida às mesmas condições supracitadas.

O cálculo da atividade enzimática foi realizado utilizando a Equação 3.

$$UI = \frac{F C Vt}{t V_e} \quad (3)$$

Na qual,

UI: atividade enzimática ( $U \text{ mL}^{-1}$ ), em que  $U = \mu\text{mol min}^{-1}$ ;

F: fator de diluição da amostra;

C: concentração de açúcares liberados determinada pelo método de DNS ( $\mu\text{mol mL}^{-1}$ );

Vt: volume total da reação (mL);

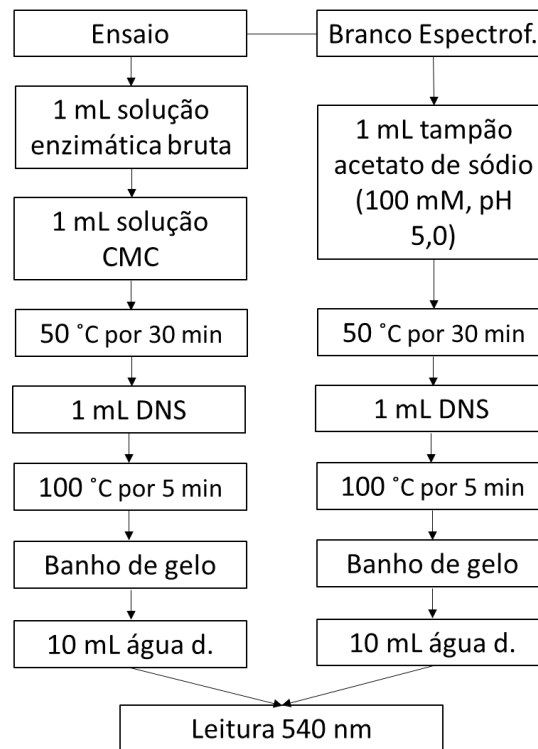
t: tempo de reação (min);

V<sub>e</sub>: volume da solução enzimática (mL).

Uma unidade de celulase é definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir por 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor por mL e por minuto nas condições de ensaio ( $UI = \mu\text{mol produto mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) (RUEGGER; TAUKE-TORNISIELO, 2003).

A Figura 13 resume todos os passos necessários para a determinação da atividade enzimática de celulase.

Figura 13 – Metodologia simplificada para a determinação de atividade enzimática de endoglucanase em extratos brutos por método de reagente de DNS.



Fonte: Autor (2019).

#### 4.5.2 Celulase total

Foi avaliada a atividade enzimática total de celulases por meio da detecção de açúcares redutores (método do reagente de DNS) formados a partir da degradação de papel filtro.

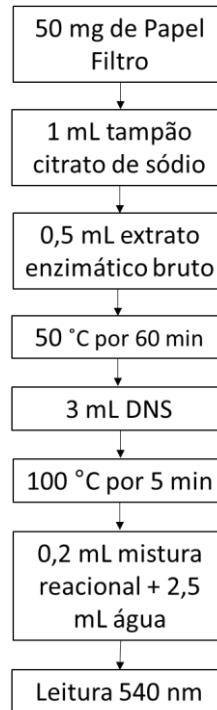
Para a curva padrão do ensaio, utilizou-se soluções contendo 1,0; 1,5; 2,0; 3,3; 5,0; 6,7 e 10 mg mL<sup>-1</sup> de glicose em água.

Para as amostras, em um tubo de ensaio contendo uma tira de papel filtro (1,0 x 6,0 cm) pesando aproximadamente 50 mg, adicionou-se uma alíquota de 1 mL de solução tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 4,8) de modo a imergir todo o papel. Após isso, foram adicionados 0,5 mL de solução enzimática bruta (ou padrão de glicose, no caso da curva padrão) e a solução incubada a 50 °C por 60 minutos em banho-maria (GHOSE, 1987).

Posterior ao aquecimento, foram adicionados 3 mL de reagente de DNS e misturou-se o conteúdo manualmente, em seguida, as amostras foram incubadas a 100 °C durante 5 minutos em banho-maria. Da solução resultante, 0,2 mL foram diluídos em 2,5 mL de água destilada. Então, realizou-se a leitura a 540 nm em espectrofotômetro (GHOSE, 1987).

Como branco do espectrofotômetro se utilizou tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 4,8). A quantificação de celulasas totais é resumida na Figura 14.

Figura 14 – Metodologia simplificada para a determinação de atividade enzimática de celulase total.



Fonte: Autor (2019).

Para a quantificação da atividade enzimática presente no extrato enzimático analisado, se utilizou a Equação 4.

$$\text{FPU} = \frac{C}{0,18 V_A t} \quad (4)$$

Na qual,

FPU: atividade enzimática ( $\text{U mL}^{-1}$ ), em que  $U = \mu\text{mol min}^{-1}$ ;

C: concentração de glicose determinada a partir do método de DNS ( $\text{mg mL}^{-1}$ );

0,18: conversão de mg em  $\mu\text{mol}$  de glicose ( $\text{mg mL}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$ );

$V_A$ : volume da solução enzimático (mL);

t: tempo de reação enzimática (min).

#### 4.5.3 Lacase

A atividade enzimática da lacase (EC 1.10.3.2) foi determinada pela oxidação da siringaldazina à sua forma quinona.

Para um *screening* dos ensaios com atividade de lacase, se realizou experimento em placa de 96 poços contendo 0,05 mL de solução enzimática bruta, 0,22 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 6,5) e 0,03 mL de siringaldazina (0,216 mM) preparada em metanol absoluto (MANOLE et al., 2008) e observou-se a formação da coloração característica da reação.

Para quantificação, a mistura reacional foi composta pelos mesmos reagentes com volume total final ajustado para 3 mL. A reação foi acompanhada durante 15 minutos em temperatura ambiente com leitura de absorvância em espectrofotômetro a 530 nm.

O branco da reação foi preparado substituindo a solução enzimática bruta por água. O coeficiente de extinção molar do produto formado é  $65000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (SZKLARZ et al., 1989).

Os valores de atividade foram determinados por meio da diferença de absorvância, conforme Equação 5.

$$UI = \left[ \left( \frac{\Delta Abs}{\epsilon V_A t} \right) F 10^6 \right] \quad (5)$$

Na qual,

UI: atividade enzimática ( $UI \text{ L}^{-1}$ ), em que  $UI = \mu\text{mol min}^{-1}$ ;

$\Delta Abs = Abs_{\text{final}} - Abs_{\text{inicial}}$ ;

F: fator de diluição da amostra;

$10^6$ : fator de conversão de  $\mu\text{L}$  para L;

$\epsilon$ : coeficiente de extinção molar do produto formado ( $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ );

$V_A$ : volume da solução enzimática (L);

t: tempo de reação (min).

#### 4.5.4 Lignina peroxidase

A atividade enzimática de lignina peroxidase (EC 1.11.1.14) foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico à aldeído veratrílico.



A reação foi composta por 675  $\mu\text{L}$  de tampão tartarato de sódio ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 3,0), 75  $\mu\text{L}$  de álcool veratrílico ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ), 50  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio ( $20 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e 200  $\mu\text{L}$  de solução enzimática bruta. A reação teve início com a adição de peróxido de hidrogênio (absorbância inicial) e foi então acompanhada a 310 nm em espectrofotômetro durante 1 minuto. Ao final da reação se obteve o valor de absorbância final (DAMASCENO, 2016).

O branco da reação foi preparado substituindo a solução enzimática bruta por água. O coeficiente de extinção molar do produto formado é  $9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (SZKLARZ et al., 1989).

A atividade enzimática de lacase foi calculada segundo Equação 5 supracitada.

#### 4.6 QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS

Em cada ensaio de fermentação, a fim de ser descontado da quantidade de açúcares liberados pela atividade enzimática, determinou-se a quantidade de açúcares redutores totais resultantes do crescimento fúngico no BC. Similarmente ao descrito no item 4.5.1.1, realizou-se a dosagem de açúcares pelo método do reagente de DNS, substituindo os padrões de glicose por 1 mL de extrato enzimático bruto. O resultado foi obtido por meio de regressão linear a partir da curva reta padrão de glicose.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de atividade enzimática de todos os ensaios realizados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a 95% de significância, utilizando o *software* Statistica 9.0. Também com auxílio do *software*, foram realizadas análises de superfície de resposta pelo ajuste de modelos lineares aos resultados experimentais obtidos do planejamento fatorial, bem como o desenvolvimento de equações capazes de descrever o efeito das variáveis independentes (umidade, tempo de cultivo e extrato de levedura) sobre a variável dependente (atividade enzimática).

#### 4.8 ANÁLISE *IN SILICO*

Com o intuito de confirmar a presença de proteínas de interesse biotecnológico codificadas nos genomas das espécies *S. scitamineum*, *T. paradoxa*, *C. falcatum* e compará-las com as do fungo *T. reesei*, dados do conjunto de proteínas codificadas pelos genomas disponíveis no banco de dados público *Joint Genome Institute* (JGI) (Tabela 5) foram submetidos à anotação automática utilizando o banco de dados dbCAN (YIN et al., 2012) para identificação de proteínas com atividade em carboidratos (*Carbohydrate Active Enzymes* - CAZy). A anotação foi realizada utilizando as três ferramentas disponíveis no banco de dados: DIAMOND, HOTPEP e HMMER. Foram consideradas para as análises comparativas entre as espécies apenas as proteínas confirmadas pelas três ferramentas e que apresentam peptídeo sinal para localização extracelular.

Tabela 5 – Genomas de linhagem de *Sporisorium scitamineum*, *Thielaviopsis paradoxa* e *Colletotrichum falcatum* publicados e disponíveis no banco de dados público *Joint Genome Institute* (JGI). ND\*: Não determinada.

Espécie	Linhagem	Referência
<i>Sporisorium scitamineum</i>	39B	Taniguti et al. (2015)
<i>Thielaviopsis paradoxa</i>	JCM 6020	Não publicado
<i>Colletotrichum falcatum</i>	MAFF306170	Não publicado
<i>Trichoderma reesei</i>	ND*	Martinez et al. (2008)

Fonte: Autor (2019).

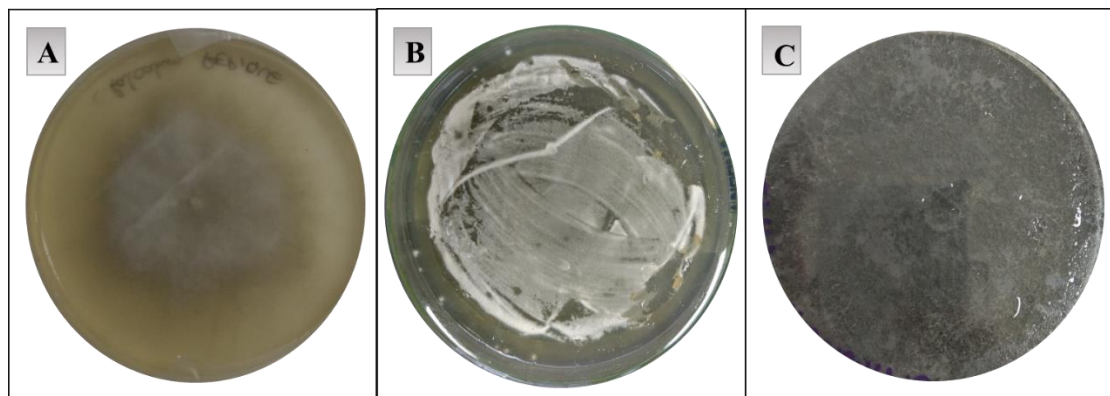
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

Como forma de confirmar a identidade das espécies utilizadas nos experimentos de produção das enzimas lignocelulolíticas, foram realizadas análises morfológicas do micélio desenvolvido em cultivos em meio BDA e das estruturas de esporulação dos fungos pela técnica de microcultivo.

Observou-se que a cultura de *C. falcatum* se desenvolve com micélio cotonoso de coloração variando de branco a tons acinzentados (Figura 15A), também constatado por Cardoso (2012) e Prihastuti et al. (2010) em cultivos em meio BDA. A linhagem de *S. scitamineum* apresentou uma taxa de crescimento lenta e sob a forma de leveduras e hifas, aspecto superficial, uniforme e de coloração creme (Figura 15B), similarmente descrito por Moosawi-Jorf e Izadi (2007) e Santos (2013). Já o micélio de *T. paradoxa* apresentou crescimento acelerado, desenvolvimento plano, textura aveludada e coloração escura (Figura 15C), assim como descrito em Polizzi et al. (2006), Caetano, Rocha e Duclos (2008) e Tamanho et al. (2014).

Figura 15 – Placas de Petri com culturas de fungos em meio BDA após 96 horas de incubação para avaliação morfológica. A) Anverso do cultivo de *Colletotrichum falcatum* em placa de Petri inoculado na forma de disco de micélio. B) Anverso do cultivo de *Sporisorium scitamineum* em placa de Petri inoculado na forma de solução de esporos. C) Anverso do cultivo de *Thielaviopsis paradoxa* em placa de Petri inoculado na forma de disco de micélio.

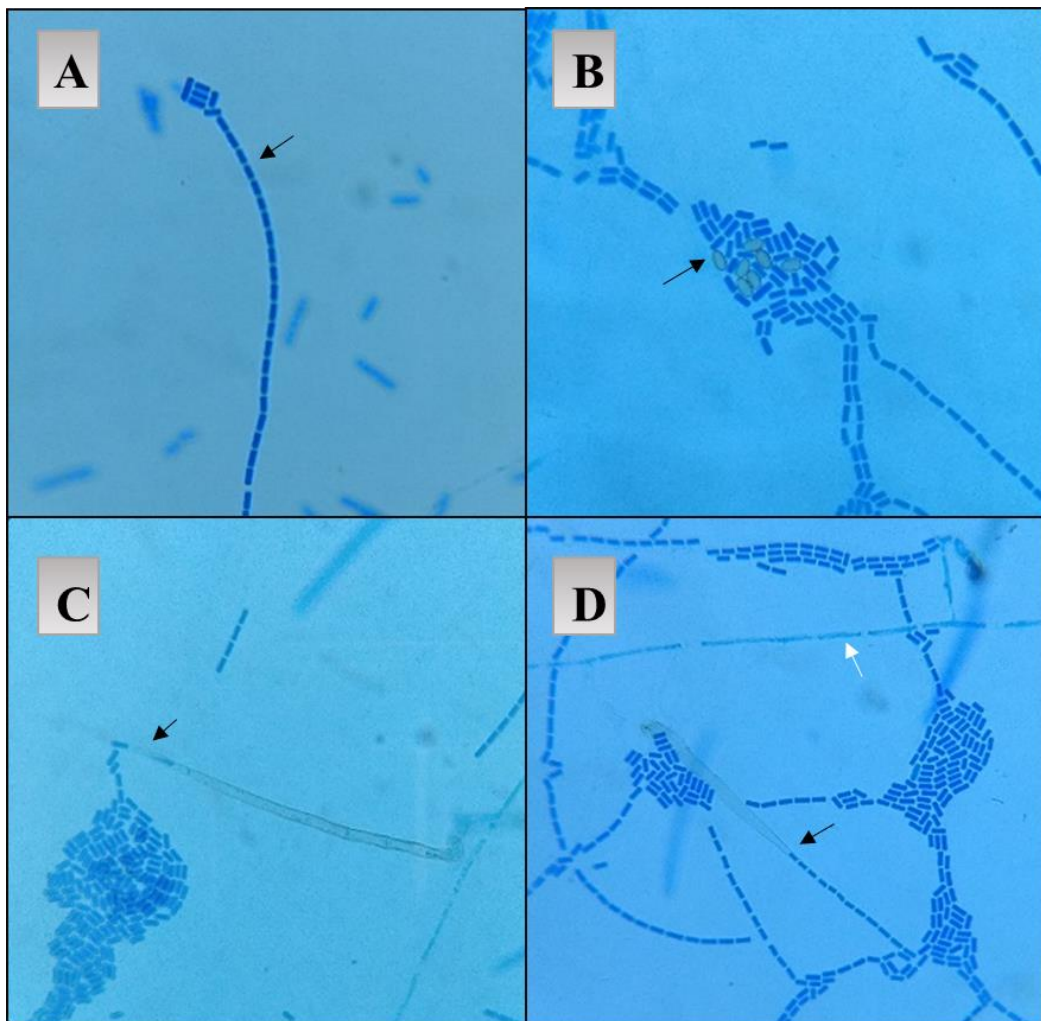


Fonte: Autor (2019).

Com as cepas que não possuem ciclo de vida dependente da planta hospedeira para esporulação, *C. falcatum* e *T. paradoxa*, foi realizado o microcultivo em lâmina e visualizou-se as estruturas formadas em microscópio óptico com aumento de 400 vezes.

Para o fungo *T. paradoxa*, foi possível visualizar a produção e liberação de conídios por hifas especializadas chamadas de conidióforos (Figura 16C e D); o arranjo em cadeia de conídios (Figura 16A); hifas fúngicas (Figura 16D); clamidiósporos maduros (Figura 16B), característicos da espécie.

Figura 16 – Estruturas de *Thielaviopsis paradoxa* observadas na objetiva de 40x em microscópio óptico. A) Conídios em cadeia. B) Clamidiósporos maduros (seta). C) Conidióforo liberando conídios através de extremidade aberta (seta). D) Conidióforo liberando conídios (seta preta) e hifa fúngica (seta branca).

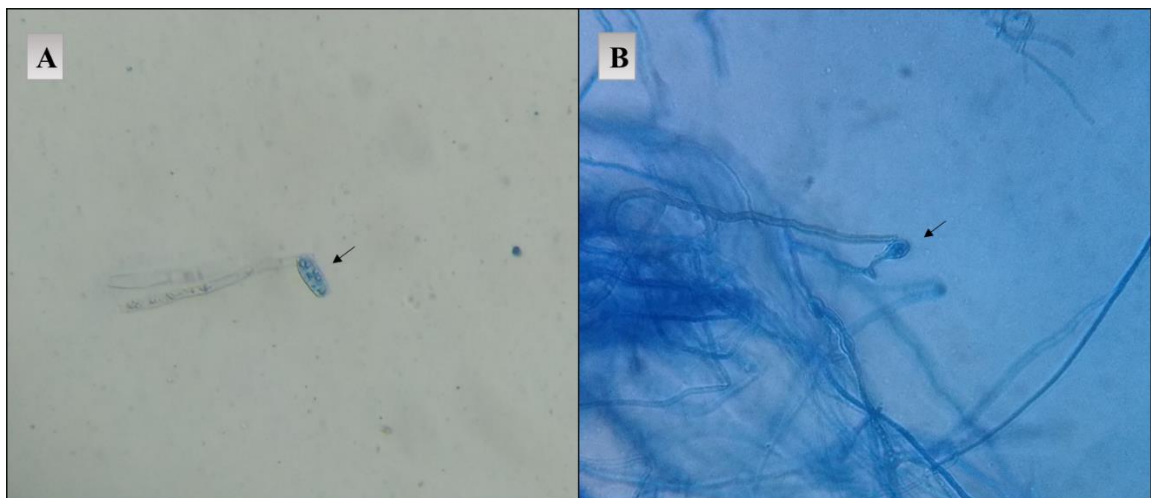


Fonte: Autor (2019).

Os conídios liberados por conidióforos são cilíndricos, de extremidades retas, arranjam-se em cadeia e possuem tamanho menor que os clamidiósporos. Já os clamidiósporos são doliformes, lisos e de coloração escura. As estruturas observadas são coerentes com os resultados descritos por Soyong, Pongnak, Kasiolarn (2005), Abdullah et al. (2009) e Pinho, Dutra e Pereira (2013) para identificação do fitopatógeno *T. paradoxa*.

A esporulação da linhagem de *C. falcatum* só foi observada em cultivos em placa de Petri com incubação superior a 7 dias a 28 °C, não sendo observada na técnica de microcultivo, mesmo quando realizado sob luz negra. Verificou-se a presença de conídio vacuolizado, oblongo e com ápice arredondado (Figura 17A), bem como a presença de conidióforos (Figura 17B).

Figura 17 – Estruturas de *Colletotrichum falcatum* observadas na objetiva de 40x em microscópio óptico. A) Conídio vacuolizado. B) Emaranhado de hifas e conidióforo (seta).



Fonte: Autor (2019).

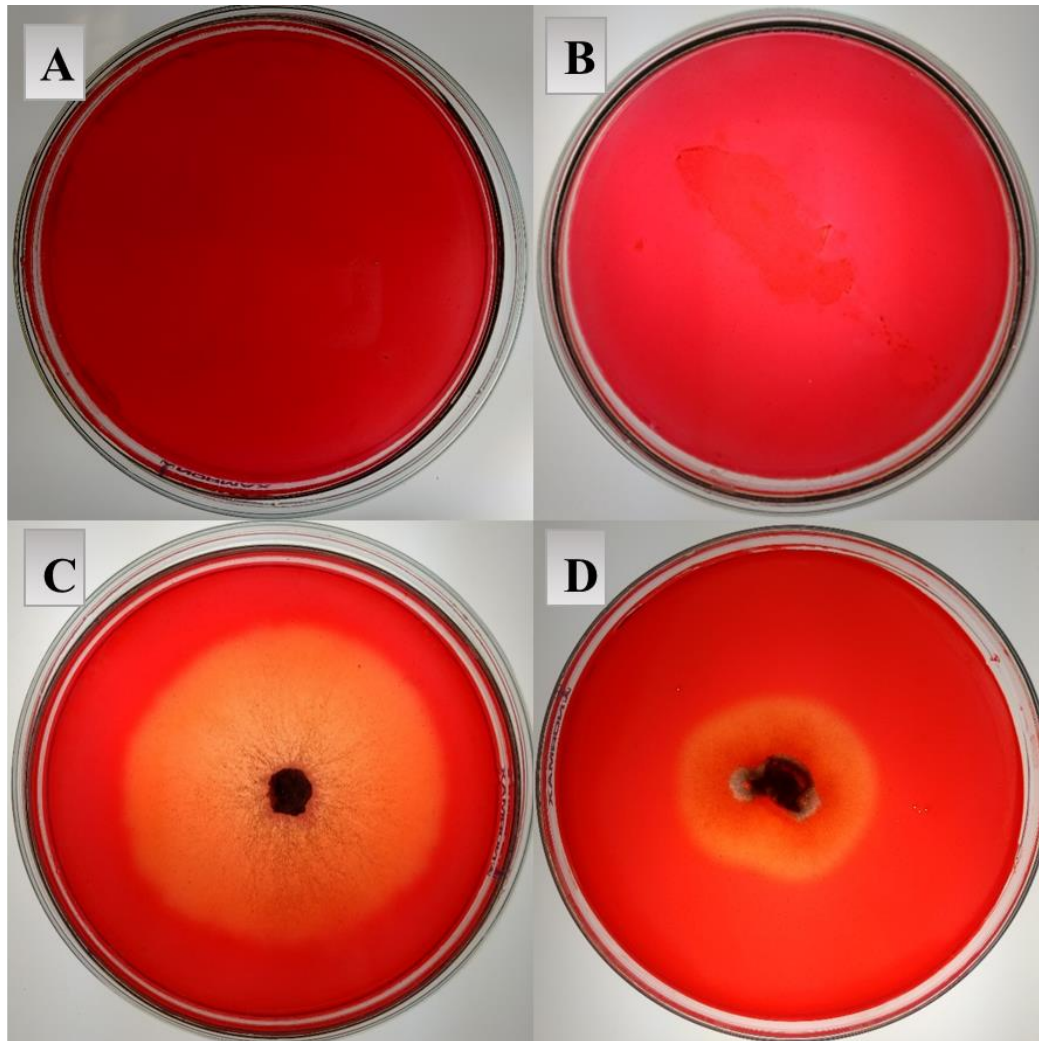
Tozze Júnior, Mello e Massola Júnior (2006), também verificaram a presença conídios similares em espécies do gênero *Colletotrichum* cultivadas em meio BDA. Prihastuti et al. (2010), identificaram a espécie *C. falcatum* por presença de conídio vacuolizado similar ao encontrado no presente experimento. Ma et al. (2018) e Manamgoda et al. (2013), descreveram conidióforos para diferentes espécies do gênero, todos apresentam a forma encontrada na Figura 17B, diferindo por particularidades de cada espécie.

Deste modo, com a análise morfológica realizada foi possível confirmar a identidade das espécies utilizadas nesse estudo.

## 5.2 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE CELULASES E FENOLOXIDASES

As três linhagens estudadas, *S. scitamineum*, *C. falcatum* e *T. paradoxa*, foram submetidas a cultivo em meio CMC a fim de se avaliar a produção e excreção de celulases *in vitro* (Figura 18).

Figura 18 – Avaliação da produção extracelular de celulases em meio CMC corado com solução de vermelho congo ( $2,5 \text{ g L}^{-1}$ ) em tampão Tris HCl ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 8,0). A) Meio CMC corado sem inóculo de microrganismo, para controle negativo de análise. B) Cultivo de *Sporisorium scitamineum* inoculado na forma de esporos em meio CMC corado. C) Cultivo de *Thielaviopsis paradoxa* inoculado como disco de micélio em meio CMC corado. D) Cultivo de *Colletotrichum falcatum* inoculado como disco de micélio em meio CMC corado.



Fonte: Autor (2019).

Os halos de hidrólise, observados na Figura 18, são diretamente proporcionais a excreção e atuação enzimática de celulases, devido ao fato de o corante ter afinidade pelas ligações  $\beta$ -1,4 glicídicas existentes somente na estrutura intacta de carboximetilcelulose presente no meio CMC (CASTRO, 2006). Desta maneira, visualizou-se produção de celulases extracelulares somente nos cultivos de *C. falcatum* e *T. paradoxa*.

Não se verificou produção expressiva de celulases *in vitro* pelo fungo *S. scitamineum*; tal fato pode estar relacionado pela dependência do fungo às interações com sua planta hospedeira para completar seu ciclo e pelo seu estilo de vida biotrófico (KIMIT, 2014; TANIGUTI et al.,



2015). Apesar da expressão de genes relacionados à quebra de celulose ter sido detectada em cultivos *in vitro* de *S. scitamineum* na sua forma haploide (TANIGUTI et al., 2015), podem ocorrer regulações à nível de tradução que impedem a detecção da atividade enzimática pelo método utilizado. Por outro lado, Jose et al. (2017), tiveram resultados positivos para a produção de celulasas a partir de esporos coletados de plantas de *Saccharum spontaneum* infectadas, evidenciando a produção de celulasas pelo fungo em condições de interação patógeno-hospedeiro.

Já para as linhagens de *C. falcatum* e *T. paradoxa*, observou-se a degradação do substrato. Entretanto, o halo de degradação não foi superior ao halo de crescimento da colônia, indicando a reduzida difusão dessas enzimas no meio de cultivo (Figura 18).

O crescimento fúngico em meio Ágar extrato de malte suplementado com ácido tânico pode revelar a expressão do complexo enzimático fenoloxidase que compreende todo o aparato lignolítico, abrangendo lacase, lignina e manganês peroxidase, tirosinase e catecol oxidase e outras enzimas (BURKE; CAIRNEY, 2002; WANG et al., 2008; DAMASCENO, 2016). Halos marrons no meio avaliado, indicam presença e atuação das enzimas, em decorrência da oxidação do ácido tânico presente no meio (DAVIDSON; CAMPBELL; BLAISDELL, 1938).

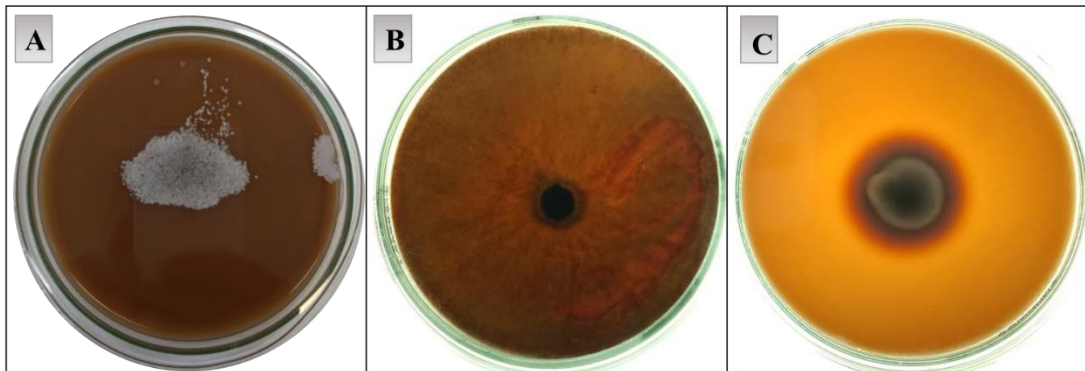
Após 5 dias de cultivo, não foi detectada a produção dessas enzimas por esporos diploides de *S. scitamineum*, sendo que houve crescimento fúngico no meio testado (Figura 19A).

Jose et al. (2017), não detectaram a atividade de ligninases pela técnica de zimograma em extratos de *S. scitamineum*, o que era esperado pelo fato de os autores utilizarem um meio contendo CMC como substrato. No entanto, a análise genômica e transcriptômica de *S. scitamineum in vitro* e em associação com a cana-de-açúcar determinaram a presença desses genes e sua expressão (TANIGUTI et al., 2015), sugerindo novamente a regulação desses genes a nível de tradução.

A linhagem de *T. paradoxa*, devido ao seu crescimento acelerado, apresentou desenvolvimento de micélio por toda a extensão do meio de cultivo presente na placa de Petri (Figura 19B). Deste modo, não foi possível visualizar formação de halo ao redor da colônia crescida. Porém ao final dos 5 dias de cultivo, visualizou-se manchas de coloração marrom no ágar, indicando a excreção de fenoloxidases.

*C. falcatum* apresentou crescimento lento no meio avaliado, entretanto resultados positivos de excreção de fenoloxidases foram observados, exibindo intenso halo marrom ao redor do micélio crescido (Figura 19C).

Figura 19 – Avaliação da produção extracelular de fenoloxidasas em meio Ágar extrato de malte suplementado com ácido tânico. A) Cultivo de *Sporisorium scitamineum* inoculado na forma de esporos em meio Ágar extrato de malte. B) Cultivo de *Thielaviopsis paradoxa* inoculado como disco de micélio em meio Ágar extrato de malte. C) Cultivo de *Colletotrichum falcatum* inoculado como disco de micélio em meio Ágar extrato de malte.



Fonte: Autor (2019).

Com os testes qualitativos da produção de celulases e fenoloxidasas, realizou-se triagem dos fungos a fim de se selecionar os melhores produtores das enzimas de interesse e realizar as próximas etapas. De acordo com os resultados, as cepas de *C. falcatum* e *T. paradoxa* foram selecionadas e submetidas a etapa de fermentação em estado sólido.

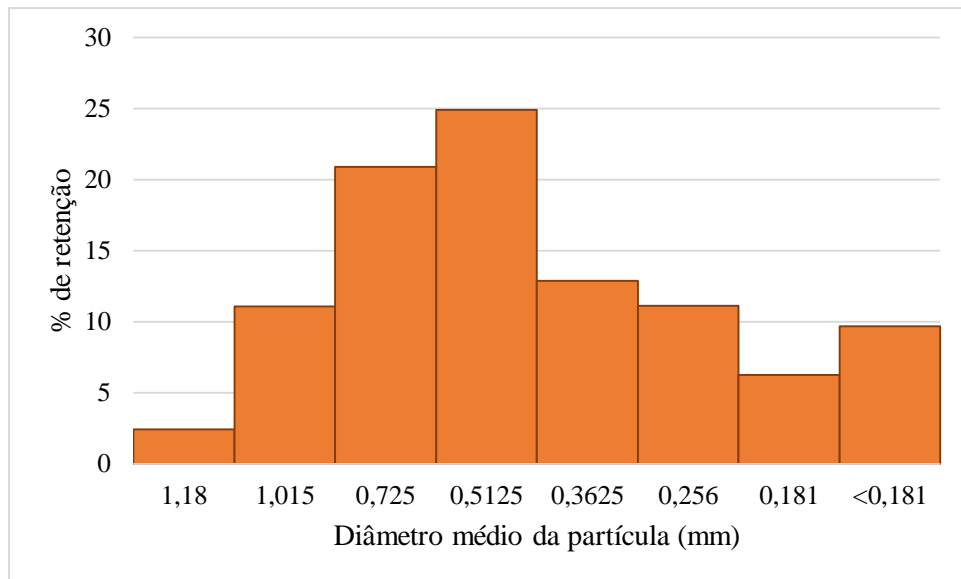
### 5.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

#### 5.3.1 Caracterização granulométrica de bagaço de cana-de-açúcar

A fim de se caracterizar a granulometria do substrato utilizado na fermentação em estado sólido, o bagaço de cana-de-açúcar (BC) lavado, seco e moído foi submetido ao peneiramento. A partir dos resultados da distribuição granulométrica do BC moído (Figura 20) de comportamento consideravelmente normal, calculou-se o diâmetro de Sauter e obteve-se que o substrato possuía 0,49 mm de diâmetro médio. A moagem do substrato aumenta a porosidade do leito e assim facilita a oxigenação e transporte de nutrientes nos meios por ele compostos, promovendo o crescimento microbiano e conseqüentemente a produção das enzimas de interesse (MOHAN et al., 2005).



Figura 20 – Distribuição granulométrica de bagaço de cana-de-açúcar, previamente seco em estufa a 50°C e moído em moinho de facas, realizada com peneiramento em série de Taylor.



Fonte: Autor (2019).

#### 5.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LIGNINA PEROXIDASE

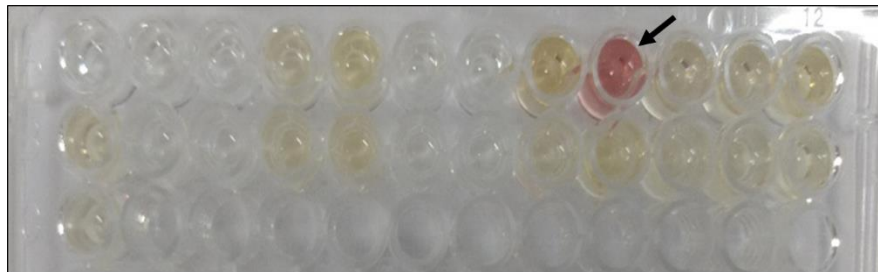
Após o cultivo em bagaço de cana-de-açúcar e extração da solução enzimática bruta de todas as condições estabelecidas no planejamento experimental (item 4.4.4), avaliou-se a atividade enzimática de lignina peroxidase (EC. 1.11.1.14). Não foi detectada atividade em nenhum dos tratamentos utilizados, resultados esses não esperados. Rasera (2006), também não detectou atividade de lignina peroxidase em extratos do fungo *Pleurotus sajor-caju* pelo método de formação de aldeído veratrílico em condições semelhantes às aplicadas no presente teste. O mesmo resultado foi encontrado por Faria (2010), ao avaliar a atividade da enzima produzida por *Ceriporiopsis subvermispora*.

Devido à falta de controle positivo para atividade enzimática de lignina peroxidase, o método aplicado não pode ser validado. Deste modo, os resultados encontrados podem ser decorrentes de más conduções do experimento, falhas no método empregado ou então ausência completa da produção da enzima avaliada.

## 5.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LACASE

Inicialmente, realizou-se o *screening* da atividade de lacase (EC.1.10.3.2) com todos os extratos brutos obtidos do planejamento experimental (item 4.4.4) em placa de 96 poços, seguindo a metodologia descrita no item 4.5.3. Pelo desenvolvimento de coloração violeta, descrita em Holm, Nielsen e Eriksen (1998) como indício de atividade enzimática de lacase, em uma das amostras (Figura 21), o extrato enzimático correspondente foi analisado em espectrofotômetro para quantificação da atividade.

Figura 21 – Placa de 96 poços com extratos enzimáticos, obtidos de fermentações em estado sólido de bagaço de cana-de-açúcar por fungos fitopatógenos, submetidos a *screening* de atividade enzimática de lacase. Resultado positivo de atividade indicado pela seta.



Fonte: Autor (2019).

A atividade enzimática de lacase foi detectada apenas no extrato enzimático bruto de *C. falcatum* na fermentação utilizando umidade de 95% ajustada com solução de extrato de levedura a 5% após 12 dias de fermentação, atingindo um valor de 473,85 UI L<sup>-1</sup>.

O resultado de atividade encontrado foi inferior ao de Hou et al. (2004) (850000 UI L<sup>-1</sup>) a partir de cultivos da espécie *Pleurotus ostreatus* em meio definido a base de sais, glicose (10 g L<sup>-1</sup>), e ureia (0,5 g L<sup>-1</sup>) por 14 dias. Em estudo com *P. ostreatus* durante 6 dias de incubação em meio definido suplementado com Tween 80, atingiu-se 3016 U L<sup>-1</sup> (TEODORO et al., 2018), atividade essa maior que a encontrada no presente estudo. No entanto, em ambos os trabalhos foi utilizado meio de cultivo de composição quimicamente definida, tornando inviável a produção dessas enzimas em escala industrial a um preço competitivo.

Por outro lado, o resultado de atividade encontrado foi superior ao relatado em cultivos de fungo *Trametes versicolor* (343 U L<sup>-1</sup>) em meio contendo glicose e esponja de nylon como suporte por 18 dias (COUTO et al., 2003). E também superior aos resultados encontrados por Aguiar Filho (2008) no cultivo de *Pleurotus ostreatoroseus* por 15 dias em bagaço de cana-de-

açúcar tratado com 1,5% NaOH e 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3,567 U L<sup>-1</sup>) e no cultivo de *T. reesei* no mesmo substrato pelo mesmo tempo (1,890 U L<sup>-1</sup>).

Já Silva, Melo e Oliveira (2004), encontraram atividade de lacase de 6,057 U L<sup>-1</sup> em cultivos líquidos com meio composto por farelo de trigo e solução de sais pela linhagem *Ganoderma* sp GASI3.4 por 7 dias. Cultivo em bagaço de cana suplementado com solução de sais pela linhagem de *Lentinus velutinus* CCB268 resultou em atividade enzimática de lacase de 23,8 U L<sup>-1</sup> (MACHADO; MATHEUS; BONONI, 2005). Ambos inferiores ao resultado encontrado para o fungo *C. falcatum*.

Para os demais ensaios, não foi detectada atividade de lacase. Em fungos, essa enzima é envolvida na degradação da lignina presente na parede celular das plantas e em aspectos da patogenicidade. Lacase também é potencialmente envolvida nos processos de esporulação e biossíntese de melanina em vários fungos (ENGUITA et al., 2003; CLAUS, 2004).

Os resultados expostos mostram que quando utilizados meios definidos, são alcançadas atividades enzimáticas maiores do que aquelas obtidas por cultivos utilizando substratos orgânicos como fonte de carbono, como é o caso do presente estudo. Dessa maneira, a linhagem de *C. falcatum* nas condições do ensaio (95% de umidade, solução de extrato de levedura a 5% e 12 dias de incubação) se mostra como possível produtora de lacase.

## 5.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CELULASES

De acordo com o planejamento experimental aplicado (item 4.4.4), todos os extratos enzimáticos brutos obtidos foram avaliados em relação a atividade enzimática de endoglucase (EC 3.2.1.4) e celulases totais (FPase).

Após o tempo de incubação de cada ensaio, verificou-se que todo o bagaço de cana-de-açúcar presente no meio havia sido colonizado. Os resultados encontrados para as atividades das enzimas celulolíticas produzidas por fermentação em estado sólido por *T. paradoxa* e *C. falcatum* são mostrados na Tabela 6.

Para o fungo *T. paradoxa*, a maior atividade enzimática de FPase foi de 0,307 U mL<sup>-1</sup>, atingida em condições de 95% de umidade ajustada com solução de extrato de levedura a 2,5% e 8 dias de fermentação. Já para endoglucanase, obteve-se atividade de até 0,690 U mL<sup>-1</sup> quando aplicadas as condições de 90% de umidade ajustada com solução de extrato de levedura a 5% e 4 dias de incubação (Tabela 6).

Para o fungo *C. falcatum* a maior atividade enzimática de FPase foi de 0,183 U mL<sup>-1</sup>, atingida quando se aplicou as condições de 90% de umidade ajustada com solução de extrato de levedura de 2,5% e 8 dias de fermentação. Para endoglucanase, a maior atividade verificada foi de 2,754 U mL<sup>-1</sup> nas mesmas condições de fermentação (Tabela 6).

Tabela 6 – Atividade enzimática de endoglucanase (AE<sub>Endogl.</sub>) e celulasas totais (AE<sub>FPase</sub>) obtidas por fermentações em estado sólido a 28 °C de bagaço de cana-de-açúcar por *Thielaviopsis paradoxa* e *Colletotrichum falcatum*.

<i>Thielaviopsis paradoxa</i> <i>Colletotrichum falcatum</i>							
Ensaio	Umidade (%)	YE (%)	Tempo (dias)	AE <sub>FPase</sub> (FPU mL <sup>-1</sup> )	AE <sub>Endogl.</sub> (U mL <sup>-1</sup> )	AE <sub>FPase</sub> (FPU mL <sup>-1</sup> )	AE <sub>Endogl.</sub> (U mL <sup>-1</sup> )
1	85,000	0,000	4,000	0,108	0,104	0,089	0,610
2	95,000	0,000	4,000	0,058	0,513	0,127	0,209
3	85,000	5,000	4,000	0,288	0,026	0,152	2,634
4	95,000	5,000	4,000	0,204	0,690	0,121	0,183
5	85,000	0,000	12,000	0,089	0,095	0,068	0,439
6	95,000	0,000	12,000	0,033	0,352	0,041	0,000
7	85,000	5,000	12,000	0,179	0,168	0,137	2,578
8	95,000	5,000	12,000	0,190	0,407	0,139	2,019
9	90,000	2,500	8,000	0,284	0,296	0,171	2,301
10	90,000	2,500	8,000	0,290	0,432	0,164	2,446
11	90,000	2,500	8,000	0,307	0,409	0,135	2,754
12	90,000	2,500	8,000	0,290	0,379	0,183	2,519

Fonte: Autor (2019).

A atividade de FPase corresponde a atividade de celulasas totais, ou seja, exoglucanases (EC 3.2.1.91),  $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21) e endoglucanase, sendo que a atuação de ambas ocorre em sinergia (ROSGAARD; MEYER, 2007). Nesse sentido, a maximização da atividade de FPase num extrato enzimático se faz mais preponderante se comparada com a importância da maximização de endoglucanase, pois para liberação de açúcares simples de substratos complexos é necessário a atividade sinérgica das celulasas totais.

Assim, os valores inferiores de FPase, se comparados com a atividade de endoglucanase, são explicados pelo fato de uma enzima depender da atuação da outra para degradação de um

substrato mais complexo se comparado com o CMC. Portanto, em casos onde há pouca atividade de uma das enzimas a atividade total também é diminuída. O mesmo comportamento foi encontrado por Siqueira (2011), ao se avaliar a produção de endoglucanase e FPase do extrato enzimático comercial de *T. reesei* e por Valadares (2013) para avaliações de extratos de *P. ostreatus* cultivado em bagaço de cana-de-açúcar suplementado por diferentes sais.

Basso, Gallo e Basso (2010), após incubação de *T. reesei* QM9414 em bagaço de cana-de-açúcar suplementado com solução de sais por 15 dias, obtiveram atividade máxima inferior a  $0,2 \text{ U mL}^{-1}$  para FPase e inferior a  $0,5 \text{ U mL}^{-1}$  para endoglucanase. Já para a linhagem *T. reesei* RUT C30 nas mesmas condições de fermentação, os valores de atividade celulolítica encontrados são ainda menores. Ambas as atividades são inferiores às encontradas na presente análise.

Em cultivo de *Pleurotus tailandia* em bagaço de cana-de-açúcar atingiu-se um máximo de  $0,06 \text{ U mL}^{-1}$  para endoglucanase após 10 dias de incubação (MENEZES; SILVA; DURRANT, 2009). Valor de atividade máxima de endoglucanase de  $0,60 \text{ U mL}^{-1}$  foi encontrado por Sales et al. (2010), durante a fermentação de bagaço de cana-de-açúcar por *Aspergillus aculeatus* URM 4953 durante 7 dias.

No entanto, atividade de  $0,42 \text{ U mL}^{-1}$  de celulases totais e  $4,9 \text{ U mL}^{-1}$  de endoglucanase foram verificadas em extratos enzimáticos de *Aspergillus awamori* cultivado em farelo de trigo suplementado com extrato de levedura e sais por um período de 7 dias (GOTTSCHALK; OLIVEIRA; BON, 2010). Ressalta-se que as atividades encontradas por Gottschalk, Oliveira e Bon (2010), foram determinadas em condições diferentes das aplicadas no presente estudo.

Bortolazzo (2011) isolou fungos crescidos em bagaço de cana-de-açúcar de diferentes usinas e avaliou a atividade celulolítica dos isolados. Os melhores resultados de celulases totais ( $0,17$  e  $0,24 \text{ U mL}^{-1}$ , após 21 dias de cultivo) encontrados são semelhantes aos obtidos para os fungos *C. falcatum* e *T. paradoxa*. Já para a enzima endoglucanase a maior atividade foi de somente  $0,50 \text{ U mL}^{-1}$ , obtida posterior a 21 dias de incubação, sendo 5,4 vezes inferior ao resultado encontrado no presente estudo para o fungo *C. falcatum*. Ambas as atividades encontradas sinalizam para o fato das espécies *C. falcatum* e *T. paradoxa* serem utilizadas como eficientes biofábricas de celulases, devido às altas atividades enzimáticas obtidas nos ensaios do experimento.

## 5.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

A fim de se verificar e quantificar os efeitos causados pelo teor de umidade, solução de extrato de levedura, tempo de cultivo e suas interações nas atividades enzimáticas de FPase e endoglucanase, os resultados supracitados (Tabela 6, item 5.6) foram submetidos à análise estatística. Para isso tratou-se os dados obtidos como fatorial completo  $2^3$  com termos de interação linear e tendência de curvatura dos dados.

### 5.7.1 Produção de celulasas por *Thielaviopsis paradoxa*

Os efeitos causados pelas variáveis estudadas no planejamento experimental, bem como a estimativa dos coeficientes do modelo ajustado dentro do intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05), com coeficiente de determinação do modelo,  $R^2$ , de 0,95192 referente à atividade de endoglucanase de *T. paradoxa* são mostrados na Tabela 7. A coluna de “*Erro padrão*” indica os resíduos implícitos nos efeitos apresentados. O “*p-valor*” diz respeito a significância do efeito causado pela variável. Já a coluna de “*Coeficiente*” é utilizada para estimar o modelo que descreve o planejamento aplicado.

Tabela 7 – Efeito causado pelas condições de umidade, extrato de levedura (YE) e tempo de cultivo de *Thielaviopsis paradoxa* na atividade enzimática de endoglucanase e estimativa dos coeficientes do modelo ajustado do planejamento  $2^3$  completo.

	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coeficiente
<b>Intercepto</b>	<b>0,294376</b>	<b>0,024974</b>	<b>0,000296</b>	<b>0,294376</b>
Curvatura	0,169866	0,086513	0,121071	0,084933
<b>(1) Umidade (%)</b>	<b>0,392834</b>	<b>0,049948</b>	<b>0,001412</b>	<b>0,196417</b>
(2) YE (%)	0,056908	0,049948	0,318155	0,028454
(3) Tempo (dias)	-0,077644	0,049948	0,195036	-0,038822
(1 x 2)	0,059399	0,049948	0,300124	0,029700
<b>(1 x 3)</b>	<b>-0,144179</b>	<b>0,049948</b>	<b>0,044717</b>	<b>-0,072090</b>
(2 x 3)	0,007317	0,049948	0,890619	0,003659

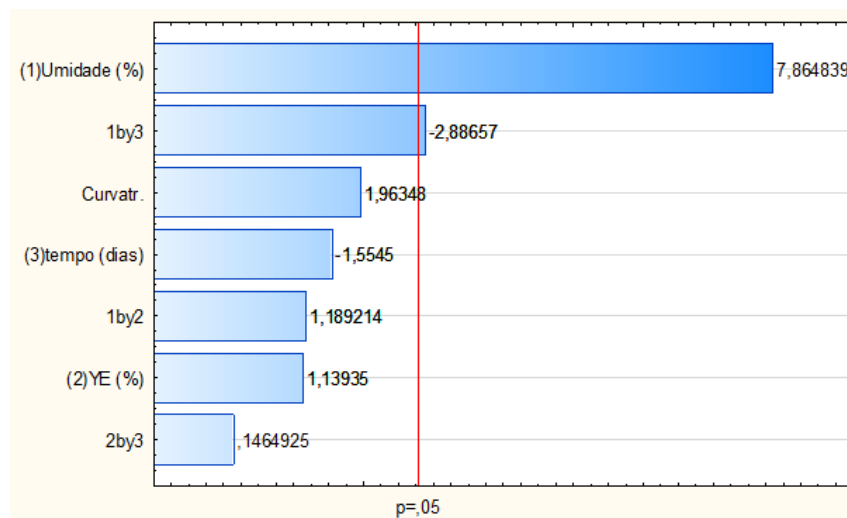
Fonte: Autor (2019).

A análise dos dados permite inferir que a variável *tempo de cultivo* possui efeito negativo sobre a atividade enzimática de endoglucanase de *T. paradoxa*, justificado pelo provável

esgotamento dos nutrientes no decorrer do tempo de incubação. As demais variáveis, *umidade e extrato de levedura (YE)*, tiveram efeito positivo sobre a atividade enzimática avaliada. Ou seja, maiores tempos de cultivo diminuem a atividade resultante de endoglucanase e as outras variáveis analisadas, em valores maiores tendem a gerar resultados melhores de atividade.

A partir do diagrama de Pareto (Figura 22) é possível avaliar a significância dos dados ajustados pelo modelo, confirmando que para o fungo *T. paradoxa* o teor de umidade e a interação dele com o tempo de cultivo interferiram significativamente na atividade enzimática de endoglucanase obtida pela fermentação de bagaço de cana-de-açúcar por *T. paradoxa*, considerando os intervalos estudados das variáveis. Assim, alterações nos teores de umidade implicam em variações estatisticamente significativas na atividade enzimática de endoglucanase, sendo que como supracitado, o efeito é positivo.

Figura 22 – Diagrama de Pareto dos dados de atividade enzimática de endoglucanase em decorrência da variação da umidade, extrato de levedura (YE) e tempo de cultivo de *Thielaviopsis paradoxa*.



Fonte: Autor (2019).

Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira (2014), onde a suplementação com YE não influenciou significativamente a produção de celulase por *Melanoporia* sp. em fermentação submersa com pó da casca de coco, bagaço ou palha de cana-de-açúcar como substrato indutor. Do mesmo modo, Sun et al. (2010), mostraram que fontes de nitrogênio apresentam pouco ou nenhum efeito na produção de endoglucanase por *Trichoderma viride* GIM 3.0010.

Para validação estatística do modelo ajustado, realizou-se a análise de variância dos dados (Tabela 8).

Tabela 8 – Análise de Variância (ANOVA) dos dados de atividade enzimática de endoglucanase por *Thielaviopsis paradoxa*. Onde, SS corresponde a soma quadrática; gl aos graus de liberdade do sistema; MS a média quadrática; F o valor da estatística; YE a extrato de levedura.

	SS	gl	MS	F	p-valor
Curvatura	0,019236	1	0,019236	3,85525	0,121071
(1) Umidade (%)	0,308637	1	0,308637	61,85569	0,001412
(2) YE (%)	0,006477	1	0,006477	1,29812	0,318155
(3) Tempo (dias)	0,012057	1	0,012057	2,41647	0,195036
(1 x 2)	0,007056	1	0,007056	1,41423	0,300124
(1 x 3)	0,041575	1	0,041575	8,33231	0,044717
(2 x 3)	0,000107	1	0,000107	0,02146	0,890619
Regressão	0,395147	7	0,056450	11,31336	
Resíduos	0,019959	4	0,004990		
Total	0,415105	11			

Fonte: Autor (2019).

Devido ao alto valor do coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,95192$ ) e como o valor de  $F_{\text{CALCULADO}}$  da regressão apresentado é maior que o  $F_{\text{TABELADO}}$  de 6,09 (Tabela 8), o modelo de ajuste dos dados é aceito estatisticamente e, portanto, valida-se a Equação 6, que prediz o comportamento da atividade de endoglucanase dentro do intervalo avaliado de teor de umidade, extrato de levedura e tempo de cultivo.

$$\begin{aligned}
 AE_{\text{ENDOG.}} = & 0,294376 + 0,084933 C + 0,196417 U + 0,028454 YE - 0,038822 t \\
 & + 0,029700 U YE - 0,072090 U t + 0,003659 YE t \quad (\text{Equação 6})
 \end{aligned}$$

Na qual,

$AE_{\text{ENDOG.}}$ : atividade enzimática de endoglucanase ( $U \text{ mL}^{-1}$ );

C = curvatura aplicada;

U: teor de umidade em base úmida codificado ( $-1 < U < +1$ );

YE: extrato de levedura codificado ( $-1 < YE < +1$ );

t: tempo de cultivo codificado ( $-1 < t < +1$ ).

Pela análise das superfícies de resposta (Figura 23), nota-se aumentos significativos na atividade de endoglucanase quando utilizados maiores teores de umidade combinados com

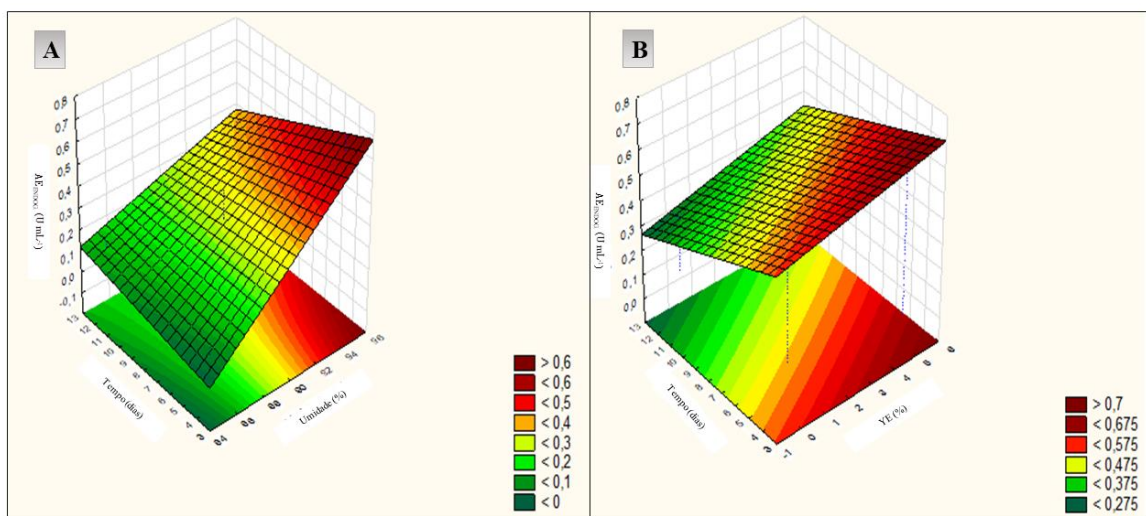


menores tempos de cultivo. A mesma relação de resposta é atingida em menores tempos combinados com altos teores de YE, porém sem significância estatística. Assim, confirma-se o efeito negativo do tempo na resposta de atividade enzimática supracitado.

Similarmente, Rodriguez (2011) obteve melhores resultados de atividade de endoglucanase por *Aspergillus niger* cultivado em bagaço de cana-de-açúcar com suplementação da fonte de carbono por extrato de soja, em menores tempos de cultivo (4 dias) e em condições de 75% umidade e 1,5 g L<sup>-1</sup> YE.

No entanto, fermentações conduzidas por maiores tempos geram significativas atividades enzimáticas quando na presença de altos teores de YE, sugerindo que com a suplementação da fonte de nitrogênio os nutrientes ainda se encontram disponíveis até 7 dias de incubação do fungo *T. paradoxa*. A partir de tal tempo verifica-se decaimento na atividade enzimática (Figura 23B), possivelmente devido ao esgotamento da fonte de nitrogênio.

Figura 23 – Superfície de resposta da atividade enzimática de endoglucanase (AE<sub>ENDOG.</sub>) de *Thielaviopsis paradoxa*. A) AE<sub>ENDOG.</sub> em função do tempo e umidade. B) AE<sub>ENDOG.</sub> em função do tempo e extrato de levedura (YE).



Fonte: Autor (2019).

Os efeitos causados pelas variáveis estudadas no planejamento experimental referente a atividade de celulasas totais por *T. paradoxa*, bem como a estimativa dos coeficientes do modelo ajustado, são mostrados na Tabela 9. Se utilizou intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05) em fatorial completo 2<sup>3</sup>, obtendo coeficiente de determinação do modelo, R<sup>2</sup>, de 0,98605.

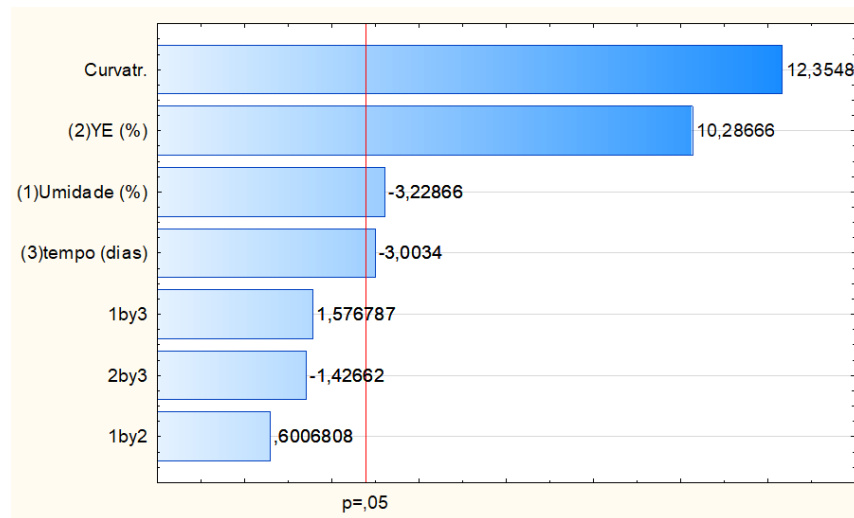
Tabela 9 – Efeito causado pelas condições de umidade, extrato de levedura (YE) e tempo de cultivo de *Thielaviopsis paradoxa* na atividade enzimática de celulases totais (FPase) e estimativa dos coeficientes do modelo ajustado do planejamento  $2^3$  completo.

	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coefficiente
<b>Intercepto</b>	<b>0,143545</b>	<b>0,006967</b>	<b>0,000033</b>	<b>0,143545</b>
<b>Curvatura</b>	<b>0,298180</b>	<b>0,024135</b>	<b>0,000247</b>	<b>0,149090</b>
<b>(1) Umidade (%)</b>	<b>-0,044988</b>	<b>0,013934</b>	<b>0,032016</b>	<b>-0,022494</b>
<b>(2) YE (%)</b>	<b>0,143335</b>	<b>0,013934</b>	<b>0,000504</b>	<b>0,071668</b>
<b>(3) Tempo (dias)</b>	<b>-0,041850</b>	<b>0,013934</b>	<b>0,039808</b>	<b>-0,020925</b>
(1 x 2)	0,008370	0,013934	0,580430	0,004185
(1 x 3)	0,021971	0,013934	0,189976	0,010986
(2 x 3)	-0,019879	0,013934	0,226848	-0,009939

Fonte: Autor (2019).

As três variáveis analisadas geraram efeitos estatisticamente significativos na atividade de celulases totais por *T. paradoxa*, confirmada pela análise de Pareto (Figura 24). Dentre elas, a *umidade* e o *tempo de cultivo* tiveram efeito negativo, indicando que maiores teores de umidade e maiores tempos de cultivo resultam em menores atividades de celulases totais. Já *extrato de levedura (YE)* possui efeito positivo na resposta de atividade, assim em níveis superiores da variável se obtém maior atividade enzimática. Similarmente foi observado que a atividade de FPase secretada por *A. niger* em bagaço de cana-de-açúcar suplementado por outras fontes de carbono, sofre influência significativa pelo teor de umidade e a presença de YE do ensaio (RODRIGUEZ, 2011).

Figura 24 – Diagrama de Pareto dos dados de atividade enzimática de celulases totais em decorrência da variação da umidade, extrato de levedura (YE) e tempo de cultivo de *Thielaviopsis paradoxa*.



Fonte: Autor (2019).

Além disso, verificou-se que os dados ajustados pelo modelo não se apresentam de forma linear, tendo tendência a apresentar curvatura – comprovada pela variável *curvatura* ser significativa (Figura 24).

A validação do modelo ajustado pela análise de variância é apresentada na Tabela 10.

Tabela 10 – Análise de Variância (ANOVA) dos dados de atividade enzimática de celulases totais por *Thielaviopsis paradoxa*. Em que, SS corresponde a soma quadrática; gl aos graus de liberdade do sistema; MS a média quadrática; F o valor da estatística; YE a extrato de levedura.

	SS	gl	MS	F	p-valor
Curvatura	0,059274	1	0,059274	152,6427	0,000247
(1) Umidade (%)	0,004048	1	0,004048	10,4242	0,032016
(2) YE (%)	0,041090	1	0,041090	105,8154	0,000504
(3) Tempo (dias)	0,003503	1	0,003503	9,0204	0,039808
(1 x 2)	0,000140	1	0,000140	0,3608	0,580430
(1 x 3)	0,000965	1	0,000965	2,4863	0,189976
(2 x 3)	0,000790	1	0,000790	2,0352	0,226848
Regressão	0,109811	7	0,015687	40,3979	
Resíduos	0,001553	4	0,000388		
Total	0,111364	11			

Fonte: Autor (2019).

Pelo valor de  $F_{\text{CALCULADO}}$  da regressão ser maior que o  $F_{\text{TABELADO}}$  de 6,09 e pelo alto valor de coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,98605$ ), o modelo ajustado aos dados é estatisticamente aceito e a Equação 7 validada, a qual prediz o comportamento da atividade de celulasas totais nos intervalos de teor de umidade, extrato de levedura e tempo de cultivo avaliados.

$$AE_{\text{FPase}} = 0,143545 + 0,149090 C - 0,022494 U + 0,071668 YE - 0,020925 t \\ + 0,004185 U YE + 0,010986 U t - 0,009939 YE t \quad (\text{Equação 7})$$

Na qual,

$AE_{\text{FPase}}$ : atividade enzimática de endoglucanase ( $\text{FPU mL}^{-1}$ );

C = curvatura aplicada;

U: teor de umidade em base úmida codificado ( $-1 < U < +1$ );

YE: extrato de levedura codificado ( $-1 < YE < +1$ );

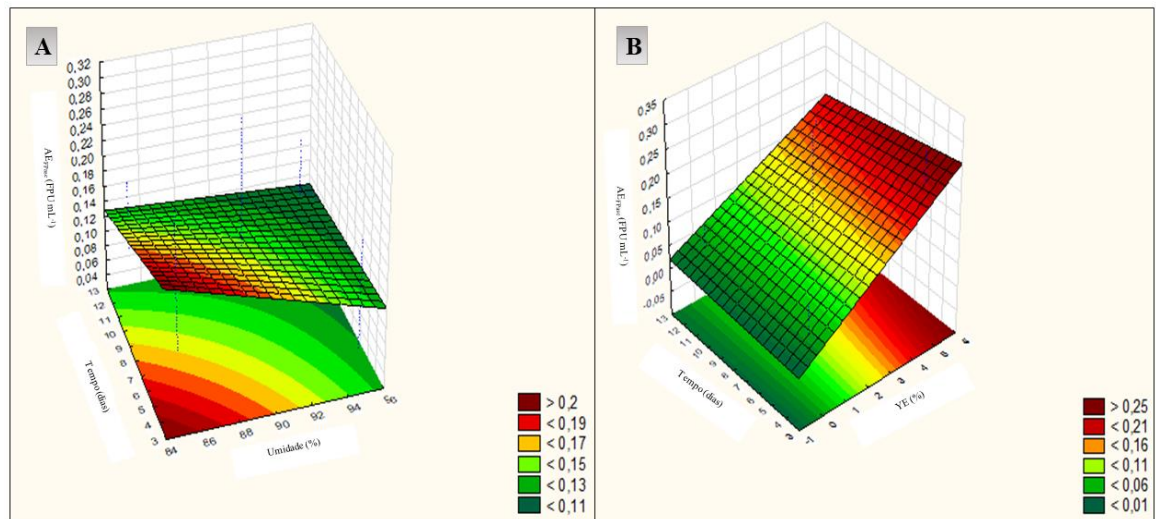
t: tempo de cultivo codificado ( $-1 < t < +1$ ).

Após a validação do modelo, são apresentadas as superfícies de resposta na Figura 25, a fim de se estudar o comportamento da resposta de atividade pela influência das variáveis *umidade, extrato de levedura e tempo de cultivo*.

Máximas atividades de celulasas totais produzidas por *T. paradoxa* são atingidas em combinações de baixos tempos de fermentação com baixos teores de umidade e em caso de suplementação por YE, maiores concentrações levam a maiores atividades independentemente do tempo de cultivo, considerando o intervalo avaliado.

O comportamento de *tempo* combinado com *YE* similar ao obtido para atividade de endoglucanase, reforça a hipótese de que quando suplementado por YE (fonte de nitrogênio) o bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono é consumido por um tempo maior, havendo assim desenvolvimento do fungo e secreção de enzimas durante todo o intervalo de tempo analisado. Assim, torna-se possível desenvolver a fermentação por *T. paradoxa* por maiores tempos obtendo, ainda assim, atividades enzimáticas relevantes.

Figura 25 – Superfície de resposta da atividade enzimática de celulases totais ( $AE_{FPase}$ ) de *Thielaviopsis paradoxa*. A)  $AE_{FPase}$  em função do tempo e umidade. B)  $AE_{FPase}$  em função do tempo e extrato de levedura (YE).



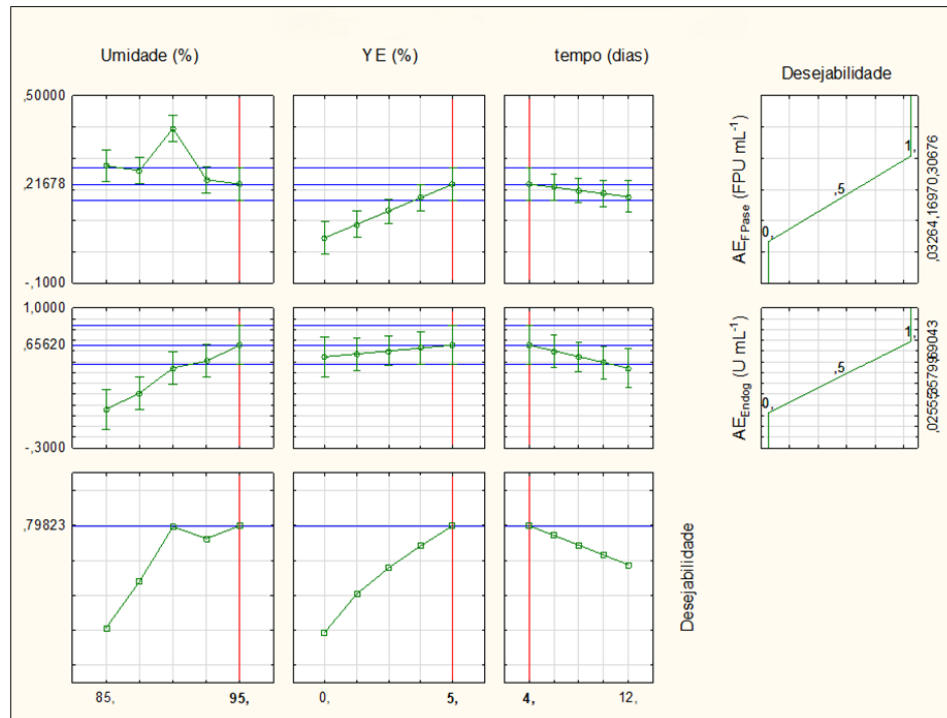
Fonte: Autor (2019).

As condições que maximizam simultaneamente a produção de endoglucanase e celulases totais secretadas por *T. paradoxa*, são apresentadas no gráfico de desejabilidade (Figura 26).

No caso da  $FP_{ase}$ , o ponto ótimo para maximização da atividade é em 90% de umidade, presença de YE a 5% e em 4 dias de cultivo. Já para a endoglucanase, atinge-se maior atividade enzimática em 95% de umidade, suplementação com YE a 5% e no mesmo tempo de cultivo (4 dias). Ponderando-se as atividades de ambas as enzimas e a significância dos efeitos, estabelece-se os pontos ótimos das variáveis estudadas com o intuito de maximizar a atividade resultante, assim, 90 ou 95% de umidade, solução de YE a 5% e 4 dias de cultivo, implicam em melhor resposta total de atividade enzimática.

Como critério final de seleção das condições ótimas, estabelece-se a maximização de  $FP_{ase}$  como sendo de maior importância, isso devido ao fato de industrialmente os açúcares fermentativos estarem polymerizados em substratos complexos e serem liberados somente após a ação sinérgica de diferentes enzimas. Portanto, as condições ótimas encontradas são 90% de umidade, solução de YE a 5% e 4 dias de cultivo.

Figura 26 – Comportamento das variáveis umidade, extrato de levedura (YE) e tempo de cultivo para maximização das atividades enzimáticas de endoglucanase ( $AE_{\text{ENDOGL}}$ ) e celulasas totais ( $AE_{\text{FPase}}$ ) secretadas por *Thielaviopsis paradoxa*.



Fonte: Autor (2019).

### 5.7.2 Produção de celulasas por *Colletotrichum falcatum*

Quanto aos efeitos causados na atividade enzimática de endoglucanase produzida por fermentação de bagaço de cana-de-açúcar pelo fungo *C. falcatum*, apresenta-se a Tabela 11, obtida pelo ajuste dos dados em fatorial completo  $2^3$ . Se utilizou intervalo de confiança de 95% ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) e se obteve coeficiente de determinação do modelo,  $R^2$ , de 0,96023. Similarmente à análise das fermentações por *T. paradoxa*, a coluna de “*Erro padrão*” indica os resíduos implícitos nos efeitos apresentados; “*p-valor*” refere-se a significância do efeito causado na resposta e os valores de “*Coeficiente*” são utilizados para estimar o modelo que descreve o planejamento aplicado.

Dos efeitos apresentados, verifica-se que o único que apresenta efeito negativo sobre a atividade enzimática de endoglucanase foi o causado pela variável *umidade*; *YE* e *tempo de cultivo* causaram efeitos positivos na resposta estudada. Assim, determina-se que maiores tempos de cultivo implicaram em atividades enzimáticas menores, enquanto o aumento dos teores de umidade e YE resultaram em maiores atividades de endoglucanase.

Tabela 11 – Efeito causado pelas condições de umidade, extrato de levedura (YE) e tempo de cultivo de *Colletotrichum falcatum* na atividade enzimática de endoglucanase e estimativa dos coeficientes do modelo ajustado do planejamento  $2^3$  completo.

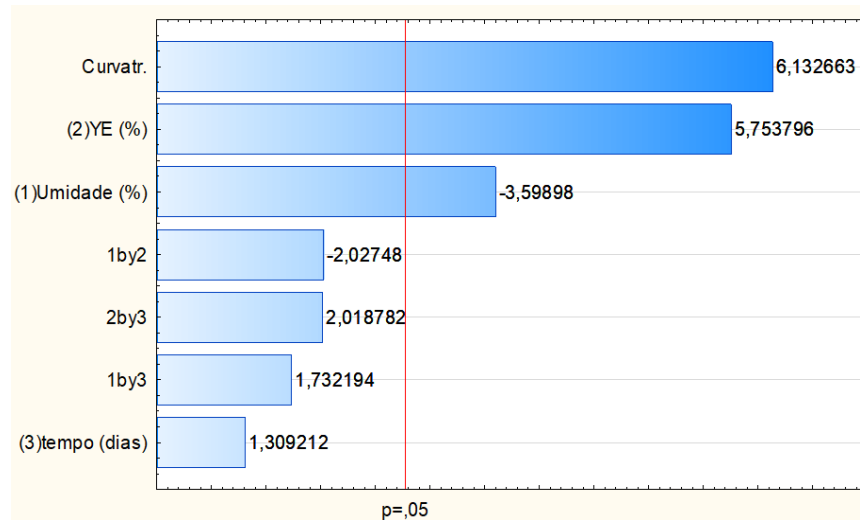
	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coeficiente
<b>Intercepto</b>	<b>1,084141</b>	<b>0,133746</b>	<b>0,001259</b>	<b>1,084141</b>
<b>Curvatura</b>	<b>2,841322</b>	<b>0,463310</b>	<b>0,003583</b>	<b>1,420661</b>
<b>(1) Umidade (%)</b>	<b>-0,962698</b>	<b>0,267492</b>	<b>0,022779</b>	<b>-0,481349</b>
<b>(2) YE (%)</b>	<b>1,539094</b>	<b>0,267492</b>	<b>0,004525</b>	<b>0,769547</b>
(3) Tempo (dias)	0,350204	0,267492	0,260604	0,175102
(1 x 2)	-0,542336	0,267492	0,112535	-0,271168
(1 x 3)	0,463348	0,267492	0,158276	0,231674
(2 x 3)	0,540008	0,267492	0,113655	0,270004

Fonte: Autor (2019).

O diagrama de Pareto, utilizado para avaliar a significância dos efeitos causados (Figura 27), mostra que com exceção do *tempo*, as demais variáveis nos intervalos estudados tiveram efeitos significativos na atividade enzimática de endoglucanase produzida por *C. falcatum*. Os dados de resposta ajustados pelo modelo possuem tendência de curvatura, conforme a significância apresentada.

Marques (2017), ao avaliar a produção de endoglucanase por co-cultivo de *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04 em farelo de algodão e farelo de trigo (1:1) suplementado por diversos sais, também obteve umidade como um fator significativo. Entretanto, a fonte de nitrogênio utilizada pelo autor (ureia) não se mostrou significativa sobre a atividade de endoglucanase.

Figura 27 – Diagrama de Pareto dos dados de atividade enzimática de endoglucanase em decorrência da variação da umidade, extrato de levedura (YE) e tempo de cultivo de *Colletotrichum falcatum*.



Fonte: Autor (2019).

O modelo ajustado é validado pela análise de variância (Tabela 12), tendo em vista o  $F_{\text{CALCULADO}}$  da regressão superior ao  $F_{\text{TABELADO}}$  de 6,09 e também em decorrência do valor de coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,96023$ ).

$$AE_{\text{ENDOGL.}} = 1,084141 + 1,420661 C - 0,481349 U + 0,769547 YE - 0,175102 t - 0,271168 U YE + 0,231674 U t + 0,0270004 YE t \quad (\text{Equação 8})$$

Tabela 12 – Análise de Variância (ANOVA) dos dados de atividade enzimática de endoglucanase por *Colletotrichum falcatum*. Em que, SS corresponde a soma quadrática; gl aos graus de liberdade do sistema; MS a média quadrática; F o valor da estatística; YE a extrato de levedura.

	SS	gl	MS	F	p-valor
Curvatura	5,38208	1	5,382075	37,60955	0,003583
(1) Umidade (%)	1,85358	1	1,853576	12,95266	0,022779
(2) YE (%)	4,73762	1	4,737623	33,10617	0,004525
(3) Tempo (dias)	0,24529	1	0,245285	1,71403	0,260604
(1 x 2)	0,58826	1	0,588256	4,11069	0,112535
(1 x 3)	0,42938	1	0,429383	3,00050	0,158276
(2 x 3)	0,58322	1	0,583217	4,07548	0,113655
Regressão	13,81942	7	1,974202	13,79558	
Resíduos	0,57242	4	0,143104		



Total	14,39183	11
-------	----------	----

Fonte: Autor (2019).

Com a validação do modelo, estabelece-se a Equação 8 de modo a descrever o comportamento da atividade de endoglucanase nos intervalos de teor de umidade, extrato de levedura e tempo de cultivo avaliados.

$$AE_{\text{ENDOGL.}} = 1,084141 + 1,420661 C - 0,481349 U + 0,769547 YE - 0,175102 t - 0,271168 U YE + 0,231674 U t + 0,0270004 YE t \quad (\text{Equação 8})$$

Na qual,

$AE_{\text{ENDOGL.}}$ : atividade enzimática de endoglucanase ( $U \text{ mL}^{-1}$ );

C = curvatura aplicada;

U: teor de umidade em base úmida codificado ( $-1 < U < +1$ );

YE: extrato de levedura codificado ( $-1 < YE < +1$ );

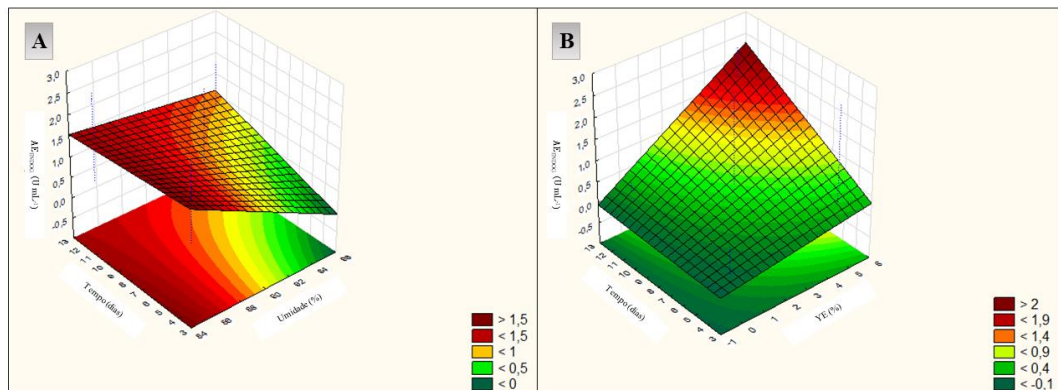
t: tempo de cultivo codificado ( $-1 < t < +1$ ).

Com a validação do modelo ajustado, apresenta-se as superfícies de resposta da atividade enzimática de endoglucanase produzida por *C. falcatum* influenciada pelas variáveis *umidade*, *tempo de cultivo* e extrato de *levedura* (Figura 28).

Nos intervalos avaliados, maiores atividades enzimáticas de endoglucanase por *C. falcatum* são obtidas em menores teores de umidade em quaisquer intervalos de tempo ou então em maiores tempos, combinados com suplementação do bagaço de cana-de-açúcar com YE.

A alta atividade enzimática de endoglucanase obtida em todo o tempo avaliado pode ser explicada pelo crescimento de *C. falcatum* ser mais lento, então a colonização do substrato e posterior secreção de enzimas ocorre de modo mais controlado. Em presença de YE, tempos maiores causam aumentos na atividade de endoglucanase.

Figura 28 – Superfície de resposta da atividade enzimática de endoglucanase ( $AE_{\text{ENDOGL.}}$ ) de *Colletotrichum falcatum*. A)  $AE_{\text{ENDOGL.}}$  em função do tempo e umidade. B)  $AE_{\text{ENDOGL.}}$  em função do tempo e extrato de levedura (YE).



Fonte: Autor (2019).

Para a atividade enzimática de celulasas totais (FPase) secretadas por *C. falcatum*, semelhante as demais análises, os dados de celulasas totais foram ajustados em fatorial completo  $2^3$ , com intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05), obtendo coeficiente de determinação,  $R^2$ , de 0,87564.

Dos efeitos avaliados (Tabela 13), tem-se que somente a variável *YE* apresenta efeito positivo sobre a atividade de celulasas totais. Tanto *umidade*, quanto *tempo de cultivo* causaram efeitos negativos sobre a resposta de atividade. Desse modo, tende-se a obter melhores atividades em sistemas com altos teores de YE, baixos de umidade e em maiores tempos de cultivo, dentro do intervalo avaliado no fatorial.

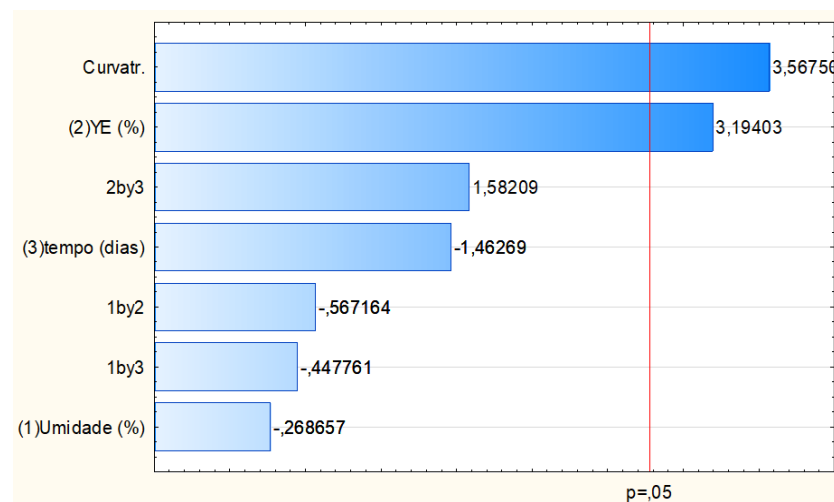
Tabela 13 – Efeito causado pelas condições de umidade, extrato de levedura (YE) e tempo de cultivo de *Colletotrichum falcatum* na atividade enzimática de celulasas totais e estimativa dos coeficientes do modelo ajustado do planejamento  $2^3$  completo.

	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coefficiente
<b>Intercepto</b>	<b>0,109280</b>	<b>0,008762</b>	<b>0,000238</b>	<b>0,109280</b>
<b>Curvatura</b>	<b>0,108286</b>	<b>0,030353</b>	<b>0,023428</b>	<b>0,054143</b>
(1) Umidade (%)	-0,004708	0,017525	0,801481	-0,002354
<b>(2) YE (%)</b>	<b>0,055974</b>	<b>0,017525</b>	<b>0,033089</b>	<b>0,027987</b>
(3) Tempo (dias)	-0,025633	0,017525	0,217378	-0,012816
(1 x 2)	-0,009939	0,017525	0,600917	-0,004970
(1 x 3)	-0,007847	0,017525	0,677505	-0,003923
(2 x 3)	0,027725	0,017525	0,188792	0,013863

Fonte: Autor (2019).

No que se refere a significância dos efeitos causados na atividade enzimática de celulases totais, apenas *YE* teve impacto significativo nos valores de atividade, já as variáveis *umidade* e *tempo de cultivo* não causam alterações significativas no processo. Também é possível verificar que os dados de resposta não se comportam de maneira linear, haja vista a significância apresentada pela curvatura aplicada (Figura 29).

Figura 29 – Diagrama de Pareto dos dados de atividade enzimática de celulases totais em decorrência da variação da umidade, extrato de levedura (YE) e tempo de cultivo de *Colletotrichum falcatum*.



Fonte: Autor (2019).

Para validação do modelo, novamente se aplicou análise de variância (ANOVA) aos dados de resposta (Tabela 14). Nesse caso o valor de  $F_{\text{CALCULADO}}$  da regressão é inferior ao  $F_{\text{TABELADO}}$  de 6,09, então o modelo ajustado aos dados experimentais de atividade enzimática de celulases totais não é validado, dentro do intervalo de confiança de 95%. Isso indica que a regressão aplicada não se ajusta aos dados experimentais e, portanto, não se pode prever o comportamento da variável resposta.

Tabela 14 – Análise de Variância (ANOVA) dos dados de atividade enzimática de celulasas totais por *Colletotrichum falcatum*. Em que, SS corresponde a soma quadrática; gl aos graus de liberdade do sistema; MS a média quadrática; F o valor da estatística; YE a extrato de levedura.

	SS	gl	MS	F	p-valor
Curvatura	0,007817	1	0,007817	12,72711	0,023428
(1) Umidade (%)	0,000044	1	0,000044	0,07218	0,801481
(2) YE (%)	0,006266	1	0,006266	10,20183	0,033089
(3) Tempo (dias)	0,001314	1	0,001314	2,13945	0,217378
(1 x 2)	0,000198	1	0,000198	0,32168	0,600917
(1 x 3)	0,000123	1	0,000123	0,20049	0,677505
(2 x 3)	0,001537	1	0,001537	2,50301	0,188792
Regressão	0,017300	7	0,002471	4,02368	
Resíduos	0,002457	4	0,000614		
Total	0,019757	11			

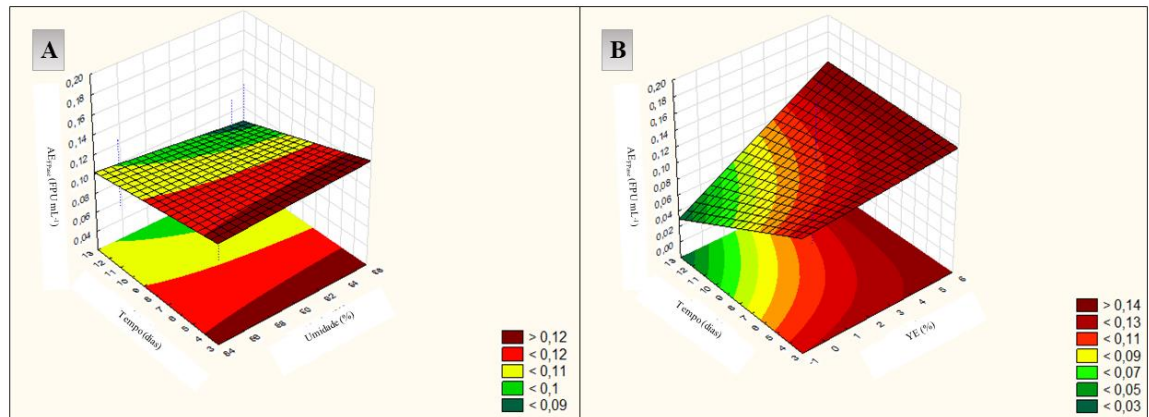
Fonte: Autor (2019).

Entretanto, mesmo com a invalidação do modelo ajustado apresenta-se as superfícies de resposta obtidas para avaliação da tendência do comportamento de atividade enzimática, quando influenciada pelas variáveis *umidade*, *YE* e *tempo de cultivo* (Figura 30).

Sugere-se que menores tempos de cultivo, em ampla faixa de umidade, provocam atividade enzimática de celulasas totais alta, bem como que a suplementação do substrato por YE no nível máximo estudado permite alcançar os mesmos resultados de atividade, porém em intervalos maiores de tempo de cultivo do fungo.

Pelos resultados de superfície de resposta, pode-se dizer que a presença de YE aumenta a excreção enzimática de celulasas por toda a faixa de tempo estudada. Isso porque permite que haja maior teor do nutriente disponível no sistema e assim crescimento e secreção de enzimas pelo microrganismo por todo o tempo de incubação avaliado.

Figura 30 – Superfície de resposta da atividade enzimática de celulases totais ( $AE_{FPase}$ ) de *Colletotrichum falcatum*. A)  $AE_{FPase}$  em função do tempo e umidade. B)  $AE_{FPase}$  em função do tempo e extrato de levedura (YE).

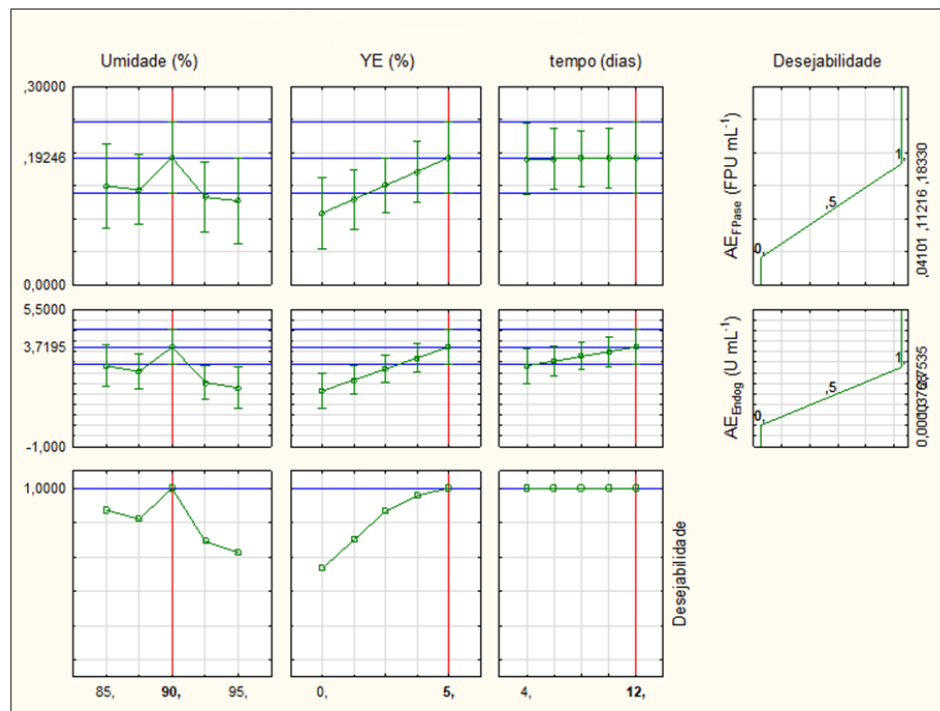


Fonte: Autor (2019).

No gráfico de desejabilidade (Figura 31), observa-se que em teores de 90% de umidade, aliados a suplementação com solução de YE a 5% e em toda a faixa de tempo de cultivo avaliada (12 dias), tem-se altos valores de resposta de atividade enzimática de FPase. O mesmo comportamento é verificado para a atividade enzimática de endoglucanase, com exceção da variável *tempo de cultivo* que em valores mais altos, melhora os resultados obtidos. Já para a atividade de lacase – não incluída na análise estatística – as condições ideais de fermentação são 95% de umidade, 5% de YE e 12 dias de cultivo.

Ponderando o intervalo analisado das variáveis e os efeitos por ele causados, encontra-se as condições desejáveis que maximizam a produção de endoglucanase e celulases totais por *C. falcatum* em bagaço de cana-de-açúcar, sendo elas: 90% de umidade, suplementação por YE a 5% e 12 dias de incubação do fungo no substrato. Entretanto, como supracitado teor de umidade de 95% implica em atividade de lacase, portanto, essa condição promoveria a produção das três enzimas: lacase, endoglucanase e FPase.

Figura 31 – Comportamento das variáveis umidade, extrato de levedura (YE) e tempo de cultivo para maximização das atividades enzimáticas de endoglucanase ( $AE_{\text{ENDOGL}}$ ) e celulases totais ( $AE_{\text{FPase}}$ ) secretadas por *Colletotrichum falcatum*.



Fonte: Autor (2019).

### 5.7.3 Síntese geral da atividade de celulases

No caso da produção enzimática de endoglucanase por *T. paradoxa*, somente a variável *umidade* foi estatisticamente significativa na atividade resultante. Entretanto, verificou-se a tendência de aumento de resposta em maiores teores de umidades e YE, combinados com menores tempos de fermentação. Já para o caso da atividade enzimática de celulases totais (FPase) pelo mesmo microrganismo, todas as variáveis analisadas (*umidade*, *tempo*, YE) foram significativas estatisticamente, havendo melhores atividades em menores tempos e teores de umidade, combinados com maiores teores de YE. As condições ótimas encontradas para produção de celulases por *T. paradoxa* foram de 90% de umidade, 5% de YE e 4 dias de cultivo.

Para a produção de endoglucanase por *C. falcatum*, umidade e YE foram significativas na resposta de atividade enzimática. A tendência de melhores atividades se deu em condições de altos teores de YE, baixos de umidade e em maiores tempos de cultivo. Quanto a atividade de celulases totais (FPase) do mesmo fungo, somente a variável YE foi significativa estatisticamente, sendo que maiores atividades foram obtidas em menores tempos de cultivo,

combinados com altos teores de YE e independente do teor de umidade aplicado. Como condições ótimas de cultivo estabeleceu-se 95% de umidade, 5% de YE e 12 dias de incubação, a fim de se ter no extrato enzimático atividades relevantes de endoglucanase, celulases totais e lacase.

## 5.8 ANÁLISE *IN SILICO*

A análise *in silico* teve como objetivo utilizar dados depositados em bancos de dados de sequências biológicas, a fim de confirmar o potencial genético dos fungos avaliados neste projeto em produzir as enzimas quantificadas e outras que possam contribuir para complementar o extrato de *T. reesei*, utilizado atualmente nos processos industriais.

As proteínas codificadas por cada uma das espécies causadoras de doenças em cana-de-açúcar *S. scitamineum*, *T. paradoxa* e *C. falcatum*, e do fungo *T. reesei*, foram submetidas à ferramenta de dbCAN (YIN et al., 2012), que realiza a anotação automática de domínios CAZy em um conjunto de dados. A Tabela 15 mostra o número de proteínas submetidas à anotação e dessas quantas possuem domínios CAZy identificados pelas três ferramentas de anotação disponíveis no dbCAN (DIAMOND, HOTPEP e HMMER). Para melhor delimitar o conjunto de proteínas de maior interesse, foram consideradas para as análises posteriores apenas as que possuem peptídeo sinal para secreção (localização extracelular).

Tabela 15 – Anotação de proteínas pelo banco de dados público dbCAN. \* Número total de proteínas anotadas automaticamente disponíveis no banco de dados JGI. \*\* Número de proteínas que apresentam domínios CAZy identificados pelas três ferramentas disponíveis no dbCAN. \*\*\* Número de proteínas entre aquelas com domínios CAZy que possuem peptídeo sinal para exportação (localização extracelular).

	Total de proteínas*	CAZy**	Extracelular***
<i>Thielaviopsis paradoxa</i>	7303	155	55
<i>Colletotrichum falcatum</i>	15619	349	158
<i>Sporisorium scitamineum</i>	6672	121	42
<i>Trichoderma reesei</i>	9129	245	102

Fonte: Autor (2019).

No caso dos fungos fitopatogênicos, *S. scitamineum*, *C. falcatum* e *T. paradoxa*, as proteínas identificadas são expressas com o intuito de degradar a parede celular da planta e colonizar o tecido do organismo hospedeiro (QUE et al., 2014). Presumivelmente, devido a isso se verifica em seus genomas um *pool* rico de genes codificando para enzimas com atividade em carboidratos (Tabela 15).

Kämper et al. (2006) relata que fungos com estilo de vida biotrófico tendem a ter menor quantidade de enzimas com atividade de degradação da parede celular, se comparados com fungos necrotróficos e hemibiotróficos. Tal fato corrobora os resultados encontrados, visto que *S. scitamineum* é considerado biotrófico, ou seja, coloniza a planta e completa seu ciclo de vida sexual sem promover a morte do hospedeiro, e apresentou menor potencial enzimático – tanto nas análises de atividade enzimática quanto nas análises *in silico* – e *C. falcatum*, por exemplo, é hemibiotrófico e apresentou o maior *pool* de enzimas com atividade em carboidratos (SHEN; GOODWIN; HSIANG, 2001; QUE et al., 2014) (Tabela 15).

As proteínas com domínios CAZy foram classificadas de acordo com suas respectivas classes em: glicosídeo hidrolases (GH), polissacarídeo liases (PL), carboidrato esterases (CE), glicosiltransferases (GT), módulos de ligações a carboidratos (CBM) e as enzimas redox de atividade auxiliar (AA) (Figura 32A). Ambas atuam em cadeias de carboidratos complexos, promovendo ou auxiliando de acordo com sua família, nas hidrólises sucessivas de celulose, hemicelulose, pectina e lignina (LEVASSEUR et al., 2013; YAN et al., 2017).

Os resultados obtidos nesta análise corroboram os apresentados por Martinez *et al.* (2008), que ao sequenciar 9.129 genes de *T. reesei*, encontraram 0 proteínas das famílias GH51, GH53, GH29 e GH26; 1 das famílias GH10, GH12, GH6, GH62, GH67, GH74; 2 das famílias GH43, GH5, GH54, GH7; 3 da família GH61; 4 das famílias GH11, GH95. Números esses, idênticos ou muito próximos aos encontrados pela anotação das proteínas ativas de *T. reesei* (Figura 32A), atestando a veracidade dos dados obtidos.

Para as classes AA, CBM, CE, GH e PL o fungo *C. falcatum* apresenta o maior número de proteínas representantes (Figura 32B), o que pode ser esperado por apresentar o maior número de proteínas codificadas em seu genoma, porém confirma seu potencial para produção das enzimas de interesse.

Verificou-se que a classe GH está presente em maior quantidade em todas linhagens fúngicas avaliadas. O maior número de enzimas desta classe em *T. reesei* foi detectada na família GH18, com 10 proteínas apresentando esse domínio descrito como quitinase. Essa espécie, além de ser utilizada na obtenção de enzimas para degradação da biomassa também é usada como micoparasita, devido a isso que *T. reesei* expressa enzimas capazes de degradar



parede celular fúngica, composta essencialmente por glucanos, glicoproteínas e quitina (TZELEPIS et al., 2015).

Para *C. falcatum* as famílias GH com maior número de representantes são GH3 e GH76, com 8 proteínas cada. O domínio GH3 é amplamente distribuído em bactérias, fungos e plantas e apresenta uma variedade de atividades, entre elas degradação da hemicelulose (LEE et al., 2002), enquanto GH76 está envolvido no *cross-linking* de proteínas ancoradas por GPI na parede celular fúngica (KITAGAKI et al., 2002).

Análises do genoma de *T. reesei* já demonstraram seu repertório limitado de enzimas lignocelulolíticas, especialmente aquelas envolvidas na quebra da pectina e lignina (Martinez et al., 2008). A análise do perfil de expressão de proteínas lignocelulolíticas em substratos naturais por *T. reesei* também demonstrou a necessidade de suplementação enzimática com proteínas auxiliares para se atingir eficiente degradação de biomassa lignocelulósica (ADAV; CHAO; SZE, 2012). Os dados obtidos nesse trabalho confirmam que pelo menos 36 domínios CAZy não estão presentes no conjunto de proteínas secretadas por *T. reesei*, sendo que dessas 50% (18) poderiam ser suplementadas por *C. falcatum* (Figura 32C).

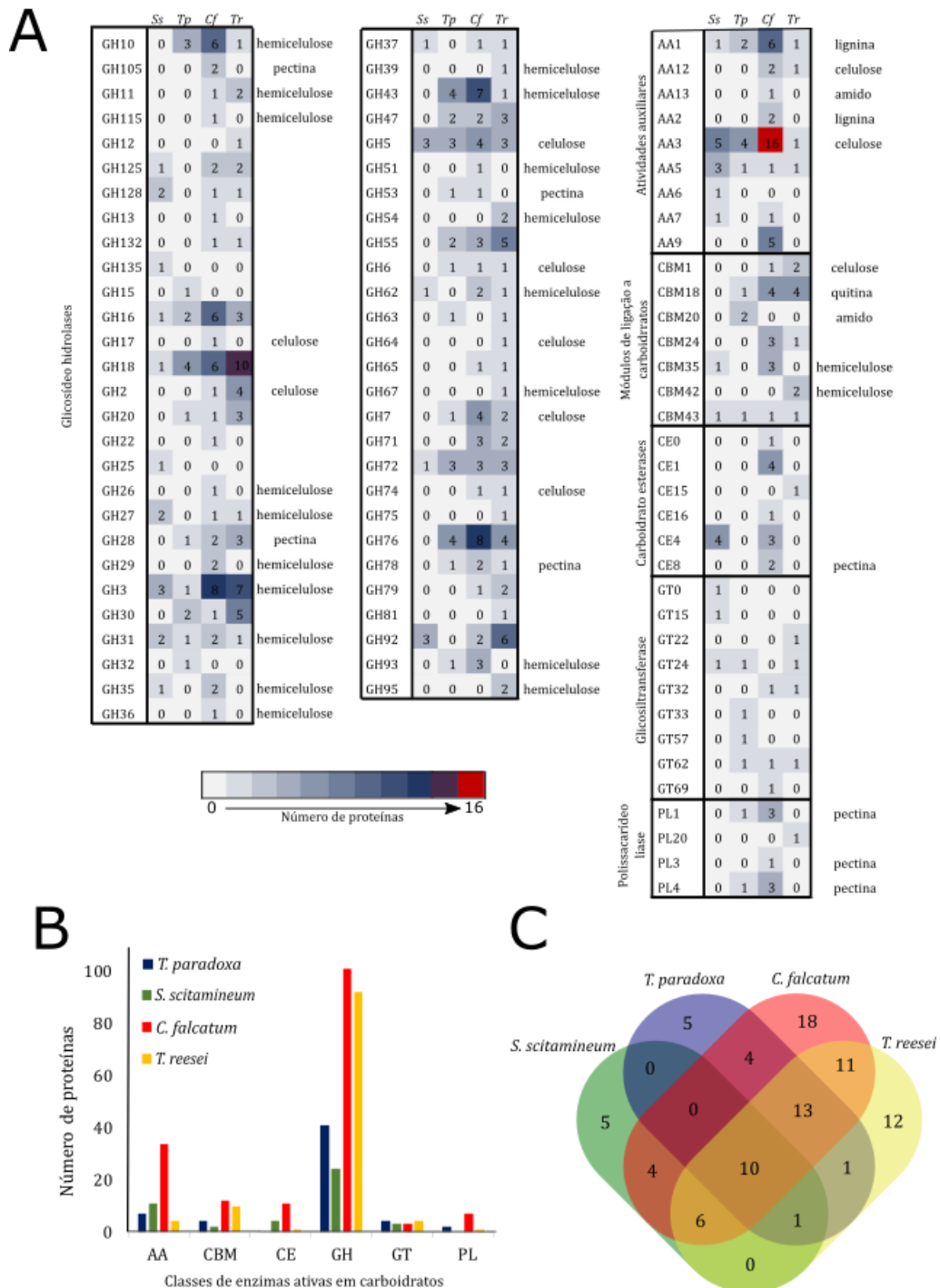
Nesse sentido, observou-se que para a classe PL, o genoma de *C. falcatum* possui maior número de enzimas, totalizando 7 (Figura 32A), sendo que todas elas são classificadas em famílias que auxiliam na degradação da pectina (LOMBARD et al., 2010), função em falta no extrato enzimático de *T. reesei*. Outras famílias, como CE8 e GH53, também envolvidas na quebra da pectina, estão presentes no genoma de *C. falcatum* e ausentes em *T. reesei* (MARKOVIC; JANECEK, 2004; BENOIT et al., 2012).

A função de degradação da lignina para facilitar o ataque às porções de celulose e hemicelulose pode ser suplementada por *C. falcatum* principalmente pela contribuição das famílias AA (Figura 32A), destacando AA1 e AA2, sendo que *T. reesei* possui somente uma proteína AA1 enquanto que *C. falcatum* possui 6 proteínas; e na família AA2 dentre os fungos analisados somente *C. falcatum* apresenta representantes.

Em fungos, a família AA1 está envolvida na degradação da estrutura da lignina por oxidases, como por exemplo a lacase (EC 1.10.3.2), cuja atividade foi detectada nos ensaios qualitativos e quantitativos do presente projeto (PARK; JEONG; KONG, 2018). Já a família AA2 codifica domínios para peroxidases, que promovem a oxidação dos anéis aromáticos da lignina, concomitante com a formação de peróxido de hidrogênio (HOFRICHTER, 2002; UREK; PAZARLIOGLU, 2007). Nessa mesma classe, *C. falcatum* se destaca pelas 16 enzimas AA3, que também estimulam a degradação da lignocelulose (LEVASSEUR et al., 2013).

Também na classe AA, *C. falcatum* apresenta exclusividade nas famílias AA9 e AA13. Ambas codificam domínios ativos de monoxigenases polissacarídicas líticas dependentes de cobre (LPMO), que realizam clivagens de cadeias de celulose por reações de hidroxilação desidrogenação (SONG et al., 2018). Esse resultado ratifica a atividade enzimática de celulases totais (FPase) do fungo, visto que a ação dessas enzimas potencializa o rendimento global de glicose (VILLARES et al., 2017; SONG et al., 2018).

Figura 32 – Análise *in silico* do potencial de produção de enzimas lignocelulolíticas por fungos causadores de doenças em cana-de-açúcar em comparação com o fungo *Trichoderma reesei*. A) Número de proteínas identificadas na plataforma dbCAN em cada uma das famílias de enzimas que apresentam atividade em carboidratos. *Ss*: *Sporisorium scitamineum*, *Tp*: *Thielaviopsis paradoxa*, *Cf*: *Colletotrichum falcatum*, *Tr*: *Trichoderma reesei* e os seus respectivos alvos na parede celular vegetal, quando já elucidado. B) Número total de proteínas de cada classe de enzimas com atividade em carboidratos, demonstrando o potencial do fungo *C. falcatum* em relação a *T. reesei*. C) Diagrama de Venn comparando as famílias ativas em carboidratos compartilhadas e específicas para cada um dos fungos analisados, indicando o potencial de complementação do complexo enzimático lignocelulolítico de *T. reesei* pelos fungos analisados.



Fonte: Autor (2019).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no estudo evidenciam que espécies com estilo de vida necrotrófico apresentam maior potencial de produção de enzimas lignocelulolíticas, mesmo durante seu crescimento sem interação com o hospedeiro.

A fermentação em estado sólido por *C. falcatum* e *T. paradoxa* utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, se mostrou como eficiente sistema para a produção das enzimas de interesse, exceto a lignina peroxidase que não foi detectada nas condições avaliadas. As atividades enzimáticas de celulasas foram satisfatórias em todas as condições de fermentação avaliadas, sendo que de acordo com a otimização das condições pelo planejamento fatorial completo, as variáveis estudadas (*umidade, teor de extrato de levedura e tempo de cultivo*) influenciam a resposta de atividade de celulasas totais e endoglucanase de modo específico para cada fitopatógeno. Os resultados da análise *in silico* comparativa comprovam que todas as espécies possuem um arsenal rico de enzimas lignocelulolíticas, com destaque para *C. falcatum*, que apresenta o maior número de proteínas com atividade em carboidratos, podendo ser utilizado para otimizar os coquetéis enzimáticos existentes aplicados no processo produtivo de etanol de segunda geração de coprodutos de cana-de-açúcar, especialmente contribuindo com as atividades de pectina e lignina.

Para trabalhos futuros, a próxima etapa consistiria na realização de um delineamento composto central rotacional (DCCR), justificado pelos dados das atividades analisadas assumirem, em sua maioria, a forma de curvatura. Espera-se a obtenção de superfícies de resposta de segunda ordem, que confirmarão os pontos ótimos para obtenção de máximas atividades de endoglucanase e celulasas totais produzidas por *T. paradoxa* ou *C. falcatum*. A análise *in silico* realizada delimitou bons genes candidatos para produção de proteínas heterólogas também em estudos futuros, a fim de se determinar a temperatura e o pH para atividade ótima e produzi-las em escala industrial a um preço competitivo. Além disso, comprovada a aplicação desses fungos para a produção de enzimas de interesse biotecnológico, pode-se investir na obtenção de linhagens não patogênicas por meio de ferramentas de biologia molecular.

## REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, S. K. et al. Incidence of the two date palm pathogens, *Thielaviopsis paradoxa* e *T. punctulata* in soil from date palm plantations in ELX, South-East Spain, **Journal of Plant Protection Research**, v.49, n.3, p.276279, 2009.
- ADAV, S. S.; CHAO, L. T.; SZE, S. K. Quantitative secretomic analysis of *Trichoderma reesei* strains reveals enzymatic composition for lignocellulosic biomass degradation. **Molecular & Cellular Proteomics**, [s.l.], v. 11, n. 7, p.1-15, 2012.
- ADITIYA, H. B. et al. Second generation bioethanol production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 66, p.631-653, 2016.
- AFONSO, P. F. do N. **Avaliação econômica de sistemas de plantio de cana-de-açúcar na região de Jaú-SP**. 2017. 76 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2017.
- AGROLINK. **Carvão: *Ustilago scitaminea***. 2015. Disponível em: <[https://www.agrolink.com.br/problemas/carvao\\_1729.html](https://www.agrolink.com.br/problemas/carvao_1729.html)>. Acesso em: 30 set. 2018.
- AGUIAR FILHO, J. M. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**. 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agricultura, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- ANDRADE, M. C. Inovações tecnológicas no setor sucroalcooleiro: determinantes, estágio vigente e perspectivas no contexto brasileiro (2005 - 2014). **Brazilian Journal of Management & Innovation**. Rubiataba, p. 89-106. 2017.
- APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa: Ufv - Universidade Federal de Viçosa, 2006. 430 p.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.4-13, 2010.
- BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; SILVA, V. L. Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (PI-CG/EM). **Química Nova**, Viçosa, v. 31, n. 8, p.2035-2041, nov. 2008.
- BARCELOS, C. A. et al. Enzymes and accessory proteins involved in the hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. In: SILVA, Roberto N. **Mycology: Current and Future Developments**. Rio de Janeiro: Bentham Science Publishers, 2015. cap. 2. p. 23-56.
- BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 11, p.1282-1289, 2010.
- BASTOS, V. D. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 25, p.5-38, 2007.
- BEGUM, F.; TALUKDER, M. I.; HOQUE, M. Z. Effect of pineapple disease on germination and yield contributing parameters of some promising varieties of sugarcane. **Sugar Tech**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.171-173, 2008.
- BENOIT, I. et al. Degradation of different pectins by fungi: correlations and contrasts between the pectinolytic enzyme sets identified in genomes and the growth on pectins of different origin. **BMC Genomics**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.321-332, 2012.

BERLIN, A. et al. Weak lignin-binding enzymes: a novel approach to improve activity of cellulases for hydrolysis of lignocellulosics. **Applied Biochemistry & Biotechnology**, p.121-124, 2005.

BETA, EIA. **Total petroleum and other liquids production**. 2017. Disponível em: <<https://www.eia.gov/beta/international/data/browser>>. Acesso em: 13 out. 2018.

BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

BRAGATTO, J. **Avaliação da composição química da parede celular de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que superexpressam o gene *ugdH* de soja, que codifica a enzima UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22)**. 2007. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

BRASIL. Decreto nº 19.717, de 20 de fevereiro de 1931. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/1930-1949/D19717.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1930-1949/D19717.htm)>. Acesso em: 12 out. 2018.

BUENO, C. J. Métodos de preservação para fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 3, n. 2, 2016.

BUENO, C. R. N. C. **Infecção por *Sporisorium scitamineum* em cana-de-açúcar: influência de variáveis ambientais e desenvolvimento de método para diagnose precoce**. 2010. 69 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BURKE, R.; CAIRNEY, J. Laccases and other polyphenol oxidases in ecto- and ericoid mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, [s.l.], v. 12, n. 3, p.105-116, 2002.

CAETANO, M. F.; ROCHA, M.; DUCLOS, J. Ocorrência de podridão do tronco das palmeiras em Portugal. **Actas de Horticultura**, v. 52, p.380-385, 2008.

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, [s.l.], v. 337, n. 14, p.1291-1296, jun. 2002.

CAPRIGLIONE, P. S. **A energia renovável na matriz energética brasileira**. 2007. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Finanças e Economia Empresarial, Escola de Economia de São Paulo, São Paulo, 2007.

CARDOSO, E. B. **Diversidade de *Colletotrichum* spp. em seringueira**. 2012. 52 f. Monografia - Curso de Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2012.

CARPITA, N. C. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, [s.l.], v. 47, n. 1, p.445-476, jun. 1996.

CASTRO, A. M. **Produção e propriedades de celulases de fungos filamentosos, obtidas a partir de celulignina de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. 2006. 212f. Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

CHANQUINIE, D. M. S. **Diversidade patogênica em isolados de *Thielaviopsis paradoxa* provenientes de diferentes áreas produtoras de cana-de-açúcar**. 2015. 56 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2015.

CHAPOLA, R. G. **Controle da podridão abacaxi da cana-de-açúcar por meio da pulverização de fungicidas em mudas só sulco de plantio**. 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Escola de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

CLAUS, H. Laccases: structure, reactions, distribution. **Micron**, [s.l.], v. 35, n. 1-2, p.93-96, 2004.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: Monitoramento agrícola – Cana-de-açúcar**. 2018. Disponível em: <[https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar/item/download/17026\\_e0504d08aca77ee13e86c2e7e7f43424](https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar/item/download/17026_e0504d08aca77ee13e86c2e7e7f43424)>. Acesso em: 02 out. 2018.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Perfil do setor do açúcar e do etanol no Brasil**. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento, 2017. 66 p. Disponível em: <[https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/perfil-do-setor-sucroalcooleiro/item/download/1344\\_a61a906fefe52041ff7eb66337feb8d7](https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/perfil-do-setor-sucroalcooleiro/item/download/1344_a61a906fefe52041ff7eb66337feb8d7)>. Acesso em: 29 set. 2018.

CORRÊA, C. B. **Parcerias estratégicas tecnológicas em projetos de etanol celulósico: oportunidades e desafios para as firmas nacionais**. 2014. 151 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Política Científica e Tecnológica, Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

CORRÊA, W. R. **Isolamento e Identificação de fungos filamentosos encontrados em peças anatômicas conservadas em solução de formol a 10%**. 2003. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2003

CORTEZ, L. A. B. et al. **Proálcool 40 anos: Universidades e empresas: 40 anos de ciência e tecnologia para o etanol brasileiro**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2016. 225 p.

COUTO, S. R. et al. Investigation of several bioreactor configurations for laccase production by *Trametes versicolor* operating in solid-state conditions. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.21-26, 2003.

COWLING, E.B.; KIRK, T.K. Properties of cellulose and lignocellulose materials and substrats for enzymatic conversion processes. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**. v.6, p. 95-123, 1976.

D'ALMEIDA, M. L. O. **Celulose e papel tecnologia de fabricação da pasta celulósica**. São Paulo: Senai Ipt, 1981.

DAMASCENO, A. A. **Purificação e caracterização da lacase do fungo *Trametes cubensis* (Mont.) Sacc. 1891**. 2016. 68 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.

DAMASCENO, C. M. B. et al. **A importância da lignina para a produção de etanol de Segunda geração**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 35 p.

DAVIDSON, R. W.; CAMPBELL, W. A.; BLAISDELL, D. J. Differentiation of wood-decaying fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 57, n. 9, p.683-695, 1938.

DELICHEVA, G.; DOBREV, G.; PISHTIYSKI, I. Performance of *Aspergillus niger* B 03  $\beta$ -xylosidase immobilized on polyamide membrane support. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 54, n. 3-4, p.109-115, 2008.

DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biofuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, [s.l.], v. 33, n. 1, p.1-18, 2007.

ENGUITA, F. J. et al. Crystal structure of a bacterial endospore coat component. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 278, n. 21, p.19416-19425, 2003.

EPE - Empresa de Pesquisa Energética. Ministério de Minas e Energia. **Balanco energético nacional 2018: ano base 2017**. 2018. 294 p. Disponível em:< <http://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados>

abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-303/topico-419/BEN2018\_\_Int.pdf>. Acesso em: 13 jun. 2018.

FARIA, R. de A. **Estudo da produção de enzimas lignolíticas por *Ceriporiopsis subvermispora***. 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

FLORENCIO, C. **Microrganismos produtores de celulases: seleção de isolados de *Trichoderma spp.*** 2011. 86 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

GEHLING, R. **Alternativas à matriz energética brasileira: o caso do biodiesel**. 2007. 81 f. Monografia (Especialização) - Curso de Ciências Econômicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, [s.l.], v. 59, n. 2, p.257-268, 1987.

GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E. P. da S. Cellulases, xylanases,  $\beta$ -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 51, n. 1-2, p.72-78, 2010.

GRABBER, J. H. et al. Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin–cell wall matrix interactions. **Comptes Rendus Biologies**, [s.l.], v. 327, n. 5, p.455-465, 2004.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 100, n. 1, p.10-18, 2009.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l.], v. 30, n. 4, p.454-466, 2002.

HOGSETT, D. et al. **Converting cellulose to biofuels**. Chemical Engineering Progress Magazine, 2010.

HOLM, K. A.; NIELSEN, M. D.; ERIKSEN, J. Automated colorimetric determination of recombinant fungal laccase activity in fermentation samples using syringaldazine as chromogenic substrate. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 20, n. 6, p.199-203, 1998.

HOU, H, et al. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 39, n. 11, p.1415-1419, 2004.

INFORSATO, F. J.; PORTO, A. L. M. Atividade enzimática de celulases pelo método DNS de fungos isolados de sementes em germinação. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 5, n. 4, p.444-465, 2016.

JAMES, G. **Sugarcane**: World agriculture series. 2. ed. Oxford: Blackwell Science Ltda, 2004. 224 p.

JOSE, R. C. et al. Confined enzymatic activity of *S. scitamineum* and *U. esculenta* at the smut gall during infection. **Biological Systems: Open Access**, [s.l.], v. 06, n. 02, p.1-5, 2017.

KÄMPER, J. et al. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. **Nature**, [s.l.], v. 444, n. 7115, p.97-101, 2006.

KIM, S.; DALE, B. E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass and Bioenergy**, [s.l.], v. 26, n. 4, p.361-375, 2004.



- KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, 1997. 706 p.
- KIMIT, M. C. P. **Caracterização de genes associados ao tipo de reação sexual em *Sporisorium scitamineum*, agente causador do carvão da cana-de-açúcar**. 2014. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.
- KING, B. C. et al. Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. **Biotechnology for Biofuels**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.4-28, 2011.
- KITAGAKI, H. et al. Two homologous genes, DCW1 (YKL046c) and DFG5, are essential for cell growth and encode glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins required for cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 46, n. 4, p.1011-1022, 2002.
- KUMAR, N. et al. Molecular and pathological characterization of *Colletotrichum falcatum* infecting subtropical indian sugarcane. **Journal of Phytopathology**, [s.l.], v. 159, n. 4, p.260-267, 2010.
- LAWOKO, M.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Structural differences between the lignin-carbohydrate complexes present in wood and in chemical pulps. **Biomacromolecules**, [s.l.], v. 6, n. 6, p.3467-3473, 2005.
- LEE, R. C. et al. Bifunctional family 3 glycoside hydrolases from barley with  $\alpha$ -l-arabinofuranosidase and  $\beta$ -d-xylosidase activity. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 278, n. 7, p.5377-5387, 2002.
- LEVASSEUR, A. et al. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. **Biotechnology for Biofuels**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.41-55, 2013.
- LIMA, A. M. de. **Estudos recentes e perspectivas da viabilidade técnico-econômica da produção de etanol lignocelulósico**. 2011.
- LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, [s.l.], v. 38, n. 4, p.449-467, 2012.
- LOMBARD, V. et al. A hierarchical classification of polysaccharide lyases for glycogenomics. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 432, n. 3, p.437-444, 2010.
- LORENZI, B. R. **Etanol de Segunda Geração no Brasil: política e translações**. 2018. 186 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência Política, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2018.
- LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s.l.], v. 66, n. 3, p.506-577, 2002.
- MA, X. et al. Endophytic *Colletotrichum* species from *Dendrobium* spp. in China and Northern Thailand. **Myckeys**, [s.l.], v. 43, p.23-57, 2018.
- MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R.; BONONI, V. L. R. Ligninolytic enzymes production and remazol brilliant blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p.246-252, 2005.
- MANAMGODA, D. S. et al. Endophytic *Colletotrichum* from tropical grasses with a new species *C. endophytica*. **Fungal Diversity**, [s.l.], v. 61, n. 1, p.107-115, 2013.
- MANOLE, A. et al. Laccase activity determination. **Biomaterials in Biophysics, Medical Physics and Ecology**, p.17-24, 2008.

- MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar**. 2009. 142 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- MARCHESSAULT, R. H.; HOWSMON, J. A. Experimental evaluation of the lateral-order distribution in cellulose. **Textile Research Journal**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.30-41, 1957.
- MARKOVIC, O.; JANECEK, S. Pectin methylesterases: sequence-structural features and phylogenetic relationships. **Carbohydrate Research**, [s.l.], v. 339, n. 13, p.2281-2295, 2004.
- MARQUES, N. P. **Produção de celulases por fungos endofíticos e aplicação das enzimas na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar**. 2017. 153 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2017.
- MARTINEZ, D. et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). **Nature Biotechnology**, [s.l.], v. 26, n. 5, p.553-560, 2008.
- MATULOVA, M. et al. Degradation of wheat straw by *Fibrobacter succinogenes* S85: a liquid- and solid-state nuclear magnetic resonance study. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 71, n. 3, p.1247-1253, 2005.
- MBENOUN, M; BEER, Z. W. de; WINGFIELD, M. J. Reconsidering species boundaries in the *Ceratocystis paradoxa* complex, including a new species from oil palm and cacao in Cameroon. **The Mycological Society of America**, Lawrence, p.757-784, 2014.
- MEHNAZ, S. Microbes - friends and foes of sugarcane. **Journal of Basic Microbiology**, [s.l.], v. 53, n. 12, p.954-971, 2013.
- MENEZES, C. R. de; BARRETO, A. R. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos: caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimático fúngico. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19, n. 2, p.1365-1391, 2015.
- MENEZES, C.; SILVA, I.; DURRANT, L. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.68-78, 2009.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 31, n. 3, p.426-428, 1959.
- MOHAN, R. et al. Alternative *in vitro* propagation: use of sugarcane bagasse as a low cost support material during rooting stage of strawberry Cv. *Dover*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p.37-42, 2005.
- MOOSAWI-JORF, S. A.; IZADI, M. B. In vitro detection of yeast-like and mycelial colonies of *Ustilago scitaminea* in tissue-cultured plantlets of sugarcane using polymerase chain reaction, **Journal of Applied Sciences**, v.7, n.23, p.3768-3773, 2007.
- MORAIS, S. A. L. de; NASCIMENTO, E. A. do; MELO, D. C. de. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* parte I – Estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **Sociedade de Investigações Florestais**, Viçosa, v. 29, n. 3, p.461-470, 2005.
- MOSIER, N. et al. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 96, n. 18, p.1986-1993, 2005.
- NASCIMENTO, R. A. de A. **Caracterização da lignina de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor: identificação dos compostos de degradação e reações envolvidas**. 2007. 133 f.

- Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia Industrial, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.
- NECHET, K. de L.; RAMOS, N. P.; VIEIRA, B. de A. H. **Identificação de doenças fúngicas foliares emergentes em cana-de-açúcar**: EMBRAPA: Comunicado técnico n. 53. 2016.
- NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, [s.l.], v. 37, n. 1, p.52-68, 2011.
- OGATA, B. H. **Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial uso em biorrefinarias**. 2013. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p.1549-1558, 2010.
- OLIVEIRA, S. L. do R. de. **Otimização da produção de celulases de *Melanoporia* sp. por fermentação submersa**. 2014. 112 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.
- PAIS, M. S.; BARROSO, J. M. A célula vegetal. In: AZEVEDO, C. (Comp.). **Biologia Celular e Molecular**. Lisboa: Lidel, 2010. p. 524-529.
- PALONEN, H. **Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose**. 2004. 84 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia, Helsinki University of Technology, Espoo, 2004.
- PARK, Y.; JEONG, Y.; KONG, W. Genome sequencing and carbohydrate-active enzyme (CAZyme) repertoire of the white rot fungus *Flammulina elastica*. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 19, n. 8, p.2379-2398, 2018.
- PAULIN-MAHADY, A. E.; HARRINGTON, T. C.; MCNEW, D. Phylogenetic and taxonomic evaluation of *Chalara*, *Chalaropsis*, and *Thielaviopsis anamorphs* associated with *Ceratocystis*. **The Mycological Society of America**, Lawrence, v. 94, n. 1, p.62-72, 2002.
- PAULY, M.; KEEGSTRA, K. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 54, n. 4, p.559-568, 2008.
- PEREIRA JUNIOR, N.; COUTO, M. A. P. G.; ANNA, L. M. M. S. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery**. Rio de Janeiro: Brazilian National Library, 2008. 47 p.
- PÉREZ, J. et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.53-63, 2002.
- PINHO, D. B.; DUTRA, D. C.; PEREIRA, O. L. Notes on *Ceratocystis paradoxa* causing internal post-harvest rot disease on immature coconut in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 2, p.152-157, 2013.
- PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. 2007. 142 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- PLANTWISE. 2018. Disponível em: <<https://www.plantwise.org/KnowledgeBank/PWMap.aspx>>. Acesso em: 30 set. 2018.
- POLIZZI, G. et al. First report of *Thielaviopsis* trunk rot of date palm in Italy. **Plant Disease**, v. 90, p.972, 2006.

PRIHASTUTI, H. et al. Neotypification of *Colletotrichum falcatum*, the causative agent of red-rot disease in sugarcane. **Sydowia**, v. 62, p.283-293, 2010.

QUE, Y. et al. Genome sequencing of *Sporisorium scitamineum* provides insights into the pathogenic mechanisms of sugarcane smut. **BMC Genomics**, v. 996, n. 15, 2014.

RAID, R. N.; ROTT, P. **Sugarcane pineapple disease or sugarcane pineapple set rot**. University of Florida, Florida, 2015.

RASERA, K. Desenvolvimento de membranas com lacases por imobilização do extrato enzimático de *Pleurotus sajor-caju*. 2006. 130 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2006.

RASOOL, U.; HEMALATHA, S. A review on bioenergy and biofuels: sources and their production. **Brazilian Journal of Biological Sciences**, [s.l.], v. 3, n. 5, p.3-21, 2016.

RASTOGI, M.; SHRIVASTAVA, S. Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 80, p.330-340, 2017.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biology of plants**. New York: Worth Publ., 2001. 791 f.

REIS, G. V. dos. **Diversidade genética de isolados do fungo *Sporisorium scitamineum* analisada através de *fingerprinting* da região telomérica**. 2012. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

RODRIGUEZ, O. M. D. **Otimização da produção de celulases a partir de substratos alternativos**. 2011. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

ROSGAARD, L.; MEYER, A. S. **Enzymatic hydrolysis of pretreated barley and wheat straw**. 2007. 124 f. Monografia (Especialização) - Curso de Chemical Engineering, Technical University of Denmark, Lyngby, 2007.

ROSSETTO, R.; SANTIAGO, A. D. **Doenças da cana-de-açúcar**. 2016. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p.205-211, 2003.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 30, n. 5, p.279-291, 2003.

SALES, M. R. et al. Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 11, p.1290-1296, 2010.

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

SANTOS, R. A. C. dos. **Carvão (*Sporisorium scitamineum*) e podridão-abacaxi (*Ceratocystis paradoxa*) em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*): uma revisão**. 2013. 95 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2013.

- SARKAR, P.; BOSNEAGA, E.; AUER, M. Plant cell walls throughout evolution: towards a molecular understanding of their design principles. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 60, n. 13, p.3615-3635, 2009.
- SATHYABHAMA, M. et al. Identification of differentially expressed genes in sugarcane during pathogenesis of *Colletotrichum falcatum* by suppression subtractive hybridization (SSH). **Sugar Tech**, [s.l.], v. 18, n. 2, p.176-183, 2015.
- SCHUTZ, F.; MASSUQUETTI, A.; ALVES, T. W. Demanda e oferta energética: uma perspectiva mundial e nacional para o etanol. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, [s.l.], v. 16, n. 16, p.3167-3186, 2013.
- SEIBOTH, B.; IVANOVA, C.; SEIDL-SEIBOTH, V. *Trichoderma reesei*: a fungal enzyme producer for cellulosic biofuels. **Biofuel Production-recent Developments and Prospects**, [s.l.], p.309-340, 2011.
- SHAILBALA; KUMAR, A. Effect of thiophanate methyl on red rot disease (*Colletotrichum falcatum*) and yield attributes of sugarcane. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**. Bihar, p. 163-167. 2017.
- SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p.219-228, 2003.
- SHARMA, R.; TAMTA, S. A. Review on red rot: the “cancer” of sugarcane. **Plant Pathology & Microbiology**, Uttarakhand, p.1-8, 2015.
- SHEN, S.; GOODWIN, P.; HSIANG, T. Hemibiotrophic infection and identity of the fungus, *Colletotrichum destructivum*, causing anthracnose of tobacco. **Mycological Research**, v. 105, n. 11, p.1340-1347, 2001.
- SILVA, B. N. S. da. **Seleção de fungos apodrecedores de madeira e caracterização de basidiomicetos associados à podridão de árvores vivas**. 2014. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- SILVA, C. M. M. de S.; MELO, I. S. de; OLIVEIRA, P. R. **Produção de enzimas ligninolíticas por fungos isolados de solos sob cultivo de arroz irrigado**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento - EMBRAPA, Jaguariúna, 18 f., 2004.
- SILVA, E. A. da. **Atividade enzimática da lacase e crescimento micelial de três fungos amazônicos degradadores de madeira**. 2006. 138 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia e Recursos Naturais, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2006.
- SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 2010. 123 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- SIQUEIRA, G. A. **Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar deslignificado e distribuição topoquímica da lignina e dos ácidos hidroxigâmicos na parede celular**. 2011. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.
- SOARES, G. A. **O avanço das tecnologias de segunda geração e seus impactos na indústria do etanol**. 2016. 178 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Economia, Instituto de Economia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

- SOCCOL, C. R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p.4820-4825, 2010.
- SONG, B. et al. Real-time imaging reveals that lytic polysaccharide monoxygenase promotes cellulase activity by increasing cellulose accessibility. **Biotechnology for Biofuels**, [s.l.], v. 11, n. 1, 2018.
- SOUZA, F. R. B. de. **Síntese e caracterização de hemiceluloses catiônicas a partir do reaproveitamento da palha de milho**. 2012. 53 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.
- SOUZA, Z. J. de; AZEVEDO, P. F. de. Geração de energia elétrica excedente no setor sucroalcooleiro: um estudo a partir das usinas paulistas. **RER**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 2, p.179-199, 2006.
- SOYTONG, K.; PONGNAK, W.; KASIOLARN, H. Biological control of *Thielaviopsis* bud rot of *Hyophorbe lagenicaulis* in the field, **Journal of Agricultural Technology**, India, p.235-245, 2005.
- SUBRAMANIYAN, S; PREMA, P. Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], v. 183, n. 1, p.1-7, 2000.
- SUN, H. et al. Cellulase production by *Trichoderma* sp. on apple pomace under solid state fermentation. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 2, p.163-166, 2010.
- SZKLARZ, G. D. et al. Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycological Society of America**, New York, v. 81, n. 2, p.234-240, 1989.
- TALUKDER, M. I.; BEGUM, F.; AZAD, M. M. K. Management of pineapple disease of sugarcane through biological means. **Journal of Agriculture & Rural Development**. Pabna, p. 79-83. 2007.
- TAMANHO, J. M. S. dos S. et al. Análise da variabilidade morfológica e genética do fungo *Thielaviopsis paradoxa*. **IV Seminário de Iniciação Científica e Pós-graduação da Embrapa Tabuleiros Costeiros**, Aracaju, v. 1, p.262-271, 2014.
- TANIGUTI, L. M. et al. Complete genome sequence of *Sporisorium scitamineum* and biotrophic interaction transcriptome with sugarcane. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 6, 2015.
- TEODORO, T. S. et al. The influence of Tween 80 on laccase production by *Pleurotus sajor-caju* and the efficiency of crude enzyme broth in the removal of bisphenol-A. **Instituto Biológico**, v. 85, p.1-10, 2018.
- TOZZE JÚNIOR, H. J.; MELLO, M. B. A.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p.77-79, 2006.
- TROMBETA, N. de C.; CAIXETA FILHO, J. V. Potencial e disponibilidade de biomassa de cana-de-açúcar na região centro-sul do Brasil: indicadores agroindustriais. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, [s.l.], v. 55, n. 3, p.479-496, 2017.
- TUOMELA, M. et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 72, n. 2, p.169-183, 2000.
- TZELEPIS, G. et al. Identifying glycoside hydrolase family 18 genes in the mycoparasitic fungal species *Clonostachys rosea*. **Microbiology**, [s.l.], v. 161, n. 7, p.1407-1419, 2015.
- UREK, R. O.; PAZARLIOGLU, N. K. Enhanced production of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. **Brazilian Archives of Biology And Technology**, v. 50, n. 6, p.913-920, 2007.

- VALADARES, F. de L. **Produção e uso de enzimas do fungo *Pleurotus ostreatus* na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por processo quimiotermomecânico.** 2013. 122 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.
- VILELA, E. D. de S. **Análise da produção de celulasas e beta glicosidase produzidas por *Streptomyces sp.*** 2013. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.
- VILLARES, A. et al. Lytic polysaccharide monooxygenases disrupt the cellulose fibers structure. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 7, n. 1, 2017.
- VINZANT, T. B. et al. Fingerprinting *Trichoderma reesei* hydrolases in a commercial cellulase preparation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91-93, p.99-107, 2001.
- VISWANATHAN, R. et al. Draft genome sequence of *Colletotrichum falcatum* - a prelude on screening of red rot pathogen in sugarcane. **Journal of Genomics**, [s.l.], v. 4, p.1-3, 2016.
- VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry.** 1995. New York, J. Wiley & Sons.
- VOGEL, J. Unique aspects of the grass cell wall. **Current Opinion in Plant Biology**, [s.l.], v. 11, n. 3, p.301-307, 2008.
- WANG, P. et al. Effect of culture conditions on the production of ligninolytic enzymes by white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC 20696) and separation of its lignin peroxidase. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 24, n. 10, p.2205-2212, 2008.
- YAN, J. Y. et al. Comparative genome and transcriptome analyses reveal adaptations to opportunistic infections in woody plant degrading pathogens of *Botryosphaeriaceae*. **DNA Research**, v. 25, n. 1, p.87-102, 2017.
- YIN, Y. et al. dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 40, n. 1, p.445-451, 2012.
- ZANCAN, L. R.; BARRETO, A. R.; MENEZES, C. R. de. Estudo da produção enzimática fúngica por basidiomicetos cultivados em resíduos lignocelulósicos. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19, n. 3, p.850-860, 2015.
- ZENG, M. et al. Microscopic examination of changes of plant cell structure in corn stover due to hot water pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, [s.l.], v. 97, n.2, p.265-278, 2007.
- ZHANG, Y.P.I; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, [s.l.], v. 88, n.7, p.797-824, 2004.
- ZHAO, X.; CHENG, K.; LIU, D. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 82, p.815-827, 2009.