

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 01/03/2017.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ENGENHARIA

CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA

WANDERLÉIA RODRIGUES DOS SANTOS

**ISOLAMENTO DE FUNGOS DO BIOMA PANTANAL E ESTUDOS DA
PRODUÇÃO DE XILANASE E CELULASE**

Ilha Solteira – SP

2016

WANDERLÉIA RODRIGUES DOS SANTOS

**ISOLAMENTO DE FUNGOS DO BIOMA PANTANAL E ESTUDOS DA
PRODUÇÃO DE XILANASE E CELULASE**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia
do Campus de Ilha Solteira - UNESP, como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutora em Agronomia. Especialidade:
Sistemas de Produção

Prof^a. Dr^a. Heloiza Ferreira Alves do Prado
Orientadora

Ilha Solteira – SP
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

S237i Santos, Wanderléia Rodrigues.
Isolamento de fungos do bioma pantanal e estudos da produção de xilanase e celulase / Wanderléia Rodrigues Santos. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2016
133 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Sistemas de Produção, 2016

Orientador: Heloiza Ferreira Alves do Prado
Inclui bibliografia

1. Xilanase. 2. Endoglucanase. 3. Fermentação sólida. 4. Resíduos lignocelulósicos.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Isolamento de fungos do Bioma Pantanal e estudo da produção de xilanase e celulase

AUTORA: WANDERLÉIA RODRIGUES DOS SANTOS

ORIENTADORA: HELOIZA FERREIRA ALVES DO PRADO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA, especialidade: SISTEMAS DE PRODUÇÃO pela Comissão Examinadora:



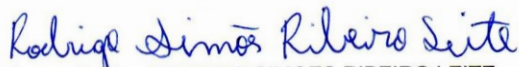
Profa. Dra. HELOIZA FERREIRA ALVES DO PRADO
Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira



Profa. Dra. ANA MARIA RODRIGUES CASSIOLATO
Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira



Profa. Dra. ROSEMEIRE DA SILVA FILARDI
Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira



Professor Doutor RODRIGO SIMOES RIBEIRO LEITE
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais / UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS



Profa. Dra. DANIELA ALONSO BOCCHINI MARTINS
Departamento de Bioquímica / Instituto de Química de Araraquara

Ilha Solteira, 29 de agosto de 2016

Dedico

Aos meus queridos avós,
Otacílio Pereira dos Santos (*in memoriam*) e Marisete Rodrigues dos Santos,
pelo amor, carinho, compreensão, pelo imensurável apoio e confiança depositados
em todos esses anos de estudos e dedicação para alcançar os meus objetivos.

Ofereço

A minha mãezinha linda Antônia de Fátima R. dos S. Dias,
A minha Tata querida Léia Carla R. dos S. Larson,
E aos meus ídolos Adão Bento Gregório e
Maria José Rodrigues dos Santos Gregório
Que Me deram força para concretizar este trabalho,
Amo vocês.

“Sou filha orgulhosa do avô mais inteligente que existe...

Meu avô foi roceiro, plantava café, feijão, arroz, mandioca, batata, verduras e muito mais. As vezes achava que ele era Agrônomo ou algo parecido.

Depois foi açougueiro, fazia linguiça, charque e um saboroso salame. Depois charreteiro e por último guarda noturno.

Veio de Minas e conheceu aqui no estado, a mulher mais inteligente e sensata que conheço.

Eles, depois de criarem 6 filhos, ainda criou eu e minha irmã, e ajudou mais 3 netos.

Eles me deram além de casa e comida, a educação que a escola não é passível a dar a qualquer ser humano.

O momento que mais me marcou, foi quando me levava, logo tão cedo, de bicicleta no ponto de ônibus, para onde eu seguia para escola agrícola de turno integral.

Mesmo ele fazendo todo ano minha matrícula, apenas quando entrei na faculdade, que descobri que ele não sabia ler e nem escrever....

Mas isso não cabia em minha mente... Como? Ele fazia tudo e sabia muito mais que eu...

Até eu perceber, que o que ele havia me ensinado, era muito mais que eu havia aprendido na frente de quadro negro da escola.

Que nem a UEMS, UNESP ou USP ou qualquer outra melhor universidade do mundo poderia me ensinar.

Por causa dele, hoje eu sou mestre em Agronomia, e quase uma doutora na vida!”

Obrigada Vozão!

Otacílio Pereira dos Santos

In memorian

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças Deus não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

Agradecimentos

A Deus, todo poderoso, pela saúde, graça, força, coragem, minhas alegrias e a certeza da vitória.

A professora Dr^a. Heloiza Ferreira Alves do Prado, pela maravilhosa orientação e dedicação, assim como, pela paciência, incentivo, compreensão e confiança que teve comigo durante todo o desenvolvimento do trabalho.

A todos que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade da realização deste curso de doutorado.

Aos professores da Graduação e Pós-Graduação em Agronomia, da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, pelos ensinamentos durante minha formação acadêmica.

A pesquisadora Dr^a. Ana Maria Rodrigues Cassiolato, agradeço pela co-orientação na fase inicial deste trabalho.

A pesquisadora Dr^a. Glacia Amorim Faria, pela realização das estatísticas que muito contribuiu neste trabalho.

Aos professores componentes da banca examinadora desse trabalho, pelas sugestões e por atenderem prontamente ao nosso convite à banca.

A todos do Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Semente e Sócio-Economia desta unidade, agradeço pelo apoio.

A Agropecuária Santana do Deserto, pela oportunidade e apoio nas coletas de solo.

Aos funcionários “Zé Hernandez”, Mirian e Alvino, pelo apoio técnico e prático durante a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Sirlene Senna, Aline Reis, Lumena Besson, Cíntia, Érica, Fábio, Islaine pela amizade e contribuição durante o doutorado.

Aos colegas da pós-graduação Simone Hiraki, Barbara, Cecília, Priscila, Tiago, pela amizade durante o doutorado.

Ao meu querido Tiago Pasquetti pelo carinho, amor, compreensão, pela sua companhia nos momentos mais difíceis e de grandes alegrias.

As minhas amigas, Valquíria, Selma, Gabriela, que por mais que nos afastamos, sabemos que somos as mesmas.

Aos amigos “Chiquinho”, Arthur, Sr. Maurício (*in memoriam*), pela atenção mesmo quando eu estava ausente.

Aos amigos que encontrei em Ilha Solteira, a Sr^a. Maria de Lourdes, Eloiza, Luciana, Luciano e toda sua família que me acolheu.

Aos meus anjos Gaby, Izabela, Anna, Phablo, Maria Eduarda, João Lúcio, Yanni, Eduardo, Maria Valentina, Ruan, Luan, Jheniffer e Victor.

Aos meus irmãos Léia Carla, Vivian Mayara, Aline Muriel, Adalto Junior e Gabriela, pelas palavras de incentivo.

Aos cunhados Luciano Larson, Erik Pronti, e James e Aline Perinelli por estarem sempre na torcida.

A minha família que é o pilar de minha vida e sem o qual a mesma não teria sentido.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Ilha Solteira – SP, pela oportunidade na realização do curso de doutorado.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente me ajudaram e me apoiaram, tornando possível a realização deste trabalho.

MEU SINCERO AGRADECIMENTO!!!

ISOLAMENTO DE FUNGOS DO BIOMA PANTANAL E ESTUDOS DA PRODUÇÃO DE XILANASE E CELULASE

RESUMO

Diante do recente interesse em valorizar os fungos degradadores da biomassa lignocelulósica oriunda das atividades agrícolas, agroindustriais e de florestas plantadas, torna-se necessário a prospecção de novos micro-organismos e a partir destes estudar seu potencial, bem como fatores que afetam o seu desenvolvimento, a produção de enzimas, e o rendimento como um todo. Após uma breve introdução e revisão de literatura, tem-se o **Capítulo I** expondo parte do projeto, onde o objetivo de estudo foi isolar e selecionar fungos da região do Pantanal Sul-mato-grossense, e testar sua eficiência na produção das enzimas xilanase, carboximetilcelulase (CMCase) e avicelase tendo 1% de palha de milho e papelão como substratos indutores no meio líquido de isolamento testados na temperatura de 35 e 45 °C. Neste processo, um total de 111 fungos foram obtidos, onde 80,7% dos isolados em meio contendo palha de milho, cresceram a temperatura de 35 °C e os isolados induzidos meio contendo papelão, 63,0% se manifestaram a 45 °C. O isolado WPPM 922 obteve as maiores atividades enzimáticas com 614,5 U g⁻¹, e 107,3 U g⁻¹ e 5,37 U g⁻¹ para atividade de xilanase, CMCase e avicelase respectivamente, fermentado em farelo de trigo em 96 h a 35 °C. Oito isolados e o *Trichoderma asperelloides* F22, foram selecionados para avaliação do seu potencial na produção enzimática utilizando 6 tipos de resíduos agrícolas e agroindustriais. A casca de arroz foi o substrato que mais induziu as enzimas xilanase e CMCase pelos isolados testados. A maior produção de xilanase foi obtida pelo isolado WPPM 421A com 931,95 U g⁻¹ em casca de arroz e por *T. asperelloides* F22 cerca de 876,48 U g⁻¹ tendo o farelo de trigo como substrato. O isolado WPPM 622 apresentou a maior atividade da enzima CMCase, com atividade de 155,73 U g⁻¹ na mistura bagaço de cana-de-açúcar, seguido pelo isolado WPPM 151 e o fungo *T. asperelloides* F22, com atividade de 60,52 U g⁻¹ e 57,29 U g⁻¹ respectivamente, fermentados em casca de arroz. No **Capítulo II**, descreve-se a importância das condições bioquímicas das enzimas xilanase e CMCase produzidas pelos isolados WPPM 421A e WPPM 622, e por *T. asperelloides* F22 quanto a temperatura e pH ótimos e estabilidade e a meia vida. O *Trichoderma asperelloides* F22 obteve seu pico de produção de xilanase em 72 h (606,23 U g⁻¹), e o isolado WPPM 421A que obteve pico de produção de xilanase e CMCase em 96 h (547,27 U g⁻¹ e 55,53 U g⁻¹, respectivamente). O pH ótimo e

estabilidade foi diferente para os isolados avaliados, no entanto, o isolado WPPM 421A, cultivado em farelo de trigo, demonstrou pH ótimo de 5,5, mas manteve sua atividade acima de 50% na faixa de pH 5-11. Quanto a termoestabilidade, o isolado WPPM 421A quando cultivado em sabugo de milho produziu xilanase mais termoestável, mantendo 67,4% da atividade a 90 °C. Essa xilanase conservou 60% de sua atividade após 12h de incubação a 60 °C, e manteve 50% de sua atividade após incubada 1h a 70 °C. As propriedades estudadas colocam estas enzimas como promissoras para aplicações biotecnológicas.

Palavras chaves: Xilanase. Endoglucanase. Fermentação sólida. Resíduos lignocelulósicos.

ISOLATION OF FUNGI OF WETLAND BIOMA AND PRODUCTION STUDIES XYLANASE AND CELLULASE

ABSTRACT

Before the recent interest in valuing the degrading fungi lignocellulosic biomass derived from agricultural, agroindustrial and planted forests, it is necessary to prospect for new microorganisms and from these study their potential as well as factors affecting their development the production of enzymes, and performance as a whole. After a brief introduction and review of the literature, there is Chapter I exposing part of the project, where the objective of the study was to isolate and select fungi from the Sul-mato-grossese Pantanal region, and test their efficiency in the production of xylanase enzymes, carboxymethylcellulase (CMCase) and avicelase having 1% corn straw and cardboard as an inducer substrate in the liquid isolation medium tested at 35 and 45 °C. In this process, a total of 111 fungi were obtained where 80.7% of the isolates were grown in medium with corn stover at 35 °C and induced in medium containing isolated cardboard, they are expressed in greater numbers at 45 °C, about 63.0%. Isolated WPPM 922 had the highest enzymatic activities 614.5 U g⁻¹, and 107.3 U g⁻¹ and 5.37 U g⁻¹ xylanase, CMCase and avicelase respectively, fermented wheat bran at 96 h at 35 °C. Also in this chapter, eight isolates and the *Trichoderma asperelloides* F22, were tested for their potential to hydrolyze 6 types of agricultural and agro-industrial waste. Rice husk was the substrate that more induced the xylanase enzymes and CMCase the isolates tested. The highest xylanase production was obtained with the isolated WPPM 421A activity 931.95 U g⁻¹ in rice husk, and *T. asperelloides* F22 with 876.48 U g⁻¹ with wheat bran as substrate. The isolate WPPM 622 was the fungus that showed the highest activity of CMCase enzyme with activity 155.73 U g⁻¹ in the mixture of sugar cane bagasse and wheat bran, followed by isolated WPPM 151 and the *T. asperelloides* F22 with activity 60.52 U g⁻¹ and 57.29 U g⁻¹ respectively, fermented rice husk. In Chapter II, reports the importance of the minimum conditions for the fungi to express their potential to secrete degradative enzymes of cell wall, it aimed to with this process to obtain a kinetic production of xylanase enzymes and CMCase by isolated WPPM 421A and WPPM 622, and *T. asperelloides* F22 and after characterize the xylanase of these materials with the optimum temperature and pH, thermal and pH stability and half life of the enzyme. *Trichoderma asperelloides* F22 obtained its peak xylanase production at 72 h (606.23 U g⁻¹) and isolated WPPM 421A that obtained peak xylanase production and CMCase at 96 h

(547.27 U g⁻¹ and 55.53 U g⁻¹, respectively). There was a difference in optimum pH and stability of the tested isolates, however, isolated WPPM 421A, cultivated in wheat bran showed optimum pH of 5.5, but maintained its activity above 50% in the pH 5-11 range. The thermostability, isolated WPPM 421A when grown on corn cobs produced more thermostable xylanase activity keeping in 67.4% when the reaction occurred at 90 °C, and also retained its activity by 60%, 12 h incubation at 60 °C, and retained 50% of its activity after incubated 1h at 70 °C. The properties studied enzymes make them promising for biotechnological applications. The region of Sul-mato-grossense has shown promise for the study of fungal microbiota for the production of enzymes, where 99% demonstrated ability to express cellulases and hemicellulases, with activity up to 900 U g⁻¹.

Key words: Xylanase. Endoglucanase. Solid fermentation.. Lignocellulosic waste

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Composição química dos resíduos e subprodutos agrícolas utilizados para produção de enzimas microbianas.....	27
Tabela I.1. Georreferenciamento dos locais amostrados no bioma Pantanal de Miranda-MS e Aquidauana-MS.....	61
Tabela I.2. Composição da solução de micronutrientes utilizada na fermentação sólida com farelo de trigo por linhagens isoladas na Região do Pantanal Sul-mato-grossense.....	63
Tabela I.3. Composição da solução de tampão acetato a 0,2 mol L ⁻¹ utilizada para determinação do açúcar redutor total.....	64
Tabela I.4. Composição dos reagentes para a solução de Ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) utilizada para determinação do açúcar redutor.....	64
Tabela I.5. Composição das soluções utilizadas no método Hartree-Lowry para determinação do teor de proteína total.....	66
Tabela I.6. Origem e dimensões dos substratos utilizados no processo de fermentação para cultivo dos isolados fúngicos.....	66
Tabela I.7. Local de coleta temperatura de cultivo e isolados fúngicos selecionados a partir do solo da região do Pantanal Sul-mato-grossense.....	69
Tabela I.8. Atividades xilanase (XIL), CMCCase (CMC), avicelase (AVIC) e teor de proteína (PROT) produzidas por linhagens isoladas em áreas do Pantanal Sul-mato-grossense, tendo a palha de milho como indutor de crescimento. Fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato, cultivado à 35 e 45 °C, por 96 horas.....	73
Tabela I.9. Atividades xilanase (XIL), CMCCase (CMC), avicelase (AVIC) e teor de proteína (PROT) produzidas isolados da áreas do Pantanal Sul-Mato-Grossense, tendo papelão triturado como indutor de crescimento. Fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato, cultivado à 35 e 45 °C, por 96 horas.....	74
Tabela I.10. Comparação de dados da literatura, sobre as produções de xilanase e carboximetilcelulase, obtidas por fungos cultivados em farelo de trigo sob fermentação em estado sólido.....	78
Tabela I.11. Atividade xilanase, teor de proteína (PROT) e atividade específica (AESP), dos isolados fúngicas cultivados sob fermentação em estado sólido utilizando diferentes substratos, por 96 horas.....	81
Tabela I.12. Atividade carboximetilcelulase (CMCCase), teor de proteína (PROT) e atividade específica (AESP), dos isolados fúngicas cultivados sob fermentação em estado sólido utilizando diferentes substratos, por 96 horas.....	87

Tabela II.1. Relação dos isolados da região do Pantanal, selecionadas para análise do perfil de produção enzimática, e da atividade de xilanase e CMCase obtida na fase de teste com diferentes substratos.....	105
Tabela II.2. Perfil de produção dos isolados WPPM 421A, WPPM 622 e <i>Trichoderma asperelloides</i> F22 em fermentação em estado sólido a 35°C.....	112
Tabela II.3. Perfil de produção de carboximetilcelulase (CMCase) dos isolados WPPM 421A, WPPM 622 e <i>Trichoderma asperelloides</i> F22 em FES a 35 °C nos substratos farelo de trigo, sabugo de milho e a mistura sabugo de milho de farelo de trigo.....	114
Tabela II.4. Perfil de produção dos isolados da região do Pantanal, selecionadas para análise do perfil de produção enzimática.....	115
Tabela II.5. pH ótimo para xilanase produzida pelos isolados WPPM 421A, WPPM 622 e por <i>Trichoderma asperelloides</i> F22.....	116
Tabela II.6. Temperatura ótima para xilanase produzida pelos isolados WPPM 421A e WPPM 622 e por <i>Trichoderma asperelloides</i> F22.....	123
Tabela II.7. Atividade residual da enzima xilanase produzidas pelos isolados WPPM 421A, e WPPM 622 e <i>Trichoderma asperelloides</i> F22, após 60 minutos de incubação em diferentes temperaturas, para determinação da temperatura de estabilidade.....	123
Tabela II.8. Meia vida da enzima xilanase (%), produzidas pelos isolados WPPM 421A, WPPM 622 e <i>Trichoderma asperelloides</i> F22, em FES incubada a 60 °C.....	125
Tabela II.9. Caracterização das xilanases produzidas pelos isoados selecionados.....	126

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1	Sistema deposicional da bacia do Pantanal	20
Figura 2	Diversidade fitogeográfica do pantanal	21
Figura 3	Aumento do número de espécies registradas nos domínios fitogeográfico brasileiras 2010-2015	23
Figura 4	Bioma Pantanal. (a) Mapa de fragilidade; (b) Mapa de potencial agrícola estimado pelo IBGE em 2011	24
Figura 5	Bioma Pantanal. (a) Mapa de uso e cobertura da terra; (b) Modelo de ocupação e uso para o Bioma Pantanal estimado a partir das unidades morfométricas, geologia e solos	24
Figura 6	Estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica	26
Figura 7	Seções longitudinal e transversal de um grão trigo	30
Figura 8	Açúcar que compõe a unidade de celulose.	32
Figura 9	Açúcares que compõem as unidades de hemiceluloses	33
Figura 10	Estrutura da lignina	34
Figura 11	Principais tipos de ligações entre unidades fenil-propanóides presentes na molécula de lignina.	35
Figura 12	Principais unidades aromáticas presentes na molécula de lignina	35
Figura 13	Mecanismo de ação das celulases.	37
Figura 14	Estrutura do xilano, mostrando os diferentes grupos substituintes e o ponto de clivagem das xilanases microbianas	38
Figura I.1	Foto da região da fazenda Caimam, no município de Miranda-MS, onde 10 amostras de solos foram coletadas para isolamento de fungos	60
Figura I.2	Tubos de ensaio contendo 0,5 g de solo em meio nutriente líquido contendo papelão triturado (< 2mm Ø) usado para indução e isolamento de culturas fúngicas.	62
Figura I.3	Monte de bagaço de cana-de-açúcar no pátio da Usina de açúcar e álcool Santa Adélia (à esquerda) e o bagaço lavado e seco em estufa (à direita).	67
Figura I.4	Fases do processo de extração do extrato enzimático produzido por isolados. Maceração, centrifugação e armazenamento em tubos de	68

vidro

- Figura I.5** Relação de isolados obtidos das amostras de solo da região do Pantanal Sul-Mato-Grossense, utilizando meio nutriente de isolamento o papelão triturado e palha de milho como substrato indutor de crescimento, nas temperaturas de 35 e 45 °C, por 96 horas. 72
- Figura I.6** Atividades médias geral para xilanase (XIL), CMCase (CMC), avicelase (AVIC) e teor de proteína (PROT) das soluções enzimáticas produzidas por isolados em áreas do Pantanal Sul-Mato-Grossense, usando palha de milho papelão no 'screening'. Fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato, à 35 °C e 45 °C, por 96 horas. 76
- Figura II.1** Fase de preparo da fermentação sólida em Erlenmeyer contendo substratos como fonte de carbono. 106
- Figura II.2** Efeito do pH sobre a estabilidade da enzima xilanase produzida pelo isolado WPPM 421A, em FES tendo farelo de trigo (FT) e mistura de sabugo de milho e farelo de trigo (SM+FT) como fonte de carbono, após incubação em diferentes tampões a temperatura ambiente. 118
- Figura II.3** Efeito do pH sobre a estabilidade da enzima xilanase produzida pelo isolado WPPM 421A, em FES tendo a mistura de sabugo de milho e farelo de trigo (SM+FT) e sabugo e milho como substrato, e o isolado WPPM 622 (FT), após incubação em diferentes tampões a temperatura ambiente. 119
- Figura II.4** Efeito do pH sobre a estabilidade da enzima xilanase produzida pelo isolado WPPM 622, e *Trichoderma asperelloides* F22 em FES tendo farelo de trigo (FT) como fonte de carbono, após incubação em diferentes tampões a temperatura ambiente. 120
- Figura II.5** Atividade residual da xilanase produzidas pelos isolados WPPM 421A, WPPM 622 e *Trichoderma asperelloides* F22, incubadas em pH 3 a 11 por 24 horas em temperatura ambiente. 121

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ART	Açúcar redutor total
ANOVA	Análise de Variância
BC	Bagaço de cana-de-açúcar
BDA	Batata dextrose ágar
BG	β -glucosidades (BG)
CBH	Celobiohidrolases
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Endoglucanase que hidrolisa carboximetilcelulose
cm	Centímetro
EC	Exoglucanases
EG	Endoglucanases
et al.	Termo latim “e colaboradores”
FPase	<i>Filter paper activities ou activity</i>
FES	Fermentação em Estado Sólido
FSm	Fermentação submersa
FT	Farelo de Trigo
g	Gramas
g L ⁻¹	Gramas por litro
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
2G	Segunda geração (Álcool)
h	Hora/horas
mL	mililitro
mL mg ⁻¹ cm ⁻¹	Mililitro por miligrama por centímetro
mmol L ⁻¹	Milimol por litro
mol L ⁻¹	Mol por litro
nm	Nanômetros
DNS	Ácido dinitrossalicílico
Caz	Casca de arroz
PM	Palha de milho
PMf	Palha de milho fina
SM	Sabugo de milho
SMf	Sabugo de milho fino
U	Unidade de atividade enzimática (1 U é a quantidade de enzima que catalisa 1 μ mol de produto por minuto)
U mL ⁻¹	Unidade enzimática por mililitro de solução
U g ⁻¹	Unidade enzimática por grama de substrato
R ²	Coefficiente de Determinação
μ L	Microlitro
μ mol	Micromol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	Características do Écotono Cerrado-Pantanal	20
2.2	Biomassa lignocelulósica	25
2.2.1	<i>Produtos e subprodutos do bagaço de cana-de-açúcar</i>	27
2.2.2	<i>Produtos e subprodutos do Milho</i>	28
2.2.3	<i>Produtos e subprodutos do Trigo</i>	29
2.2.4	<i>Produtos e subprodutos do Arroz</i>	31
2.3	Componentes da parede celular vegetal	32
2.4	Enzimas degradadoras da parede celular vegetal	36
2.5	Micro-organismos produtores de enzimas e processos fermentativo	39
	REFERENCIAS	42
	CAPITULO I: RESÍDUOS AGRICOLAS E AGROINDUSTRIAIS NA INDUÇÃO DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FUNGOS ISOLADOS DO SOLO DO PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE	53
1	INTRODUÇÃO	57
2	OBJETIVOS	60
3	MATERIAL E MÉTODOS	60
3.1	Local de coleta das amostras	60
3.2	Isolamento e manutenção de linhagens	61
3.3	Preparo dos reagentes	62
3.3.1	<i>Solução estoque de micronutrientes</i>	63
3.3.2	<i>Solução nutriente</i>	63
3.3.3	<i>Tampão Acetato</i>	64
3.3.4	<i>Solução de Ácido 3,5-dinitrossalicílico - DNS</i>	64
3.3.5	<i>Solução de carboximetilcelulose</i>	65
3.3.6	<i>Solução de avicel e xilana</i>	65
3.3.7	<i>Soluções para determinação de proteína total</i>	65
3.3.8	<i>Preparo dos substratos agrícolas e agroindustrias</i>	66
3.4	Fermentação em estado sólido	67
3.5	Efeito da fonte de carbono	68
3.6	Determinação de açúcar redutor total - ART	69
3.6.1	<i>Determinação da atividade enzimática</i>	69
3.7	Determinação do teor de proteína total	70
3.7.1	<i>Determinação de atividade específica</i>	71
3.8	Análise dos dados	71
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4.1	Avaliação do substrato indutor	71
4.2	Atividade enzimática dos isolados	76
4.3	Efeito da fonte de carbono na produção de xilanase	79
4.4	Efeito da fonte de carbono na produção de CMCase	85
5	CONCLUSÕES	90
	REFERÊNCIAS	92
	CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS ENZIMAS	101

**PRODUZIDAS POR ISOLADOS FUNGICOS DO BIOMA
PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE E POR *Trichoderma
asperelloides* F22**

1	INTRODUÇÃO	103
2	OBJETIVOS	105
3	MATERIAL E MÉTODOS	105
3.1	Perfil de Produção	105
3.1.1	<i>Curva de calibração</i>	107
3.1.2	<i>Engoglucanase e Hemicelulase</i>	107
3.1.3	<i>Determinação de Proteína</i>	108
3.2	Caracterização bioquímica da Xilanase	108
3.2.1	<i>Efeito do pH e estabilidade das enzimas</i>	108
3.2.2	<i>Efeito da temperatura na atividade e estabilidade das enzimas</i>	109
3.2.3	<i>Meia vida da enzima</i>	109
3.2	Análise estatística	110
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	110
4.1	Perfil de produção	110
4.1.1	<i>Perfil de Produção da Xilanase</i>	110
4.1.2	<i>Perfil de Produção da CMCase</i>	113
4.2	Efeito do pH e estabilidade da xilanase	116
4.3	Efeito da temperatura na atividade e estabilidade das enzimas	121
4.4	Meia vida da enzima xilanase	124
5	CONCLUSÕES	127
	REFERÊNCIAS	128
	CONCLUSÕES GERAIS	133

1 INTRODUÇÃO

Considerado um ecossistema único no mundo, o Pantanal brasileiro apresenta uma biodiversidade pouco explorada (ALHO; GONÇALVES 2005; ALHO, 2008; ASSINE et al., 2015). Com características marcantes, o Pantanal é conhecido como uma zona úmida, com suscetibilidade a inundações periódicas, que exibem intensidade e duração alternadas, e obedecem a um ciclo que é responsável pelo equilíbrio do sistema ecológico de toda a região (JUNK et al., 2006; ALHO, 2008; MERCANTE et al., 2011).

A integridade da biodiversidade do bioma Pantanal pode estar ameaçada com as atividades que impulsionam a economia do país, como a agricultura, pecuária, expansão urbana e turismo que estão ligadas ao desenvolvimento socioeconômico. Valorizar e proteger a sua biodiversidade é um dos desafios traçados de conscientização, que caminham ao mesmo tempo em que avança a destruição dos recursos naturais. Estes são considerados como tesouros de valor ainda desconhecido, visto que podem conter princípios ativos fonte de novos medicamentos, produtos químicos com potencial industrial, alimentícios e, ainda, outros usos que podem ser esclarecidos e descobertos por meio de pesquisa científica (DURIGAN et al., 2011; MERCANTE et al., 2011).

A diversidade fitogeográfica pantaneira é peculiar devido a convergência de quatro grandes províncias da América do Sul: Amazônica, Cerrado, Florestas Meridionais e Chaquenha (PRANCE; SCHALLER, 1982; AB'SABER, 1988; ALHO; GONÇALVES, 2005). Nele encontra-se uma região de planície alagada, pouco explorado quanto a comunidade microbiana do solo (MAIA et al., 2015), onde tem-se uma boa expectativa quanto a sua diversidade e seu potencial biotecnológico na produção de enzimas.

Alguns micro-organismos são responsáveis por conduzir a ciclagem de nutriente, devido sua habilidade de produzir um complexo de enzimas altamente específicas capazes de degradar a parede celular da biomassa lignocelulósica (LOPES et al., 2013). Vários estudos têm se direcionado à prospecção de micro-organismos, que produzem um complexo enzimático capaz de hidrolisar materiais lignocelulósicos. Os fungos filamentosos são potenciais produtores de enzimas a partir de substratos orgânicos, as quais são secretadas extracelularmente. A secreção extracelular de enzimas reduz custos nos sistemas de produção como a dispensar etapas de rompimento celular que pode ocorrer em fungos leveduriformes e bactérias (PANDEY et al., 2000; COUTO; SANROMÁN, 2006; JIANG et al., 2011). Entretanto, é necessária a identificação de micro-organismos isolados para este fim, assim

como a otimização das condições de cultivo para obter enzimas eficientes, e da mesma forma facilitar o processo de purificação de cada enzima. Dentre as características enzimáticas interessantes à serem analisadas estão a funcionalidade, estabilidade, características bioquímicas, assim como as condições reacionais em diferentes faixas de pH e de temperatura, com a finalidade de a partir destes parâmetros, inferir as reais potencialidades de sua aplicação biotecnológica (POLIZELLI et al., 2005).

Um dos motivos no uso de enzimas em processos industriais está a especificidade da mesma e redução do custo final do processo. Há também aumento da qualidade do produto com a utilização de processos limpos que reduzem os impactos ambientais. As enzimas microbianas são utilizadas por décadas em várias aplicações industriais resultando no aumento da demanda e, principalmente, na busca de enzimas mais estáveis, altamente ativas e específicas. O Brasil, no período de 2003 a 2005, houve 334 empresas que importaram enzimas ou produtos que possuem compostos enzimáticos, e 114 empresas às exportam (COUTO; SANROMÁN, 2006; MONTEIRO; SILVA, 2009; MAYRINK, 2010; POLITZER; BON, 2016).

A biomassa lignocelulósica possui uma resistência ao ataque químico ou bioquímico devido a sua composição físico-químico complexa, dificultando, assim, sua conversão em materiais com alto valor agregado. A biomassa lignocelulósica possui uma composição com proporção que varia de acordo com a espécie, clima e condução da cultura, apresentando uma composição média de 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina (KUHAD et al., 2011; DEUTSCHMAN; DEKKER, 2012).

As celulasas e hemicelulasas são enzimas aplicadas em processos biotecnológicos de diversas indústrias (COUTO; SANROMÁN, 2006). As xilanases são hemicelulasas responsáveis por hidrolisar a cadeia de xilana contida na parede celular vegetal, e são aplicadas principalmente na conversão de matérias lignocelulósicas em produtos químicos e combustíveis, no branqueamento do papel e celulose, nas indústrias têxteis, de alimentos e ração animal, etc. (POLIZELLI et al. 2005). As celulasas catalisam as reações de hidrólise da celulose contida na biomassa em glicose e outros açúcares, podendo ser convertida em produtos com valor agregado e energia, entre outros usos na preparação de alimentos e sucos, produtos dermatológicos e rações animais, etc. (PANDEY, 2005; CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010).

O cultivo de fungos filamentosos se dá geralmente sob a técnica de fermentação em estado sólido, que consiste na utilização de meio de cultura composto por substratos sólidos, atuando como fonte de carbono. Esta técnica é vista como uma alternativa de baixo custo para

a produção de enzimas, quando utiliza-se no processo resíduos e subprodutos agrícolas e agroindustriais como fonte de carbono. Os substratos selecionados para o processo fermentativo devem conter carboidratos que induzam a produção das enzimas de interesse, a exemplo de xilanases, celulasas (PANDEY et al., 2000; OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009; DIAS et al., 2012a).

Diante do exposto, a seleção e o isolamento de fungos filamentosos do solo do bioma Pantanal, com potencial em degradar a biomassa lignocelulósica, e o estudo da produção de enzimas xilanolíticas e celulolíticas utilizando substratos agrícolas e agroindústrias foram a base desse estudo.

REFERÊNCIAS

- AB'SABER, A. N. O Pantanal Mato-Grossense e a teoria dos refúgios. **Revista Brasileira de Geografia**, Rio de Janeiro, v. 50, n. 2, p. 9-57, 1988.
- ADAMOLI, J. O pantanal e suas relações fitogeográficas com os cerrados. Discussão sobre o conceito de "Complexo do Pantanal". In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA. **ANAIS... UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**, 32., 1992, Teresina. **Anais...** Teresina: [s.n.], 1982. , p. 109-119.
- AGUIAR FILHO, M. M.; ROMANHOLO FERREIRA, L. F.; MONTEIRO, R. T. R. Use of vinasse and sugarcane bagasse for the production of enzymes by lignocellulolytic fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 5, p. 1245-1254, 2010.
- ALHO, C. J. R. Biodiversity of the Pantanal: response to seasonal flooding regime and to environmental degradation. **Brazilian Journal of Biology**, Sao Carlos, v. 68, n. 4, p. 957-966, 2008.
- ALHO, C. J. R.; GONÇALVES, H. C. Biodiversidade do Pantanal. **Ecologia e conservação**. Campo Grande-MS: UNIDERP, 2005. 142 p.
- ALVES-PRADO, H. F.; LEITE, R. S. R.; MARTINS, D. A. B.; GOMES, E.; SILVA, R. Cellulolytic Enzymes Isolated From Brazilian Areas: Characterization and Applications. In: GOLAN, A. E. (Org.). **Cellulase: Types and Action, Mechanism and Uses**, New York: Nova Science Publishers, Inc., 2011. Cap. 6, p. 183-210.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 29, p. 719-739, 2005.
- ASSINE, M. L.; MERINO, E. R.; PUPIM, F. N.; MACEDO, H. A.; SANTOS, M. G. M. The Quaternary alluvial systems tract of the Pantanal Basin, Brazil. **Brazilian Journal of Geology**, São Paulo, v. 45, n. 3, p. 475-489, 2015.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL - BRACELPA. [S. l.: s. n.], 2016. Disponível em: <<http://bracelpa.org.br/bra2/?q=node/170>>. Acesso em: 07 mar. 2016.
- BADHAN, A. K.; CHADHA, B. S.; KAUR, J.; SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora sp.* IMI 387099. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 504-510, 2007.
- BARATTO, C. M.; SALAMONI, S. P.; COSTA, R.; OLIVEIRA, C. B.; LOCATELLI, G. O. Seleção de micro-organismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência**, Joaçaba, v. 11, n. 2, p. 15-28, 2011.
- BARBOSA, M. A. G.; REHN, K. G.; MENEZES, M.; MARIANO, R. L. R. Antagonismo of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 32, p. 98-104, 2001.

- BAZZO, J. C.; FREITAS, D. A. F.; SILVA, M. L. N.; CARDOSO, E. L.; SANTOS, S. A. Aspectos geofísicos e ambientais do Pantanal da Nhecolândia. **Revista de Geografia**, Recife, v. 29, n. 1, 2012.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.
- BHAT, R.; KHALIL, H. P. S. A.; KARIM; A. A. Exploring the antioxidant potential of lignin isolated from black liquor of oil palm waste. **Comptes Rendus Biologies**, Issy les Moulineaux, v. 332, p. 827-831, 2009.
- BON, E. P. S.; PEREIRA JUNIOR, N.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. (Eds.). **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro. Editora Interciência Brasil, p. 241-271, 2008.
- BONONI, V. L. R.; OLIVEIRA, A. K. M.; QUEVEDO, J. R.; GULIOTTA, A. M. Fungos macroscópicos do Pantanal do Rio Negro, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Hoehnea**, Sao Paulo, v. 35, n. 4, p. 489-511, 2008.
- BRASIL. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA Trigo, 2010. Publicações On-line. Disponível em: <<http://cnpt.embrapa.br/i-mecan.htm>>. Acesso em: 05 jul. 2016.
- BRASIL. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Introdução do trigo no Brasil. Embrapa Trigo, Rio Grande do Sul, 2010. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do126_2.htm>. Acesso em 14 jul. 2016.
- BRASIL. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Levantamento e mapeamento dos remanescentes da cobertura vegetal do bioma Pantanal, período de 2002 na escala de 1:250.000**. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 2004. p. 43.
- BRUM, P. A. R. et al. **Utilização do** BRUM, P. A. R. et al. **Utilização do trigoilhio em rações para frango de corte**. Concórdia: Embrapa, 1998. 2 p. (Instrução técnica para o avicultor, 3). Disponível em: <<https://docsagencia.cnptia.embrapa.br/suino/instecev/itav003.pdf>>. Acesso em: 05 jun. 2016.
- BURANOV, A. U., MAZZA G. Review: lignin in straw of herbaceous crops. **Industrial Crops and Products**, v. 28, p. 237-259, 2008.
- CAMARGO, F. A. de. **Obtenção, caracterização e estudo de biodegradação de blendas de poli (3-hidroxibutirato-co-valerato) / (PHBV) com lignina de bagaço de cana de açúcar**. 2003. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v.33, n.1, p.181-188, 2011.

DONALDSON, L. A. Review: lignification and lignin topochemistry - an ultrastructural view. **Phytochemistry**, v.57, p.859-873, 2001.

CASTRO, E. M.; VIEIRA, N. R. A.; RABELO, R. R.; SILVA, S. A. **Qualidade de grãos em arroz**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. 30 p. (Circular Técnica, 34).

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA – CEPEA, ESSALQ. Milho agromensal: informações de mercado, julho 2016. Disponível em: <http://cepea.esalq.usp.br/agromensal/2016/07_julho/Milho.htm#_III_%E2%80%93_Gr%C3%A1ficos>. Acesso em: 02. Jun. 2016

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA – CEPEA, ESSALQ. Açúcar e etanol agromensal: informações de mercado, julho 2016. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/agromensal/2016/07_julho/AcucarAlcool.htm>. Acesso em: 13 mai. 2016.

CHAMPAGNE, P. Bioethanol from agricultural waste residues. **Environmental Progress**, Hoboken, n. 27, p. 51-57, 2008.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 29, p. 3-23, 2005.
CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO.

ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA DE GRÃOS. **Safra 2015/16**, Brasília, DF, n. 6, p. 1-138, março 2016. ISSN 2318-6852. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 15 jul. 2016.

COSTA, M. G. et al. Qualidade tecnológica de grãos e farinhas de trigo nacionais e importados - **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, p. 220-225, jan.-mar. 2008. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/cta/v28n1/30.pdf>>. Acesso em: 12 ago. 2015.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry: a review. **Journal Food Engineering**, London, v. 76, p. 291-302, 2006.

DELLA, V. P.; HOTZA, D.; JUNKES, J. A.; OLIVEIRA, A. P. N. Estudos comparativos entre sílica obtida por lixívia ácida da casca de arroz e sílica obtida por tratamento térmico da cinza de casca de arroz. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1175-1179, 2006.

DESWAL, D.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 102, p. 6065–6072, 2011.

DEUTSCHMANN, R., DEKKER, R.F.H. From plant biomass to bio-based chemicals: latest developments in xylan research. **Biotechnology Advances**, New York, v. 30, n. 6, p. 1627-1640, 2012.

DIAS, J. M. C. de S.; SOUZA, D. T. de S.; BRAGA, M.; ONOYAMA, M. M. O.; MIRANDA, C. H. B.; BARBOSA, P. F. D.; ROCHA, J. D. **Produção de briquetes e péletes a partir de resíduos agrícolas, agroindustriais e florestais**. Brasília, DF:

- Embrapa Agroenergia, 2012a. 130 p. Disponível em:
<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/78690/1/DOC-13.pdf>>. Acesso em:
10 jun. 2016.
- DIAS, M. F. P.; PEDROZO, E. A.; ANICET, C. N. Desafios e respostas inovadoras sustentáveis da agroindústria arrozeira brasileira. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 4, n. 1, p. 57-77, 2011.
- DIAS, M. O. S.; JUBQUEIRA, T. L.; CAVALETT, O.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; ROSSEL, C. E. V.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 103, n.1, p.152-161, 2012b.
- DONG, X.; DONG, M.; LU, Y.; TURLEY, A.; JIN, T.; WU, C. Antimicrobial and antioxidant activities of lignin from residue of corn stover to ethanol production. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 34, p. 1629-1634, 2011.
- DURIGAN, G.; MELO, A. C. G.; MAX, J. C. M.; CONTIERI, W. A.; RAMOS, V. S. **Manual para recuperação da vegetação de Cerrado**. 3. ed. São Paulo: SMA, 2011. 19 p.
- DUTRA, T. R.; MASSAD, M. D.; SARMENTO, M. F. Q.; OLIVEIRA, J. C. Substratos alternativos e métodos de quebra de dormência para produção de mudas de canafístula. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 60, n.1, p. 072-078, jan/fev, 2013.
- FALKOSKI, D. F.; GUIMARÃES, V. M.; ALMEIDA, M. N.; ALFENAS, A. C.; COLODETTE, J. L.; REZENDE, S. T. *Chrysosporthe cubensis*: A new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 130, p. 296-305, 2013.
- FANG, H. E.; XIA, L. High activity cellulase production by recombinant *Trichoderma reesei* ZU-02 with the enhanced cellobiohydrolase production. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 44, p. 69, 2013.
- FAO STAT. **On-line database**. Rome: FAO, 2013 Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 12 fev. 2016.
- FERREIRA, C. S. **Desenvolvimento do processo de obtenção de filme polimérico a partir da cinza da casca de arroz**. 2005. 75f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- FIGUEIRO, G. G.; GRACIOLLI, L. A. Influência da composição química do substrato no cultivo de *Pleurotus florida*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 5, p. 924-930, 2011.
- FREITAS, S. S. **Avaliação de pré-tratamentos em resíduo oriundo do cultivo do milho**. 2011. 72 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade Tiradentes, Aracaju, 2011.

- FREITAS, T. A. S.; BARROSO, D. G.; CARNEIRO, J. G. A.; PENCHEL, R. M.; FIGUEIREDO, F. A. M. M. Mudanças de eucalipto produzidas a partir de miniestacas em diferentes recipientes e substratos. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 30, p. 519-528, 2006.
- GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.
- GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. **Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology**. New York: Ed. W.H. Freeman and Company, 1995. p. 335-357.
- GUILLÉN, F. et al. Biodegradation of lignocelluloses: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, Madrid, v. 8, n. 19, p. 187-204, 2005.
- HAHN, G.; HAHN, R.; LEONARDOS, O. H.; PFLUG, H. D.; WALDE, D. H. G. Kfrperlich erhaltene Scyphozoen-Reste aus dem Jungprekambrium Brasiliens. **Geologica et Paleontologica**, Madrid, v. 16, p. 1-18, 1982.
- HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ŽUPANČIČ, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 58, n. 2, p. 137-161, 1996.
- HOLKER, U. et al. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 64, n. 2, p. 175-186, 2004. ISSN 0175-7598.
- HU, H. et al. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Kidlington, v. 65, p. 248-252, 2011.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Mapas interativos**. Brasília, DF, 2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 02 abr. 2016.
- IRSHAD, M.; ANWAR, Z.; BUT, H.; AFROZ, A.; IKRAM, N.; RASHID, U. The industrial applicability of purified cellulase complex indigenously produced by *Trichoderma viride* through solid-state bio-processing of agro-Industrial and municipal paper wastes. **BioResources**, Raleigh, v. 8, p. 145-157, 2013.
- JARDINE, J. G.; DISPATO, I.; PERES, M. R. Considerações sobre o bioetanol lignocelulósicos para subsidiar a elaboração de conteúdo da árvore de conhecimento Agroenergia. **Embrapa Informática Agropecuária**, Campinas, p.11-12, 2009.
- JIANG, X.; GENG, A.; HE, N.; LI, Q. New isolate of *Trichoderma viride* strain for enhanced cellulolytic enzyme complex production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Suita, v. 111, p.121-127, 2011.

JUNIOR, D. M. L.; MONTEIRO, P. B. S.; RANGEL, A. H. N.; MACIEL, M. V.; OLIVEIRA, S. E. O. Cana-de-açúcar na alimentação de ruminantes. **Revista Verde**, Mossoró, v. 5, n. 2, p. 13-20, 2010.

JUNK, W. J.; CUNHA, C. N. Pantanal: a large South American wetland at a crossroads. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v. 24, p. 391-401, 2005.

JUNK, W. J.; CUNHA, C. N.; WANTZEN, K. M.; PETERMANN, P.; STRÜSSMANN, C.; MARQUES, M. I.; ADIS, J. Biodiversity and its conservation in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. **Aquatic Science**, Basel, v. 69, n. 3, p. 278-309, 2006.

KERBER, B. B.; ROSA, A. L. Z.; GABAS, S. G.; LEME, J. M.; PACHECO, M. L. A. O registro fossilífero de metazoários ediacaranos na América do Sul e suas implicações nos estudos sobre origem e complexificação da vida. **Geologia USP**, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 5-64, set. 2013.

KIRK, P.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. **Dicionário dos Fungos**. 10. ed. Wallingford: CABI Publishing, 2008. 771 p.

KRISHNA, C. Solid-State Fermentation Systems – Na Overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, Philadelphia, v. 25, p.1-30, 2005.

KUHAD, R. C.; GRUPTA, R.; SINGH, A. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. **Enzyme Research**, New York, v. 2011, p. 1-10, 2011. Article ID 280696. doi:10.4061/2011/280696

LEATHERS, T. D. Bioconversions of maize residues to valueadded coproducts using yeast-like fungi. **FEMS Yeast Res**, Oxford, v.3, n.2, p.133-140, 2003.

LEQUART, C.; NUZILLARD, J. M; KUREK, B.; DEBEIRE, P. Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: production and structural characterization of cinnamoyl-oligosaccharides. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 319, p. 102–111, 1999.

LI, X.; WENG, J. K.; CHAPPLE, C. Improvement of biomass through lignin modification. **Plant Journal**, Chichester, v. 54, p. 569-581, 2008.

LOPES, R. B.; BRITO, M. A. V. P. MELLO, S. C. M.; SAGGIN, O. J.; WENDLAND, A. Coleções microbianas na Embrapa: conservação e agregação de valor à biodiversidade. In: SIMPÓSIO MICRO-ORGANISMOS EM AGROENERGIA: DA PROSPECÇÃO AOS BIOPROCESSOS. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2013.161 p. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/95339/1/DOC15-19-12-2013.pdf>>. Acesso em: 11 mar. 2016.

LYND, L. et al. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 66, n. 3, p. 506, 2002. ISSN 1092-2172.

MAES, C.; VANGENEUGDEN, B.; DELCOUR, J. A. Relative activity of two endoxylanases towards water-unextractable arabinoxylans in wheat bran. **Journal of Cereal Science**, London, v. 39, p.181-186, 2004.

- MAGALHÃES, L. R. G.; VASQUEZ, H. M.; COELHO, S. J. F. Bagaço hidrolisado e ponta de cana-de-açúcar (*Sacharum officinarum*), associados a duas fontes proteicas, na engorda de bovinos em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Vicosa, MG, v. 28, n. 4, p. 822-830, 1999.
- MAIA, L. C. et al. Diversity of Brazilian fungi. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 4, p. 1033-1045, 2015.
- MAIA, L. C.; CARVALHO JUNIOR, A. A. Fungos do Brasil. In: FORZZA, R.C. et al. (Org.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio /Instituto de Pesquisas Jardim Botânico, 2010. v. 1, p. 43-48, 2010.
- MANUKOVSKY, N. S.; KOVALEV, V. S.; YERYGALOV, V.; ZOLOTUKHIN I. G. Waste bioregeneration in life support CES: development of soil organic substrate. **Advances in Space Research**, Kidlington, v. 20, p. 1827–1832, 1997.
- MAYRINK, M. I. C. B. **Produção de enzimas fúngicas e avaliação do potencial das celulasas na sacarificação da celulose**. 2010. 94 p. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais – Brasil.
- MERCANTE, M. A.; RODRIGUES, S. C.; ROSS, J. L. S. Geomorphology and habitat diversity in the Pantanal. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 71, n. 1, supl. 1, p. 233-240, 2011.
- MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, p. 9-23, 2009.
- MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. Chemical analysis of Pinusocarpa wood PARTE I – quantification of macromolecular components and volatile extractives. **Revista Árvore**, viçosa, MG, v. 29, n. 3, p.461-470, 2005.
- MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 07-14.
- NAKUMURA, S. Structure and function of a multidomain alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain 41M-1. **Catalysis Surveys from Asia**, New York, v. 7, p. 157-164, 2003.
- OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 742-756, 2009.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, p. 81-84, 2003.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid-state fermentation: 1-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, London, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. *Enzyme Technology*. **New Delhi: Asiatech Publishers**, p. 760, 2005.

PAVARINA, E. C. **Estudo dos Sistemas celulolítico e fermentativo de fungos macroaeróbios facultativos**. 1997. 82 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Unicamp, Campinas, 1997.

PELIZER, L. H. **Estudo da influência da atividade de água na fermentação em estado sólido de *Bacillus thuringiensis***. 1997. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 1997.

PEREIRA, A. A.; MARTINS, G. F.; ANTUNES, P. A.; CONRADO, R.; PASQUINI, D.; JOB, A. E. Lignin from sugar cane bagasse: extraction, fabrication of nanostructured films, and application. **Langmuir**, Washington, v. 23, p. 6652–6659, 2007.

PEREIRA, G.; CHÁVEZ, E. S.; SILVA, M. E. S. O estudo das unidades de paisagem do bioma Pantanal. **Ambi-Agua**, Taubaté, v. 7, n. 1, p. 89-103, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.826>>. Acesso em: 05 jul. 2016.

PEREIRA, L. O.; CARDOZO, F. S.; MOURA, Y. M.; FONSECA, L. M. G.; PEREIRA, G.; MORAES, E. C. Delimitação das áreas alagadas do Pantanal a partir da análise por Componentes Principais e Transformada Wavelet. In: SIMPÓSIO DE GEOTECNOLOGIAS NO PANTANAL, 3. 2010, Cáceres. **Anais...** Cáceres: [s. n.] 2010. p. 200-209. Disponível em: <<http://www.geopantanal2009.cnptia.embrapa.br/2010/cd/geopantanal.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

POLITZER, K.; BON, E. P. S. **Enzimas industriais e Especiais. Visão Geral e área de enzimas, conclusões e recomendações**. CGEE – Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Ciência, Tecnologia e Inovação. Rio de Janeiro, p. 580. 2006.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, H.; JORGE, J. AMORIM, D. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Biochemistry Microbiology**, Moscow, v. 67, n. 5, p. 577–591, 2005.

PRANCE, G. T.; SCHALLER, G. B. Preliminary study of some vegetation types of the Pantanal, Mato grosso, Brazil. **Brittonia**, New York, v. 34, n. 2, p. 228-251, 1982.

REUTERS – THOMPSON REUTERS BRASIL, 2016. Disponível em: <<http://br.reuters.com>>. Acesso em: 15 jul. 2016.

RIBEIRO, J. F.; DIAS, T. Diversidade e conservação da vegetação e da flora. In: BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade do Cerrado e Pantanal: áreas e ações prioritárias para conservação**. Brasília, DF: MMA, 2007. P. 21-139. (Série Biodiversidade 17).

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L. et al. **Tabelas brasileiras para suínos e aves: composição de alimentos e exigências nutricionais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 141 p.

- SABALSAGARAY, B. S. **Levantamento de Produção de Resíduos Agro-Industriais e seu Potencial de Utilização na Indústria da Construção**. 1998. 127p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Escola de Engenharia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.
- SAIDELLES, A. P. F.; SENNA, A. J. T.; BITENCOURT, G. Gestão de Resíduos Sólidos na Indústria de Beneficiamento de arroz. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Santa Maria, v. 5, n. 5, p. 904 - 916, 2012. ISSN: 2236-1170.
- SAITO, I. M. **Produção de hidrolisados e fibras a partir de resíduo da industrialização da mandioca submetido a pré-tratamento hidrotérmico**. 2005. 97f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, 2005. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/101732>>. Acesso em: 18 mai. 2016.
- SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. **Mycological Research**, London, v. 100, p. 923-935, 2006.
- SAMUELS, G. J.; ISMAIEL, A.; BON, M.; RESPINIS, S.; PETRINI, O. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. **Mycologia**, Lawrence, v. 102, p. 944-966, 2010.
- SANTANA, R. M., GONÇALVES, Z. S., BONOMO, R. C. F., FRANCO, M. Produção de amiloglucosidade utilizando como substrato a palma forrageira. **Revista Caatinga**, [S. l.], v. 25, p. 188-193, 2012.
- SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, p. 1004-1010, 2012.
- SCHOONEVELD-BERGMANS, M. E. F.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G. J. Structural features of (glucurono) arabinoxylans extracted from wheat bran by barium hydroxide. **Journal of Cereal Science**, London, v. 29, p. 63-75, 1999.
- SILVA, M. P.; MAURO, R.; MOURÃO, G.; COUTINHO, M. Distribuição e quantificação de classes de vegetação do Pantanal através de levantamento aéreo. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 23, p. 143-152, 2000.
- SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 2010. 109f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicas e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- SILVA, R.; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K.; GOMES, E. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* Miede, **Brazilian Journal Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 36, p. 235-241, 2005.
- SILVEIRA, R. F. M. **Atividades biológicas de xilana de sabugo de milho**. 2010. 86 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica; Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

SOUZA, O.; SANTOS I. E.; **Aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar pelos ruminantes**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002. 3p. (Comunicado Técnico, 7).

SRIRAM, S.; MANASA, S. B.; SAVITHA, M. J. Potential use of elicitors from *Trichoderma* in induced systemic resistance for the management of *Phytophthora capsici* in red pepper. **Journal Biological Control**, Bangalore, v. 23, n. 4, p. 449-456, 2009.

SRIRAM, S.; RAY, R. C. *Trichoderma*: systematic and molecular taxonomy and application in agriculture and industry. In: Microbial Biotechnology in Agriculture and Aquaculture, (ed. RAY, R. C.), **Science Publishers**, New Hampshire, v. 1, p. 333–370, 2005.

SRIRAM, S; SAVITHA, M. J.; ROHINI, H. S.; JALALI, S. K. The most widely used fungal antagonist for plant disease management in India, *Trichoderma viride* is *Trichoderma asperellum* as confirmed by oli, n.4, p.gonucleotide barcode and morphological characters. **Current Science**, Jodhpur, v. 104, p. 1332-1340, 2013.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulose production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, Schenectady, v. 32, p. 421-424, 2009.

TAO, Y. M.; ZHU, X. Z.; HUANG, J. Z.; MA, S. J.; WU, X. B.; LONG, M. N.; CHEN, Q. X. Purification and properties of endoglucanase from a sugarcane bagasse hydrolyzing strain, *Aspergillus glaucus* XC9. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 58, n. 10, p. 6126-6130, 2010.

TEIXEIRA, A. S. **Alimentos e alimentação dos animais**. Lavras: UFLA - FAEPE, 1998. 402 p.

TIAN-QING, L.; DONG, W.; SHANG-TIAN, Y.; XIAO GUANG, L. Enhanced cellulase production by *Trichoderma viride* in a rotating fibrous bed bioreactor. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.133, p.175–182, 2013.

ÚNICA. **União da Indústria de Cana-de-açúcar. Estimativa da safra 2010/2011 na região Centro-Sul**. [S. l.: s. n.], 2016. Disponível em: <www.unica.com.br>. Acesso em: 21 abr. 2016.

VALE, A. T.; DANTAS, V. F. S.; ZAMBRZYCKI, G. C. Potencial energético dos resíduos da cultura do milho (*Zea mays*). **Evidência**, Joaçaba, v. 13, n. 2, p. 153-164, jul./dez. 2013.

VALE, A. T.; GENTIL, L. V. Produção e uso energético de biomassa e resíduos agroflorestais. In: _____. **Tecnologias aplicadas ao setor madeireiro III**. Rio Branco: Suprema, 2008. p. 195-241.

VIEIRA, N. R. A.; CARVALHO, J. L.V. Qualidade tecnológica. In: VIEIRA, N. R. A.; SANTOS, A. B.; SANTANA, E. P. **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 1999. p. 582-604.

VINIEGRA-GONZALEZ, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, C. N.; ROMEROGOMEZ, S.; DIAZ-GODINEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid-state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, n. 2/3, p. 157-167, 2003.

WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. L. Multiplicity of β -1,4xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 52, p. 305-317, 1988.

ZHANG, M. A.; QI, W.; LIU, R.; SU, R. X.; WU, S.; HE, Z. Fractionating lignocellulose by formic acid: Characterization of major components. **Biomass & Bioenergy** v.34, p.525-532, 2010.

ZHANG, Y. H. P.; DING, S. Y.; MIELENZ, J. R.; CUI, J. B.; ELANDER, R. T.; LASER, M.; HIMMEL, M. E.; McMILLAN, J. R.; LYND, L. R. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. **Biotechnology Bioengineering**, Hoboken, v. 97, p. 214–223, 2007. doi:10.1002/bit.21386

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