



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Héberly Fernandes Braga

Otimização da produção de amilases e pectinases por *Gongronella butleri* usando subprodutos agroindustriais

São José do Rio Preto
2021

Héberly Fernandes Braga

Otimização da produção de amilases e pectinases por *Gongronella butleri* usando subprodutos agroindustriais

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

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

São José do Rio Preto
2021

B813o Braga, Héberly Fernandes
Otimização da produção de amilases e pectinases por
Gongronella butleri usando subprodutos agroindustriais /
Héberly Fernandes Braga. -- São José do Rio Preto, 2021
169 f. : il., tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do
Rio Preto

Orientadora: Heloiza Ferreira Alves do Prado

1. Microbiologia. 2. Fermentação em estado sólido. 3.
Enzimas de fungos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados
fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Héberly Fernandes Braga

Otimização da produção de amilases e pectinases por *Gongronella butleri* usando subprodutos agroindustriais

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Heloiza Ferreira Alves do Prado
UNESP – Câmpus de Ilha Solteira
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Daniela Alonso Bocchini Martins
UNESP – Câmpus de Araraquara

Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Milla Alves Baffi
UFU – Câmpus Umuarama

Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite
UFGD – Câmpus II

São José do Rio Preto
02 de setembro de 2021

A todos aqueles que acreditam na realização de seus sonhos e na concretização de seus objetivos, apesar de todas as adversidades encontradas ao longo do caminho.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente a Deus, por me dar forças e estímulo nos momentos difíceis e angustiosos, e por me guardar, nos períodos de viagens e deslocamentos.

Aos meus familiares próximos, especialmente minha mãe Elzimeire, por orar, torcer, e principalmente compreender meu distanciamento e ausências durante esse período de estudos; e à minha irmã Iara, por intermediar contatos no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia (ICIAG/UFU), onde realizei parte dos meus experimentos.

À minha orientadora, professora Dra. Heloiza, pelo acolhimento, ensinamentos, apoio e compreensão durante a realização desse trabalho.

Aos professores e colegas do curso de Pós-graduação em Microbiologia do IBILCE/UNESP, com os quais tive a oportunidade de trocar experiências e adquirir conhecimentos.

Ao Instituto Federal do Triângulo Mineiro (IFTM), instituição na qual trabalho como docente, que me oportunizou licenças para que pudesse concluir com êxito as disciplinas e me dedicar ao desenvolvimento desse trabalho.

Ao ICIAG/UFU, nas pessoas dos professores Beno Wendling, Milla Baffi, Araújo Hulmann e Elias Borges; assim como aos técnicos Luciana Alves, Beatriz Vieira, Júlia Araújo e Marcelo Dias, que possibilitaram com que eu pudesse usufruir de equipamentos, instrumental, e alguns insumos, colaborando com a realização de parte do desenvolvimento dos experimentos.

Aos estudantes e colegas do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMIC/ICIAG/UFU), Patrícia, Jayder, Bruno e Gabriela; bem como à Bárbara (discente do Programa de Biociências do IBILCE/UNESP), Sirlene (ex-discente do doutorado em Microbiologia do IBILCE/UNESP), e Amanda (discente do curso de Ciências Biológicas da Faculdade de Engenharia do Campus de Ilha Solteira da UNESP) pela vivência, troca de experiências e auxílios, durante essa minha etapa formativa.

À Liliane Andrade (Engenheira química e doutoranda em Biologia Funcional e Molecular da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP), pela colaboração imprescindível e troca de experiências, na parte da realização das análises estatísticas desse trabalho.

Às professoras doutoras Daniela Bocchini e Ana Maria Cassiolato, por terem participado da banca de qualificação e contribuído com o aprimoramento desse trabalho, ao fazerem suas considerações.

E finalmente, um agradecimento a todos àqueles que direta ou indiretamente fizeram críticas, deram sugestões, e trocaram ideias, pois cooperaram para que pudesse crescer em termos acadêmicos, pessoais e profissionais.

“...mais sábio é aquele que sabe que não sabe...”
(GAARDER, 2002, p.71)

RESUMO

Objetivou-se determinar e otimizar a produção de amilases e pectinases, por *Gongronella butleri* sob cultivo em estado sólido (CES), em subprodutos agroindustriais (SA). Foi realizado teste de verificação lítica a 35°C, em meio líquido e sólido com amido ou pectina; assim como o crescimento micelial em ágar padrão a 25, 30, 35 e 40°C. A produção enzimática foi obtida pelo CES a 25, 30 e 35°C em 72 h, sobre diferentes SA caracterizados físico-quimicamente; e as atividades determinadas pelo método de redução do ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS), além do dextrinizante para as amilases. A temperatura foi fixada a 35°C, e o perfil enzimático pelo DNS foi monitorado para alguns dos SA ao longo de 120 h, visando identificar os picos de maior atividade, que ocorreram em farelo de trigo (FT) e soja (FS). O acréscimo das atividades enzimáticas nesses SA foi testado por planejamento experimental 2³, a 35°C por 72 h, combinando proporções de FT e FS, e variando o teor inicial de solução mineral e CaCl₂ dos cultivos; seguido por planejamento um fator por vez, onde se monitorou o efeito de combinações de FT e FS durante 120 h. As melhores condições experimentais obtidas anteriormente foram usadas como parâmetro para se aplicar um delineamento composto central rotacional (DCCR), visando obter o ponto ótimo de produção enzimática, tendo como fatores umidade inicial do meio; temperatura e tempo de cultivo. O fungo desenvolveu-se em meio líquido e sólido contendo amido ou pectina, formando massa micelial em até 24 h. A expansão micelial apresentou diferença significativa ($p \leq 0,05$) inicial nas temperaturas testadas, após 72 h, não sendo observado crescimento a 40°C. Dos SA avaliados, 88,9% induziram atividade amilolítica dextrinizante inferior a 2,5 U mL⁻¹ em ao menos uma das temperaturas, sendo a maior atividade (9,6 U mL⁻¹) observada a 35°C em FT. As atividades amilolíticas pelo DNS foram $\geq 7,0$ U g⁻¹, em todas temperaturas testadas, quando se empregou FS e FT, e para este houve aumento de 31% da atividade pectinolítica de 25°C para 35°C. O pico de atividade amilolítica pelo DNS foi atingido em 72 h para FT (13,7 U g⁻¹) e 96 h para FS (16,0 U g⁻¹); os outros SA mantiveram perfis de atividade inferiores a 3,8 U g⁻¹. A atividade pectinolítica atingiu pico de 41,7 U g⁻¹ para FT, e 33,0 U g⁻¹ para FS em 48 h e após emprego do planejamento 2³ foi observado acréscimo de 82% na atividade amilolítica e 33% na pectinolítica, quando comparado à média individualizada em FT e FS. As maiores atividades amilolíticas (15,97 U g⁻¹) e pectinolíticas (128,92 U g⁻¹), tenderam a ocorrer

em 48 h, e na combinação FT:FS (25%:75%), não diferindo de FT:FS (50%:50%), para pectinases, após planejamento um fator por vez. A ótima produção enzimática (amilases = $32,35 \text{ U g}^{-1}$; pectinases = $246,62 \text{ U g}^{-1}$) obtida por DCCR foi atingida em 61,37% umidade inicial, 30°C e 68 h de cultivo. Os resultados indicam potencial de produção enzimática, em especial pectinases, por *G. butleri* quando em FT e FS.

Palavras-chave: Biomassa vegetal. Bioprocesso. Fungos isolados do Cerrado. Produção enzimática. Resíduos agroindustriais.

ABSTRACT

The objective was to determine and optimize the production of amylases and pectinases by *Gongronella butleri* under solid state cultivation (SSC) in agro-industrial by-products (AP). A lytic verification test was carried out at 35°C, in liquid and solid medium with starch or pectin; as well as mycelial growth on standard agar at 25, 30, 35 and 40°C. The enzymatic production was obtained by SSC at 25, 30 and 35°C in 72 h, on different physicochemically characterized AP; and the activities determined by the method of reduction of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS), in addition to the dextrinizer for amylases. The temperature was fixed at 35°C, and the enzymatic profile by DNS was monitored for some of the AP over 120 h, in order to identify the peaks of higher activity, which occurred in wheat bran (WB) and soybean (SB). The addition of enzymatic activities in these AP was tested by experimental design 2³, at 35°C for 72 h, combining proportions of WB and SB, and varying the initial content of mineral solution and CaCl₂ of the crops; followed by planning one factor at a time, where the effect of combinations of WB and SB was monitored during 120 h. The best experimental conditions previously obtained were used as a parameter to apply a central composite rotational design (DCCR), in order to obtain the optimum point of enzyme production, having as factors the initial moisture of the medium; temperature and time of cultivation. The fungus developed in a liquid and solid medium containing starch or pectin, forming mycelial mass within 24 h. The mycelial expansion showed a significant difference ($p \leq 0.05$) at the initial temperatures tested, after 72 h, with no growth being observed at 40°C. Of the AP evaluated, 88.9% induced dextrinizing amylolytic activity less than 2.5 U mL⁻¹ in at least one of the temperatures, with the highest activity (9.6 U mL⁻¹) being observed at 35°C in WB. The amylolytic activities by DNS were ≥ 7.0 U g⁻¹, at all temperatures tested, when SB and WB were used, and for this there was an increase of 31% in pectinolytic activity from 25°C to 35°C. The peak of amylolytic activity by DNS was reached in 72 h for WB (13.7 U g⁻¹) and 96 h for SB (16.0 U g⁻¹); the other AP maintained activity profiles below 3.8 U g⁻¹. The pectinolytic activity reached a peak of 41.7 U g⁻¹ for WB, and 33.0 U g⁻¹ for SB in 48 h and after the use of planning 2³, an increase of 82% in the amylolytic activity and 33% in the pectinolytic activity was observed, when compared to the individualized average in WB and SB. The highest amylolytic (15.97 U g⁻¹) and pectinolytic (128.92 U g⁻¹) activities tended to occur within 48 h, and in the WB:SB (25%:75%) combination, not differing

from WB:SB (50%:50%), for pectinases, after planning one factor at a time. The optimal enzyme production (amylases = 32.35 U g⁻¹; pectinases = 246.62 U g⁻¹) obtained by DCCR was reached at 61.37% initial moisture, 30°C and 68 h of cultivation. The results indicate potential for enzyme production, especially pectinases, by *G. butleri* when in WB and SB.

Keywords: Vegetable biomass. Bioprocess. Fungi isolated from the Cerrado. Enzymatic production. Agro-industrial waste.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Percentual de empresas de biotecnologia no Brasil por área de atuação em 2011.....	35
Figura 2 – Mapa dos <i>hotspots</i> de biodiversidade da Terra, incluindo o Cerrado	36
Figura 3 – Distribuição geográfica de espécies de <i>Paecilomyces</i> no Brasil, inferida a partir de dados recuperados da base <i>speciesLink</i>	38
Figura 4 – Basidiomas de <i>Auricularia nigricans</i> (a), <i>A. fuscusuccinea</i> (b), <i>A. mesenterica</i> (c) e <i>A. delicata</i> (d)	39
Figura 5 – Basidioma fresco de <i>Phlebopus beniensis</i> (a) e detalhe da micofagia por larvas de inseto (b)	40
Figura 6 – Tipos fitofisionômicos do Cerrado	43
Figura 7 – Biomas brasileiros, cidades e estados, tipos de cultivos agrícolas e vegetação nativa onde as amostras de solo foram coletadas	45
Figura 8 – Biotransformação de progesterona (1) em 11 α -hidroxiprogesterona (2) por <i>Rhizopus arrhizus</i>	49
Figura 9 – Desenho esquemático das estruturas morfológicas gerais de fungos pertencentes ao subfilo Mucoromycotina e fotomicrografia do esporângio de <i>Gongronella butleri</i>	55
Figura 10 – Fórmulas estruturais da amilose e amilopectina	59
Figura 11 – Representação esquemática da ação das enzimas envolvidas na degradação do amido	60
Figura 12 – Representação esquemática da estrutura das substâncias pécticas	63
Figura 13 – Ação das esterases sobre a molécula de pectina	64
Figura 14 – Ação das polimetilgalacturonases e poligalacturonases sobre a molécula de pectina	65
Figura 15 – Ação de β -eliminação catalisada por liases sobre a molécula de pectina	65
Figura 16 – Desenvolvimento celular de <i>Gongronella butleri</i> a 35°C $\pm$ 0,5 por 24 horas, em meio líquido (a), e sólido (b, c), contendo amido	85

Figura 17 – Crescimento micelial (cm) médio ($\pm$ desvio padrão) de <i>Gongronella butleri</i> em diferentes temperaturas ao longo do tempo, em <i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA)	87
Figura 18 – Determinação do pH (média $\pm$ desvio padrão) inicial dos meios de cultivo com e sem adição de solução mineral nutritiva	91
Figura 19 – Determinação do teor percentual de cinzas (média $\pm$ desvio padrão) inicial dos meios de cultivo com e sem adição de solução mineral nutritiva	93
Figura 20 – Atividade amilolítica (U mL^{-1}) dextrinizante média de <i>Gongronella butleri</i> , em cultivo em estado sólido por 72 horas, em diferentes temperaturas e subprodutos agroindustriais	95
Figura 21 – Atividade amilolítica (U g^{-1}) média, pelo método de redução do ácido-3,5-dinitrosalicílico, de <i>Gongronella butleri</i> em cultivo em estado sólido por 72 horas, sob diferentes temperaturas e subprodutos agroindustriais	96
Figura 22 – Atividade pectinolítica (U g^{-1}) média, pelo método de redução do ácido-3,5-dinitrosalicílico, de <i>Gongronella butleri</i> em cultivo em estado sólido por 72 horas, sob diferentes temperaturas e subprodutos agroindustriais	97
Figura 23 – Perfil da atividade amilolítica (U g^{-1}) média de <i>Gongronella butleri</i> (a) e proteína total (mg mL^{-1}) média (b), em diferentes subprodutos agroindustriais, pelo método de redução do ácido-3,5-dinitrosalicílico, em cultivo em estado sólido a 35°C ao longo de 120 horas	99
Figura 24 – Perfil da atividade pectinolítica (U g^{-1}) média de <i>Gongronella butleri</i> (a) e proteína total (mg mL^{-1}) média (b), em diferentes subprodutos agroindustriais, pelo método de redução do ácido-3,5-dinitrosalicílico, em cultivo em estado sólido a 35°C ao longo de 120 horas	102
Figura 25 – Perfil da atividade amilolítica e pectinolítica (U g^{-1}) média de <i>Gongronella butleri</i> , em farelo de trigo e farelo de soja, pelo método de redução do ácido-3,5-dinitrosalicílico, em cultivo em estado sólido a 35°C ao longo de 120 horas	105
Figura 26 – Atividades enzimáticas específicas (U mg^{-1}) e teor de proteínas totais (mg mL^{-1}) de <i>Gongronella butleri</i> em cultivo em estado sólido a 35°C por 72 h, após planejamento experimental fatorial 2^3 , com três repetições do ponto central	107

Figura 27 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis independentes sobre a atividade amilolítica, após cultivo em estado sólido de <i>Gongronella butleri</i> , a 35°C por 72 horas, empregando planejamento experimental fatorial 2 ³ , com três repetições do ponto central	108
Figura 28 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis independentes sobre a atividade pectinolítica, após cultivo em estado sólido de <i>Gongronella butleri</i> , a 35°C por 72 horas, empregando planejamento experimental fatorial 2 ³ , com três repetições do ponto central	110
Figura 29 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis independentes sobre a redução percentual da viscosidade de uma solução de pectina, após cultivo em estado sólido de <i>Gongronella butleri</i> , a 35°C por 72 horas, empregando planejamento experimental fatorial 2 ³ , com três repetições do ponto central	112
Figura 30 – Perfil enzimático médio (U g ⁻¹) de <i>Gongronella butleri</i> (a, b) e proteína total média (mg mL ⁻¹) (c), em diferentes combinações de farelo de trigo e farelo de soja, pelo método de redução do ácido-3,5-dinitrosalicílico, em cultivo em estado sólido a 35°C ao longo de 120 horas	114
Figura 31 – Colonização de <i>Gongronella butleri</i> a 35°C por 48 h, sobre substratos farelo de trigo e farelo de soja combinados em diferentes proporções	115
Figura 32 – Atividades enzimáticas (U g ⁻¹) e teor de proteínas totais (mg mL ⁻¹) de <i>Gongronella butleri</i> em cultivo em estado sólido sobre composição de substrato fixado em 25% de farelo de trigo e 75% de farelo de soja, após emprego de delineamento composto central rotacional (DCCR), com quatro repetições no ponto central	118
Figura 33 – Diagramas de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis independentes sobre a produção de amilases e pectinases, após cultivo em estado sólido de <i>Gongronella butleri</i> , empregando delineamento composto central rotacional (DCCR), com quatro repetições do ponto central	121
Figura 34 – Curvas de contorno e gráficos de superfície de resposta, referentes aos efeitos das variáveis independentes sobre a atividade amilolítica (U g ⁻¹) de <i>Gongronella butleri</i> , após cultivo em estado sólido sobre	

25% de farelo de trigo e 75% de farelo de soja, empregando delineamento composto central rotacional (DCCR), com quatro repetições no ponto central 123

Figura 35 – Curvas de contorno e gráficos de superfície de resposta, referentes aos efeitos das variáveis independentes sobre a atividade pectinolítica ($U\ g^{-1}$) de *Gongronella butleri*, após cultivo em estado sólido sobre 25% de farelo de trigo e 75% de farelo de soja, empregando delineamento composto central rotacional (DCCR), com quatro repetições no ponto central 124

Figura 36 – Colonização de *Gongronella butleri* sobre proporção de substrato fixado (25% de farelo de trigo e 75% de farelo de soja), em diferentes condições experimentais obtidas por delineamento composto central rotacional (DCCR), com quatro repetições no ponto central 126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fatores codificados do planejamento experimental 2^3	79
Tabela 2 – Planejamento experimental fatorial 2^3 , com três repetições do ponto central	80
Tabela 3 – Planejamento um fator por vez, combinando-se os substratos A e B em diferentes proporções	81
Tabela 4 – Níveis codificados e reais das variáveis independentes para a fermentação do Delineamento composto central rotacional (DCCR)	82
Tabela 5 – Matriz do planejamento experimental DCCR (valores decodificados e codificados) para os fatores umidade (%); temperatura de incubação (°C); e tempo de cultivo (h)	84
Tabela 6 – Parâmetros (médias $\pm$ desvio padrão) físico-químicos dos substratos agroindustriais, sem adição de solução mineral nutritiva, empregados no cultivo em estado sólido de <i>Gongronella butleri</i>	89
Tabela 7 – Parâmetros (médias $\pm$ desvio padrão) físico-químicos dos substratos agroindustriais adicionados da solução mineral nutritiva (10 mL) empregados no cultivo em estado sólido de <i>Gongronella butleri</i>	90
Tabela 8 – Redução percentual e numérica no teor de sólidos solúveis e açúcares redutores totais dos sistemas de cultivo contendo diferentes substratos, após adição inicial de solução mineral nutritiva	93
Tabela 9 – Atividades amilolíticas específicas (U mg ⁻¹ proteína) médias de <i>Gongronella butleri</i> , em diferentes subprodutos agroindustriais, pelo método de redução do ácido-3,5-dinitrosalicílico, em cultivo em estado sólido a 35°C ao longo de 120 horas	101
Tabela 10 – Atividades pectinolíticas específicas (U mg ⁻¹ proteína) médias de <i>Gongronella butleri</i> , em diferentes subprodutos agroindustriais, pelo método de redução do ácido-3,5-dinitrosalicílico, em cultivo em estado sólido a 35°C ao longo de 120 horas	104
Tabela 11 – Resultados da atividade amilolítica e pectinolítica, pelo método de redução do ácido-3,5-dinitrosalicílico, de <i>Gongronella butleri</i> em cultivo em estado sólido a 35°C por 72 horas, após planejamento experimental fatorial 2^3 , com três repetições do ponto central	107

Tabela 12 – Redução percentual da viscosidade de uma solução de pectina, devida a influência das pectinases produzidas por <i>Gongronella butleri</i> , sob diversas condições experimentais, empregando-se cultivo em estado sólido a 35°C por 72 horas	111
Tabela 13 – Atividades amilolíticas específicas (U mg ⁻¹ proteína) médias de <i>Gongronella butleri</i> , em diferentes combinações de farelo de trigo e farelo de soja, pelo método de redução do ácido-3,5-dinitrosalicílico, em cultivo em estado sólido a 35°C ao longo de 120 horas	116
Tabela 14 – Atividades pectinolíticas específicas (U mg ⁻¹ proteína) médias de <i>Gongronella butleri</i> , em diferentes combinações de farelo de trigo e farelo de soja, pelo método de redução do ácido-3,5-dinitrosalicílico, em cultivo em estado sólido a 35°C ao longo de 120 horas	116
Tabela 15 – Atividades amilolíticas e pectinolíticas médias (U g ⁻¹) de <i>Gongronella buteri</i> em diferentes combinações de farelo de trigo e farelo de soja, em cultivo em estado sólido a 35°C, ao longo de 120 h	117
Tabela 16 – Atividades enzimáticas totais (U g ⁻¹ ou U mL ⁻¹) e atividades enzimáticas específicas (U mg ⁻¹), de <i>Gongronella butleri</i> em cultivo em estado sólido, sobre composição de substrato fixado em 25% de farelo de trigo e 75% de farelo de soja, após emprego de delineamento composto central rotacional (DCCR), com quatro repetições no ponto central	119
Tabela 17 – Modelos empíricos ajustados a produção de amilases e pectinases, após emprego de delinamento composto central rotacional (DCCR)	122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE	Ácido elágico
AG	Ácido gálico
AM	Amazonas
ANOVA	Análise de variância
ARISA	Análise espacial intergênica ribossomal automatizada
ART	Açúcares redutores totais
AS	Ágar <i>Sabouraud</i>
ATCC	American type culture collection: refere-se a linhagens de micro-organismos padrão ou de referência
B.O.D.	Biochemical oxygen demand
BSA	Soro albumina bovina
Capes	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBM	Carbono da massa microbiana
CCD	Cromatografia em camada delgada
C-CO₂	Carbono de gás carbônico liberado
CES	Cultivo em estado sólido
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CM	Casca de maracujá
CSm	Cultivo submerso
DCCR	Delineamento composto central rotacional
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido-3,5-dinitrosalicílico
EC	Enzyme Commission Numbers
EPI	Environmental Performance Index
EPS	Exopolissacarídeos

et al.	“E colaboradores”
E2G	Etanol de segunda geração
FA	Farinha do caroço de abacate
FM	Fibra do resíduo do processamento de mandioca
FMA	Fungos micorrízicos arbusculares
FM-DCA	6 α -fluoro-16 α -metil-desoxicorticosterona 21-acetato
FOS	Frutooligossacarídeos
FS	Farelo de soja
FT	Farelo de trigo
GO	Goiás
http	Hype text tranfer protocol
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase
MG	Minas Gerais
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilicina
MS	Mato Grosso do Sul
p	Valor-p em estatística correspondente à probabilidade
PDA	Potato dextrose agar
pH	Potencial hidrogeniônico
PHA	Polihidroxialcanoatos
PIB	Produto interno bruto
PM	Palha de milho verde
QA	Quirera de arroz
QOS	Quitooligossacarídeos
qMic	Quociente microbiano
SM	Sabugo de milho

sp.	Espécie ainda não identificada de um determinado gênero taxonômico
SP	São Paulo
spp.	Relativo a várias espécies de um determinado gênero taxonômico
SS	Sólidos solúveis
Sw.	Refere-se às iniciais do sobrenome do primeiro botânico Olof Stwartz, que identificou taxonomicamente a espécie
TO	Tocantins
UV	Resíduo do fermentado de vinho de uvas Santa Isabel e Bordô
www	World wide web

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

g L⁻¹	gramas por litro
%	porcentagem (ou percentual; por cento)
h	horas
Gt	giga tonelada
km²	kilômetros quadrados
US\$	unidade de medida financeira para a moeda americana (dólar)
CO₂	dióxido de carbono ou gás carbônico
UFC g⁻¹	unidades formadoras de colônia por grama
v/v	volume por volume
mN m⁻¹	milinewton por metro
P₂O₅	pentóxido de fósforo
H₃PO₄	ácido fosfórico
H₂SO₄	ácido sulfúrico
ppm	partes por milhão
°C	graus Celsius
Ca₃(PO₄)₂	fosfato tricálcio
rpm	rotações por minuto
µg L⁻¹	microgramas por litro
nm	nanômetros
U g⁻¹	unidade internacional de atividade enzimática por grama
U mg⁻¹	unidade internacional de atividade enzimática por miligrama
UI	unidade internacional de atividade enzimática
U mL⁻¹	unidade internacional de atividade enzimática por mililitro
Da	daltons

min.	minutos
mL	mililitros
K₂HPO₄	fosfato de potássio dibásico
MgSO₄.7H₂O	sulfato de magnésio heptahidratado
°Brix	graus Brix
g mL⁻¹	gramas por mililitro
mg g⁻¹	miligrama por grama
g	gramas
g m⁻²	gramas por metro quadrado
µm	micrômetro
HCl	ácido clorídrico
M	molaridade
NaOH	hidróxido de sódio
mm	milímetros
(NH₄)₂SO₄	sulfato de amônio
CaCl₂	cloreto de cálcio
ciclos min.⁻¹	ciclos por minuto
cm⁻²	por centímetro quadrado
g	gravidade (medida rotacional)
µmol	micromol
mg mL⁻¹	miligrama por mililitro
µL	microlitros
KNaC₄H₄O₆.4H₂O	tartarato de sódio e potássio tetraidratado
Na₂CO₃	carbonato de sódio
N	normalidade
CuSO₄.5H₂O	sulfato cúprico pentahidratado

$\mu\text{g mL}^{-1}$	microgramas por mililitro
p/v	partes por volume
mM	milimolar
cm h^{-1}	centímetros por hora

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DA LITERATURA	28
2.1	Produção agrícola/agroindustrial, bioeconomia e desenvolvimento sustentável	28
2.2	Diversidade fúngica no Cerrado	35
2.2.1	Alguns espécimes relatados nos últimos anos	37
2.2.2	Algumas potenciais aplicações biotecnológicas e ameaças à diversidade fúngica	41
2.3	<i>Gongronella butleri</i>: características gerais, emprego e possibilidades evidenciadas em estudos atuais	54
2.4	Amilases	58
2.5	Pectinases	61
2.6	Desafios e alternativas atuais associados ao problema dos resíduos agroindustriais	66
3	OBJETIVOS	70
3.1	Objetivo geral	70
3.2	Objetivos específicos	70
4	MATERIAL E MÉTODOS	72
4.1	Reativação da cepa e teste piloto de produção de amilases e pectinases	72
4.2	Determinação do crescimento e expansão micelial da cepa fúngica em meio de cultivo padrão sob distintas temperaturas ..	73
4.3	Caracterização físico-química dos substratos agroindustriais ...	74
4.4	Cultivo da cepa fúngica sob diferentes substratos agroindustriais e temperaturas	75
4.4.1	Determinação das atividades enzimáticas	76
4.4.2	Determinação do perfil das atividades enzimáticas e atividades específicas	78
4.4.3	Determinação de proteínas	78
4.5	Teste de otimização da produção de enzimas e mensuração da atividade pectinolítica por método viscosimétrico empregando planejamento fatorial 2³	79

4.6	Planejamento um fator por vez, seguido de delineamento composto central rotacional (DCCR)	81
4.6.1	Planejamento experimental usando delineamento composto central rotacional (DCCR)	82
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
5.1	Teste piloto de produção de amilases e pectinases	85
5.2	Crescimento e expansão micelial de <i>G. butleri</i> IPS 8.2 em ágar PDA, ao longo do tempo, em distintas temperaturas	86
5.3	Características físico-químicas dos subprodutos agroindustriais	89
5.4	Atividades enzimáticas amilolíticas e pectinolíticas sob diferentes temperaturas e tempo fixado	94
5.5	Perfil de atividade enzimática em diferentes tempos de fermentação e temperatura fixada, empregando o método do ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS)	98
5.6	Otimização da produção enzimática empregando-se planejamento fatorial 2 ³	106
5.6.1	Redução percentual da viscosidade	111
5.7	Efeito da combinação de substratos sobre a produção enzimática após emprego de planejamento um fator por vez, seguido de DCCR	113
6	CONCLUSÃO	127
	REFERÊNCIAS	128
	APÊNDICE A – Curvas de calibração padronizadas para a determinação de açúcares redutores totais (ART)	162
	APÊNDICE B – Curvas de calibração padronizadas da solução do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)	163
	APÊNDICE C – Curva de calibração de soro albumina bovina (BSA)	164
	APÊNDICE D – Quadro de análise de variância (ANOVA) para o crescimento micelial de <i>Gongronella butleri</i> IPS 8.2	165
	APÊNDICE E – Tabelas de coeficientes e significância estatística das variáveis independentes sobre as atividades	

enzimáticas e redução percentual da viscosidade de uma solução de pectina, após emprego de planejamento fatorial 2^3 ..	166
APÊNDICE F – Tabelas de coeficientes e significância estatística das variáveis independentes sobre as atividades enzimáticas (amilase e pectinase), após emprego de delineamento composto central rotacional (DCCR)	167
APÊNDICE G – Tabelas de análise de variância (ANOVA) para os modelos ajustados as atividades enzimáticas (amilase e pectinase), após emprego de delineamento composto central rotacional (DCCR)	168
APÊNDICE H – Gráficos das respostas reais <i>versus</i> preditas pelo modelo linear de regressão aplicado às atividades enzimáticas (amilase e pectinase), após emprego de delineamento composto central rotacional (DCCR)	169

1 INTRODUÇÃO

O cenário global da sociedade contemporânea marcado em grande parte pelo sistema capitalista, vem ao longo dos tempos estimulando a produção e consumo desenfreados. Isso tem demandado um enorme aporte de recursos naturais e dispendido no ambiente uma grande quantidade de rejeitos e energia, que devido à sua constituição e/ou alta carga emitida, demoram a ser transformados e reutilizados naturalmente. Tal situação gera desordens e impactos negativos ao meio ambiente, além da escassez de recursos, má qualidade de vida, disputas sociais, problemas de saúde pública, dentre outros.

Essa degradação ambiental, iniciada em particular no século XVIII, decorrente da Revolução Industrial, e acentuada nos anos seguintes, especialmente a partir do século XX com o advento da globalização, têm suscitado na humanidade um clamor por soluções que visem congregar o paradoxo do desenvolvimento social e econômico associado à conservação e proteção da vida e do ambiente, de modo a dar um direcionamento mais sustentável à sociedade (ONU, 2015; LAMPKOWSKI; LAMPKOWSKI, 2016).

O setor agroindustrial, pautado principalmente na produção alimentícia, atua como um dos mais importantes pilares econômicos do Brasil (MOREIRA, 2016), gerando por consequência grandes quantidades de “resíduos” de biomassa que se não forem adequadamente manejados e/ou aproveitados podem trazer prejuízos em termos ambientais.

Dentre as distintas aplicações desses subprodutos agrícolas e agroindustriais destacam-se o emprego para a alimentação humana e animal; como matéria prima em uma gama variada de indústrias; ou como substrato para o cultivo de micro-organismos e consequente produção de biomassa celular, bioprodutos e energia, que apresentam nesse caso, um maior valor agregado (SILVA et al., 2019). Tal aplicação se dá especialmente porque essas sobras agrícolas ou do beneficiamento industrial, ainda apresentam energia potencial metabolizável e nutrientes, que podem ser convertidos biologicamente (DE TONISSI E BUSCHINELLI DE GOES et al., 2016; PANDA et al., 2016).

Segundo Hartung (2020), faz-se necessário esforços articulados que mobilizem de forma compartilhada a sociedade com vistas a se transformar a maneira de fazer

negócios, consumir, construir e viver, inserindo-se assim no ciclo virtuoso da bioeconomia.

Nesse sentido, a busca por processos mais sustentáveis nos diferentes setores econômicos da sociedade e em específico na agricultura e cadeia agroindustrial, tem sido abordada de maneira mais estratégica ultimamente, tornando os impactos advindos da sustentabilidade mais visíveis e fáceis de serem administrados, com reflexos mais palpáveis em diversos setores (MOREIRA, 2016).

Estudos recentes vêm mostrando os benefícios de se aliar e aproveitar de forma sustentável da biodiversidade e dos serviços ecossistêmicos por ela fornecidos direta e indiretamente (SILVA; VASCONCELLOS, 2018; VASCONCELLOS; BELTRÃO, 2018; JOLY et al., 2019; MARTINHO et al., 2019; PARON et al., 2019). Dentre tais serviços, pode-se destacar a bioconversão de sobras das culturas agrícolas por micro-organismos, especialmente fungos, em outros produtos e/ou energia. Saad et al. (2017), por exemplo, evidenciaram satisfatória eficiência biológica (produtividade) de conversão da palha de milho (mais de 47%) em massa micelial fresca por *Ganoderma lucidum*, um cogumelo potencialmente funcional e com propriedades medicinais. Já, Santos-Rocha et al. (2017) obtiveram eficiências fermentativas de conversão da biomassa da palha e sabugo de milho pré-tratados hidrotermicamente, em etanol de segunda geração em valores aproximados de 87,5% e 86,9%, respectivamente.

Uma outra frente de estudos que se destaca é o aproveitamento das sobras agroindustriais como substrato para cultivo microbiano e consequente produção de enzimas de interesse comercial. Tal fato relaciona-se não somente com a busca atual por processos mais sustentáveis; e a versatilidade bioquímico-metabólica dos micro-organismos, que possibilita otimizar a produção desses bioprodutos (ABDULLAH et al., 2018); mas também pelo crescimento do mercado mundial de catalisadores biológicos. De acordo com pesquisa realizada pela BCC Research (2018), o mercado global de enzimas foi avaliado em 4,58 bilhões de dólares no ano de 2016, devendo atingir 7,48 bilhões em 2025, com o aumento da demanda de enzimas derivadas naturalmente.

Dentre as distintas alternativas de obtenção de enzimas fúngicas, o emprego do cultivo de micro-organismos em estado sólido (CES), apresenta-se como uma técnica economicamente menos onerosa e de mais fácil realização (SANTI; BERGER;

SILVA, 2014; SANTOS P. et al., 2018), quando comparado à extração obtida de macerados celulares e/ou teciduais de vegetais e animais.

Têm-se notado que a bioprospecção de enzimas e/ou coquetéis enzimáticos advindos do metabolismo microbiano sobre as sobras agroindustriais podem promover melhorias de rendimento, qualidade e redução de custos e energia, em meio ao desenvolvimento de processos e/ou elaboração de produtos.

No rol de enzimas produzidas por atividade microbiana e empregadas comercialmente, encontram-se dentre outras, as amilases e pectinases. Segundo Mukesh Kumar et al. (2012) e Oliveira et al. (2015), essas biomoléculas correspondem juntas de 10 a 33% do mercado internacional de catalisadores biológicos, tendo uma ampla aplicação em diferentes setores da atividade humana, sejam em processos e/ou produtos da área alimentícia, bebidas, têxtil, química, entre outros (POLIZELI; SILVA, 2016; AMIN; BHATTI; BILAL, 2019).

Em estudo sistematizado de revisão da literatura com relação à produção de enzimas microbianas sob cultivo em estado sólido empregando diferentes subprodutos agroindustriais, Santos P. et al. (2018) observaram que 49% das pesquisas publicadas sobre o assunto são brasileiras, tendo como principal enfoque a produção de celulasas; como agente biológico mais utilizado o fungo *Aspergillus niger*; e como resíduos mais empregados, o farelo de trigo e sobras da fruticultura. Dado esse contexto, faz-se necessário estudar a atividade de outros micro-organismos sobre substratos alternativos, de modo a se ampliar as potencialidades de obtenção de distintas enzimas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Produção agrícola/agroindustrial, bioeconomia e desenvolvimento sustentável

Os desafios econômicos impostos às sociedades atuais estão atrelados a diferentes fatores sejam eles ambientais, sociais ou financeiros, que podem levar à instabilidade de setores produtivos individuais ou mesmo de economias inteiras. A interconexão global existente na natureza e mesmo aquela realizada pelo homem por meio da globalização, trazem benefícios como expansão de mercados, acesso à informação e tecnologia, entre outros; mas também podem incorrer em desvantagens como empobrecimento de uma grande parcela da sociedade, problemas ambientais e de saúde pública, como por exemplo a atual pandemia da Síndrome Respiratória Aguda Grave de Coronavírus 2 (SARS-CoV-2) (FERREIRA, 2017; GEISSDOERFER et al., 2017; DINIZ et al., 2020).

O panorama mundial das pesquisas mostra que uma das formas de se mitigar as crises econômico-sócio-ambientais da atualidade perspassa pela inserção e imersão dos países e seus sistemas políticos, em projetos, programas e ações associados ao desenvolvimento sustentável (THORSTENSEN; MOTA, 2018). Tal cenário exige uma observação de todas as facetas dos problemas e o engajamento de todos os atores sociais, incluindo governos, sociedade civil, organizações não-governamentais, setor privado, industrial e de pesquisa (GEISSDOERFER et al., 2017).

O Brasil apresentou nos últimos anos, queda no *ranking* no Índice de Desempenho Ambiental (Environmental Performance Index - EPI) passando da 46ª posição em 2016 (HSU et al., 2016) para a 69ª posição em 2018 (EPI, 2018). Tais indicadores do EPI medem a proximidade do país ao cumprimento de metas estabelecidas internacionalmente quanto à proteção da saúde humana e proteção dos ecossistemas. No que tange ao setor agrícola e agroindustrial, o volume agroprodutivo exerce impactos significativos na sustentabilidade do país (NEVES; SALGADO; SANTOS, 2017), especialmente se não for adequadamente manejado. Conforme relatório emitido pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, a agricultura foi uma das atividades humanas que mais demandou água em 2017 (IBGE, 2017).

Um outro fator que influi no desempenho ambiental do setor agroindustrial brasileiro é a grande quantidade de subprodutos gerados anualmente e provenientes de diferentes culturas e processos industriais. Conforme Moraes et al. (2017), é estimado que a quantidade de biomassa produzida no Brasil possa atingir aproximadamente 1 Gt em 2030. Para tais autores, as sobras geradas, incluindo também aquelas do processamento, ainda são subutilizadas, sendo dispostas de forma inadequada no solo, gerando além de desperdícios de nutrientes e energia, passivos ambientais de significativo impacto.

Nascimento Filho e Franco (2015) relatam que os subprodutos gerados são provenientes de diversas etapas da cadeia produtiva, havendo estimativas de que cerca de 70% da biomassa vegetal é realmente aproveitada e em torno 30% é rejeitada. Dentre os diferentes motivos associados a tal desperdício estão a grande oferta de matéria prima vegetal disponível no país; o desenvolvimento ainda incipiente e pouco difundido de tecnologias de aproveitamento; a pseudo impressão empresarial de que os subprodutos são considerados custos operacionais adicionais à empresa/indústria; o baixo investimento em pesquisas sobre o assunto e políticas governamentais internas que estimulem esse setor.

Devido à riqueza em nutrientes e energia apresentada por muitos dos subprodutos (casca, bagaço, polpa, sementes, caroços, folhas, talos e hastes) da biomassa vegetal (SARAIVA et al., 2018), vários estudos tem ganhado notoriedade e investimentos recentes em diferentes países (NASCIMENTO FILHO; FRANCO, 2015). Os subprodutos têm sido aproveitados na elaboração de alimentos, produtos e utensílios humanos; como ração para animais de criação; abubos e fertilizantes; na produção de biocombustível e elaboração fermentativa de bioprodutos; entre outros (PENHA et al., 2016; CARVALHO et al., 2016; CRUZ; PEREIRA; FIGUEIREIDO, 2017; SANTOS C. et al., 2018; BARROS et al., 2019; DIAS; REIS, 2019), possibilitando agregar valor a cadeia produtiva (NWACHUKWU et al., 2016).

As discussões científicas sobre a adoção de práticas sustentáveis no setor agroindustrial crescem em diversas atividades e regiões do Brasil, como comprova um estudo exploratório de levantamento da produção científica brasileira sobre o assunto realizada por Zanella e Lago (2016). De acordo com as autoras, em geral a adoção de ações sustentáveis são incorporadas em decorrência de exigências legais, ou necessidade da obtenção de certificações, mas algumas organizações produtivas

já utilizam tais práticas com um caráter estratégico em suas metas mercadológicas e tecnológicas, transformando-as em oportunidades de negócios.

A sustentabilidade nos mais variados segmentos econômicos tem se tornado cada vez mais necessária visando um desenvolvimento ecologicamente correto, que proporcione melhor qualidade de vida à sociedade, sem contudo deixar a lucratividade financeira dos negócios. A sociedade vem se conscientizando a cada dia da necessidade de se adotar alternativas e estratégias sustentáveis, que possam ao mesmo tempo elevar os níveis produtivos e otimizar o uso dos recursos naturais, de modo a atender as necessidades da geração atual, sem contudo, esquecer das gerações futuras e promover danos irreparáveis ao meio ambiente (SILVA, 2012; TORRES et al., 2014; SILVA; MEGALE, 2020).

Nesse sentido, a bioeconomia tem se mostrado como uma solução plausível para que a escassez de recursos naturais se equilibre diante ao consumo, e a produção dos bens, os quais dependem desses recursos (LAMPKOWSKI; LAMPKOWSKI, 2016). Para Moreira (2016), o conceito de bioeconomia sempre esteve inserido no setor agrícola e agroindustrial, mas só recentemente vem sendo abordado de maneira mais estratégica.

Estima-se que até 2030 a população global creça 16% saindo dos 7,3 bilhões de habitantes em 2015, para 8,5 bilhões (UNITED NATIONS, 2017). Projeções indicam que a extração de recursos da natureza pode aumentar 119% de 2015 para 2050, com um crescimento nas emissões dos gases estufa de até 41% (HATFIELD-DODDS et al., 2017).

Aliado a esse aumento populacional, demandas e desafios que possam agregar o desenvolvimento pautado em um modelo que permita reduzir a poluição, conservar e otimizar o uso dos recursos naturais, e preservar a biodiversidade, têm sido buscados. Para Aquilani et al. (2018) é preciso que os países adotem sistemas econômicos mais sustentáveis, capazes de garantir a produção e consumo mais limpos e seguros, com base em inovação e tecnologia, reduzindo, reciclando e reutilizando os recursos. E para isso, uma das alternativas de se materializar esse novo paradigma seria abrir-se ao modelo de desenvolvimento pautado na Bioeconomia (EL-CHICHAKLI et al., 2016; IPEA, 2017).

Conforme Silva, Pereira e Martins (2018), não há um consenso sobre a definição conceitual de bioeconomia, pois ela tem evoluído e variado conforme os autores e países, entretanto existem elementos convergentes entre as diferentes

definições, que são: as origens em atividades primárias; enfoque transversal; e ênfase na produção com emprego de tecnologias avançadas de conversão de produtos. Para os autores a produção e comercialização de produtos têxteis naturais, bem como, cervejas, vinhos e queijos foram os primeiros indícios tradicionais, que têm sido aprimorados com o tempo, e vêm constituindo a bioeconomia moderna.

A Organisation for Economic Co-operation and Development – OECD, definiu o termo bioeconomia, como uma atividade onde a biotecnologia está atrelada à produção econômica, envolvendo desenvolvimento sustentável, biomassa renovável e integração e aplicação desses setores (OECD, 2009). Membros do Conselho de Pesquisa em Tecnologia e Bioeconomia da Alemanha, definiram essa atividade econômica como a área que engloba todos os setores e serviços que produzem, processam ou utilizam quaisquer recursos biológicos renováveis, independente de sua forma (HÜNTTL et al., 2011).

De acordo com a Comissão Europeia, a bioeconomia baseia-se na produção de alimentos, rações, produtos de base biológica e bioenergia, empregando-se recursos renováveis, bem como resíduos dos processos produtivos de transformação; tendo como viés constitutivo os bioprocessos de conversão de biomassa, a biotecnologia e os distintos produtos (vacinas, medicamentos, enzimas, etc.) por ela gerados, assim como os processos e serviços associados à sua aplicação na saúde, indústria e meio ambiente (EUROPEAN COMMISSION, 2012).

Para várias agências e departamentos governamentais dos Estados Unidos (DOE et al.; 2016), a definição de bioeconomia tem por base a substituição de recursos fósseis por fontes de biomassa, assim como o uso de ferramentas da biotecnologia, que possam gerar energia e produtos sustentáveis, promovendo benefícios economico-socioambientais e de segurança nacional.

Segundo Parisi e Ronzon (2016), a bioeconomia no Canadá é definida como atividade associada à invenção, desenvolvimento e uso de processos e produtos baseados em recursos biológicos, incluindo diferentes setores da atividade humana.

Na França a bioeconomia foi definida como o conjunto de atividades associadas à produção, uso e transformação de biorecursos de forma sustentável, visando atender as necessidades da sociedade no que tange a materiais, energia e alimentação (FRANÇA, 2017).

Conforme a Confederação Nacional da Indústria (CNI) do Brasil, a bioeconomia é o resultado e uma revolução de inovações no campo das Ciências Biológicas,

estando atrelada à invenção, desenvolvimento e uso de produtos e processos biológicos em diferentes setores da atividade humana, com destaque para a biotecnologia industrial (produção e processos químicos/enzimáticos; aplicações ambientais e biocombustíveis), produção primária (melhoramento de plantas e animais e aplicações veterinárias) e saúde humana (terapêutica, farmacologia, alimentos funcionais e equipamentos médicos) (CNI, 2013).

De acordo com Silva, Pereira e Martins (2018), as diferentes definições de bioeconomia empregam tanto processos produtivos baseados em conhecimentos tradicionais, quanto processos baseados no uso intensivo de novos conhecimentos científicos e tecnológicos derivados da Biologia, sejam eles da biotecnologia moderna, genômica, biologia sintética, bioinformática e engenharia genética.

As bases da bioeconomia atual, que vêm gradativamente sendo adotadas em vários países, na elaboração de programas fundamentados no uso sustentável dos recursos biológicos, remontam aos eventos e sistemas de produção que marcaram o século XX, baseados na dependência de recursos não renováveis, tal como o petróleo, que acabaram por promover desordens e problemas sócio-ambientais ao longo do tempo (BIBER-FREUDENBERGER et al., 2018). Nesse sentido, a bioeconomia surge como alternativa que visa transformar o conhecimento em desenvolvimento industrial sustentável em áreas ligadas ao manejo e aproveitamento de recursos biológicos, visando integrar setores e solucionar déficits sócioeconômicos (MOREIRA, 2016; RONZON; M'BAREK, 2018).

Sabe-se que o aspecto central para a propulsão da bioeconomia é uso e aplicação da biotecnologia em suas distintas vertentes. Estudo prospectivo realizado pela OECD, em 2009, já estimava que até 2030, a contribuição global da biotecnologia poderá atingir 1 trilhão de dólares por ano, distribuídos no setor da saúde (US\$ 260 bilhões/ano), produção primária (US\$ 380 bilhões/ano) e industrial (US\$ 420 bilhões/ano). De acordo com Moreira (2016), governos de países como Estados Unidos, Canadá, Alemanha, Rússia, Austrália, Grã-Bretanha e Finlândia já adotam propagandas estritamente alinhados à bioeconomia, direcionando políticas e incentivos ao uso de fontes não renováveis, de modo a estimular o crescimento econômico e dos empregos, mas ao mesmo tempo contribuir com soluções aos problemas ambientais. Para Morrisson e Golden (2015), não somente o setor público tem reafirmado o compromisso com o uso de insumos biológicos, mas várias empresas do setor privado têm aderido a tal modelo econômico mais sustentável.

Ressalta-se aqui, a necessidade e importância que os países desenvolvidos têm em auxiliar e estimular os países subdesenvolvidos e/ou em desenvolvimento, a adotarem tais medidas, visando contribuir com a melhor qualidade ambiental e sócio-econômica global. Em 2001, na Conferência das Nações Unidas sobre Comércio e Desenvolvimento já se pontuava a importância da maior participação dos países em desenvolvimento na bioeconomia, especialmente porque como tais países tem como base produtiva recursos naturais, eles podem beneficiar-se do uso da biotecnologia (JUMA; KONDE, 2001).

A bioeconomia no Brasil é bem exemplificada em projetos que envolvem o uso de enzimas e micro-organismos em processos fermentativos para produção de alimentos, aromas e ingredientes funcionais; produção de plantas com conteúdo proteico de alto valor biológico; redução de perdas em processo e distribuição; bem como no aproveitamento de subprodutos para o desenvolvimento de novas frações e de produtos de maior valor agregado (MOREIRA, 2016).

Para Dias e Carvalho (2017), o Brasil configura-se como um dos principais atores nesse novo cenário que envolve a bioeconomia, não somente porque possui uma enorme biodiversidade ainda pouco conhecida, e menores custos na produção de biomassa, como também aptidões agropecuárias e conhecimentos em processos agroindustriais relacionados especialmente à bioenergia. Além disso, é constatado uma intensificação de iniciativas para se estruturar conselhos e plataformas conceituais que fomentem projetos de pesquisa e trabalhos envolvendo Bioeconomia (MOREIRA, 2016).

Dentre os diferentes estímulos de incentivo ao desenvolvimento nacional da Bioeconomia, pode-se citar o Programa de Apoio à Inovação dos Setores Sucroenergético e Sucroquímico (PAISS), lançado em 2010, que visava selecionar planos de negócio e fomento a projetos que tivessem como foco o desenvolvimento, produção e comercialização de novas tecnologias industriais destinadas ao processamento da biomassa oriunda principalmente da cana-de-açúcar (MOREIRA, 2016).

Em 2011, a CNI lançou uma agenda para estimular a inovação no Brasil, pautada na biotecnologia e biodiversidade. No ano seguinte, foi realizado o primeiro fórum de Bioeconomia, seguida pelo segundo fórum em 2013, o qual gerou um relatório que visou identificar as oportunidades e entraves, além de validar o potencial de expansão do segmento no país (CNI, 2013).

Outros eventos e ações de incentivos foram acontecendo ao longo dos anos, até mesmo em níveis da educação básica, tecnológica, superior e de pesquisa, podendo-se destacar mais recentemente, em 2019, a Semana Nacional de Ciência e Tecnologia (SNCT), com temática voltada a Bioeconomia (MCTIC, 2019).

Em 2013, uma pesquisa realizada pela HBR Brasil em parceria CNI conduziu o primeiro levantamento sobre a bioeconomia no Brasil, com 369 especialistas, executivos, interessados no assunto e pessoas que não tinham conhecimento sobre o tema. A pesquisa teve o objetivo de analisar o estágio de maturidade do país em relação não só ao entendimento e conhecimento sobre o assunto, como também o nível potencial de crescimento nacional nessa área. Na época foi verificado que 70% dos entrevistados mencionaram que o tema não fazia parte das discussões e iniciativas das instituições nas quais os mesmos estavam inseridos. Entretanto, os entrevistados mencionaram, dentre outros aspectos, nunca escala de 1 (pouco importante) a 5 (muito importante), que os conhecimentos advindos da biorrefinarias (42%) e bioquímica (26%) seriam de grande importância para contribuir com a Bioeconomia no Brasil nos cinco anos seguintes (CNI, 2013).

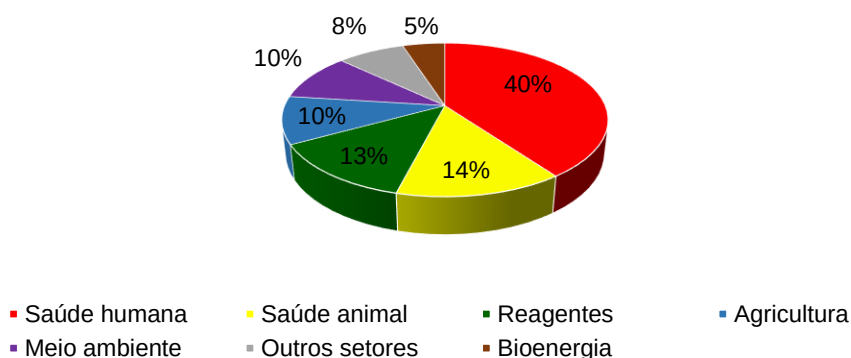
Silva, Pereira e Martins (2018) verificaram em 2016, que as vendas de produtos atribuíveis à bioeconomia brasileira no mundo atingiram um valor em torno de US\$ 326,1 bilhões, sendo os setores da agropecuária, produtos alimentícios e bebidas, os que mais contribuíram nessa participação (73%). É interessante ressaltar que os autores da pesquisa mencionam que os subprodutos do setor primário e urbano não foram considerados nas estimativas para se contabilizar o valor da bioeconomia, mas que pesquisas futuras que incluam a atribuição dos mesmos seriam potencialmente importantes.

No âmbito do setor primário e de agronegócios o Brasil tem uma oportunidade ímpar de participar de maneira ainda mais significativa na bioeconomia, haja visto ser o quinto maior país do mundo em extensão territorial; possuir 13,7% da reserva de água doce do planeta; estar localizado numa região tropical privilegiada com alta incidência solar e regime pluviométrico adequado (CNI, 2013).

Empresas das áreas de agricultura, energia e meio ambiente que empregam biotecnologia e/ou processos biotecnológicos no Brasil, estão em franco crescimento. Por exemplo, uma pesquisa realizada em 2011, pelo Centro Brasileiro de Análise e Planejamento (CEBRAP) em parceria com a Associação Brasileira de Biotecnologia (BrBiotec), evidenciou que 25% das empresas dessas áreas (Figura 1), de um total

de 237 mapeadas tinham a biotecnologia como atividade principal, e/ou desenvolviam projetos empregando-a (CEBRAP, 2011).

Figura 1 – Percentual de empresas de biotecnologia no Brasil por área de atuação em 2011.



Fonte: Cebrap (2011). Elaborado pelo autor.

Um dos principais desafios do desenvolvimento da bioeconomia no Brasil perpassa pelo investimento em conhecimento, pesquisas, formação de recursos humanos e estruturação das biorrefinarias (SILVA; PEREIRA; MARTINS, 2018). Segundo Scarlat et al. (2015) as biorrefinarias são as unidades industriais potencialmente capazes de materializar uma desejada abordagem integrada e associada aos interesses almejados na Bioeconomia. Tais unidades baseiam-se na conversão da biomassa em bioenergia e bioprodutos, entretanto na América do Sul, a maioria das biorrefinarias ainda são de primeira geração, trabalhando com açúcares provenientes da soja e da cana-de-açúcar, estando as plantas processadoras de subprodutos agroindustriais ainda em fase inicial de implementação (NGUYEN et al., 2017; HASSAN; WILLIAMS; JAISWAL, 2019).

2.2 Diversidade fúngica no Cerrado

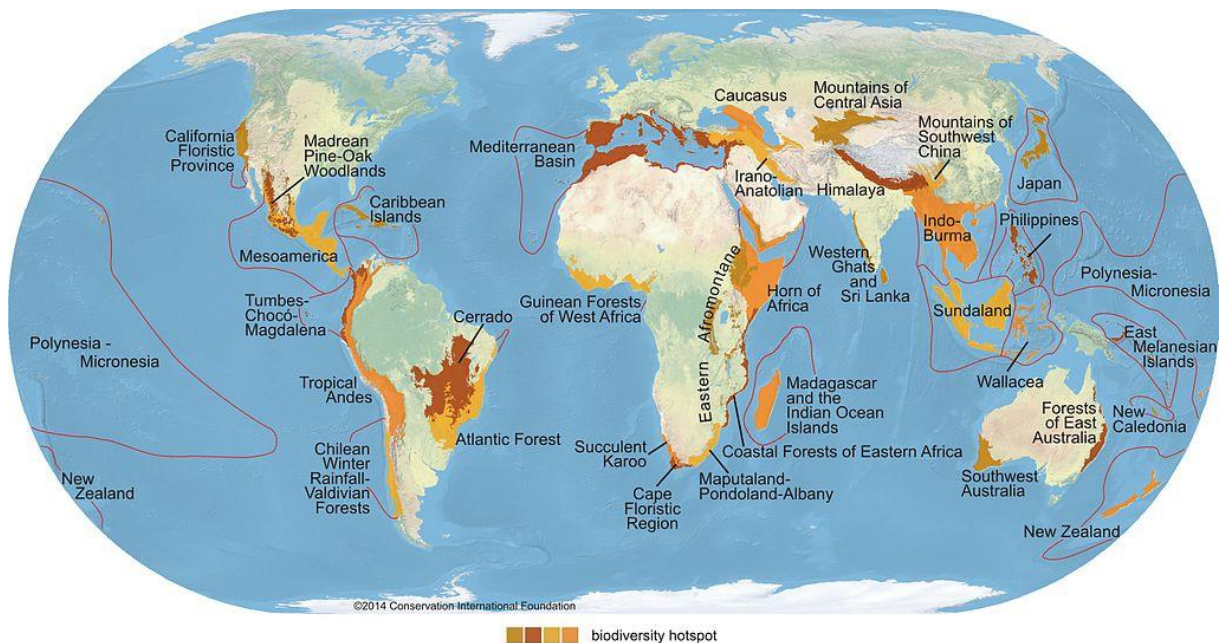
Sabe-se que o Cerrado é uma região biogeográfica reconhecida pela comunidade científica, juntamente a outros *habitats* naturais, como *hotspots* ecológicos, isto é, ambientes que apresentam uma enorme quantidade e variedade de organismos, especialmente endêmicos, mas ameaçados de destruição. A alta biodiversidade desse bioma savânico não se resume somente à riqueza e abundância

de espécies vegetais e animais, mas também a diversidade da microbiota, da qual muito pouco ainda se conhece.

O Cerrado é considerado o maior *hotspot* do hemisfério ocidental, e a savana tropical mais biodiversa do mundo (SAWYER et al., 2016), com uma extensão aproximada de 2 milhões de km², sendo que cerca de 99,3% de sua área está no Brasil, e o restante em partes dos territórios da Bolívia e Paraguai (Figura 2). Nele também estão presentes as três maiores nascentes de bacias hidrográficas da América do Sul: Amazonas/Tocantins, São Francisco e Prata.

Essa alta biodiversidade do bioma, consequente de inúmeros processos evolutivos pelo qual o mesmo passou e tem passado, propicia a existência de organismos com distintas capacidades biológicas, que permitem em primeira instância sua adaptação ao ambiente, mas que podem ser aproveitadas em segunda instância como produtos, processos ou serviços pelos seres humanos. Dessa forma, de acordo Souza et al. (2017) estudos que visem bioprospectar tais agentes são particularmente importantes.

Figura 2 – Mapa dos *hotspots* de biodiversidade da Terra, incluindo o Cerrado.



Conservation International (conservation.org) defines 35 biodiversity hotspots — extraordinary places that harbor vast numbers of plant and animal species found nowhere else. All are heavily threatened by habitat loss and degradation, making their conservation crucial to protecting nature for the benefit of all life on Earth.

Fonte: Conservation International (2014).

2.2.1 Alguns espécimes relatados nos últimos anos

A diversidade fúngica brasileira até meados de 2010, estava descrita em poucas listas de espécies e em algumas publicações taxonômicas e ecológicas esparsas. Por meio da classificação pautada na análise filogenética e com a publicação *on-line* do Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil, tem sido possível agregar o conhecimento disperso, acelerando a descoberta de novos gêneros e espécies. Por exemplo, o incremento de novas espécies catalogadas no Cerrado, cresceu 45,6% de 2010 para 2015 (MAIA, et al. 2015).

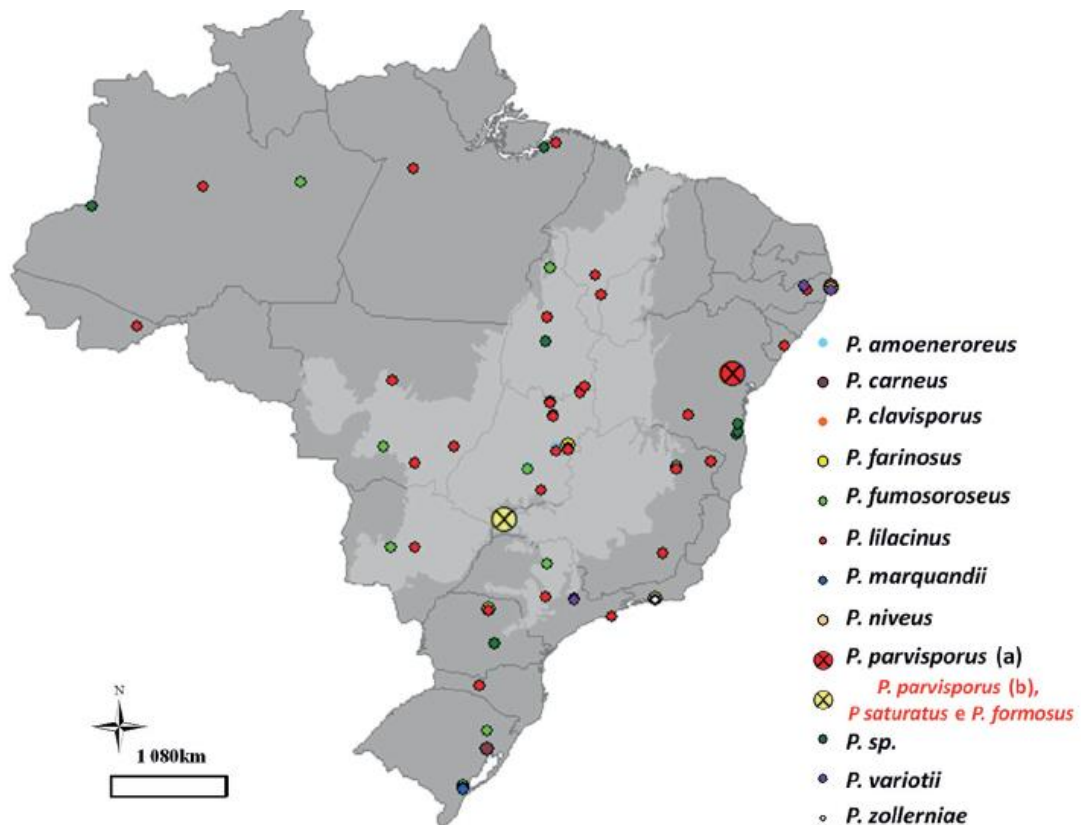
Em pesquisa realizada por Castro (2015), em Brasília, visando determinar a micodiversidade associada a ramos e folhas de *Copaifera langsdorffii* (copaíba), uma planta leguminosa que apresenta distribuição concentrada nos biomas Amazônico e do Cerrado, sete fungos pertencentes ao grupo dos Ascomycetos e Celomicetos foram relatados pela primeira vez para a hospedeira em questão. Desses, cinco (*Stigmopeltis* sp., *Geastrumia* sp., *Metathyriella* sp., *Treubiomyces* sp. e *Leptosphaeria* sp.) são prováveis espécies novas, e dois, possíveis novos gêneros, segundo o autor.

Lopes et al. (2016), utilizaram bagaço de cana proveniente de usina de álcool e açúcar localizada na região centro-sul do Cerrado (Goiás - GO), na tentativa de se isolar e identificar linhagens fúngicas com potencial aplicação na indústria do bioetanol. Empregando identificação fenotípica clássica e métodos moleculares, os autores identificaram 20 espécies, sendo três delas pertencentes ao gênero *Paecilomyces*: *P. formosus*, *P. saturatus* e *P. parvisporus*. Foi verificado, por meio de consulta à base de dados *speciesLink* (<http://www.splink.org.br>), que *P. parvisporus* e *P. formosus*, isolados e identificados no trabalho, foram os primeiros relatos científicos formais de ocorrência das espécies em território brasileiro. Além disso, a ocorrência de *P. saturatus* é citada pela primeira vez dentro do domínio do cerrado (Figura 3). Ressalta-se que a presença de *Paecilomyces* sp. em fontes lignocelulósicas evidencia a capacidade bioconversora desses fungos sobre açúcares complexos como a celulose (BASSO; GALLO; BASSO, 2010).

Outro estudo exploratório feito no Cerrado, ao longo de três décadas, visando identificar fungos micorrízicos arbusculares (FMA) da classe *Glomeromycota*, encontrou 92 espécies, das quais sete (*Acaulospora reducta*, *Ambispora brasilienses*, *Cetraspora auronigra*, *Dentiscutata cerradensis*, *D. scutata*, *Paraglomus brasilianum*

e *Racocetra verrucosa*) apresentaram o primeiro registro para a área savânica, sendo *A. brasilienses* e *C. auronigra*, reportadas exclusivamente na região fitofisionômica campos rupestres (JOBIM; OLIVEIRA; GOTO, 2016).

Figura 3 - Distribuição geográfica de espécies de *Paecilomyces* no Brasil, inferida a partir de dados recuperados da base *speciesLink*.



O círculo vermelho destaca a ocorrência de *Paecilomyces parvisporus* Y. F. Han & Z. Q. Liang na Bahia e o círculo amarelo refere-se às coordenadas de amostragem das espécies identificadas por Lopes et al. (2016).

Fonte: Lopes et al. (2016).

Coletas realizadas por Alvarenga, Naves e Xavier-Santos (2015), ao longo de 14 anos (2001 a 2014), em diferentes áreas do estado de Goiás, reportaram e ampliaram o conhecimento da ocorrência do basiomiceto *Auricularia*, no Brasil. Das 101 amostras examinadas, 54% foram representadas pela espécie *A. nigricans*, 20% *A. fuscossuccinea*, 13% *A. mesenterica*, 12% *A. delicata* (Figura 4). Conforme os autores esses são os primeiros registros de *A. fuscossuccinea*, *A. mesenterica* e *A. delicata* para o estado de Goiás e de *A. delicata* para o Distrito Federal.

Figura 4 - Basidiomas de *Auricularia nigricans* (a), *A. fuscosuccinea* (b), *A. mesenterica* (c) e *A. delicata* (d).



Fonte: Adaptado de Alvarenga, Naves e Xavier-Santos (2015). Barras de escala: a = 3 cm; b = 1 cm; c = 3 cm; d = 2 cm.

Em outro estudo também realizado em regiões de cerrado do estado de Goiás, entre 2008 a 2014, Alvarenga e Xavier-Santos (2017), citaram a ocorrência de Basidiomicetos gelatinosos que possuem atividade celulásica semelhante a fungos altamente hidrolíticos pertencentes a antiga ordem *Aphylllophorales*. Dentre eles, foi identificado *Calocera cornea*, como primeira e única citação em 40 anos, para a capital brasileira, e segundo registro para o bioma Cerrado. Além disso, *Dacrymyces chrysospermus*, *Dacryopinax elegans*, *D. maxidorii*, *D. spathularia* foram identificados como primeiras citações para o Cerrado e região Centro-Oeste do Brasil.

Calaça et al. (2018), registraram pela primeira vez no Cerrado, o fungo basidiomiceto *Phlebopus beniensis*, em coletas realizadas durante período chuvoso em Anápolis (GO) e Rio Quente (GO) (Figura 5a). Os autores ainda relataram a micofagia de larvas de insetos sobre o fungo (Figura 5b), algo pouco conhecido no Brasil e com alguns registros esparsos. Segundo Yamashita et al. (2015), a fonte nutritiva ofertada pelos fungos pode contribuir para estruturar a redes alimentares das comunidades de insetos, tornando-se componentes chave para a manutenção dos ecossistemas.

Figura 5 - Basidioma fresco de *Phlebopus beniensis* (a) e detalhe da micofagia por larvas de inseto (b).



Fonte: Adaptado de Calaça et al. (2018). Barras de escala: a = 2 cm; b = 2 cm.

Alguns levantamentos bibliográficos têm mostrado que ainda são poucas as descobertas relativas a enorme diversidade fúngica existente no Cerrado. Rivas e Niveiro (2019), realizaram um levantamento de fungos agaricoides, citados no Paraguai, entre 1883 a 2017, por meio de *checklist* nos bancos de dados *Mycobank* (www.mycobank.org) e *Index Fungorum* (www.indexfungorum.org), e verificaram poucos registros de identificação de espécies nas regiões biogeográficas de Chaco, Pantanal e Cerrado, demonstrando ainda a baixa exploração científica de tais fungos nessas respectivas áreas. Levantamento bibliográfico realizado por Alvarenga e Xavier-Santos (2015), sobre a distribuição de fungos gelatinosos (*Agaricomycotina: Basidiomycota*) nos estados brasileiros, também corrobora a necessidade de estudos prospectivos e taxonômicos sobre o grupo, haja visto que em 40% dos estados da

federação não há ocorrência, e a maioria das espécies é representada por um único registro.

Nesse cenário, nota-se que o bioma Cerrado apresenta enormes potencialidades de albergar distintas espécies fúngicas úteis ao aproveitamento humano, seja contribuindo com a reciclagem de nutrientes, fornecendo substâncias farmacológicas, atuando como matéria prima alimentar, ou mesmo como bioindicador de qualidade ambiental, entre outras funções.

2.2.2 Algumas potenciais aplicações biotecnológicas e ameaças à diversidade fúngica

Apesar dos distintos serviços ecossistêmicos oferecidos pelo bioma Cerrado, como por exemplo: abastecimento hídrico; alimentos e matérias primas de valor econômico; recursos genéticos; sequestro e armazenamento de gás carbônico (CO₂) atmosférico; turismo e lazer; substâncias farmacológicas e bioprodutos derivados de plantas e outros organismos (VERDE et al., 2016; MAMEDE et al., 2017; SANTOS, 2018; FARINHA et al., 2019), observa-se que sua área vem sofrendo constantes alterações, consequentes principalmente da urbanização, agricultura e pecuária desenfreadas. Tais alterações têm propiciado a redução e/ou mesmo a perda das riquezas genéticas e de biodiversidade, especialmente aquelas com potencial farmacológico e tecnológico destinados ao tratamento de doenças e/ou aplicações biotecnológicas, como por exemplo micro-organismos e seus biocompostos derivados (SAWYER et al., 2016).

Um estudo recente realizado por Jacinto, Moura e Uto (2018), em diferentes áreas de cerrado (nativo, de cultivo agrícola e de reserva ambiental urbana/reflorestamento) visando determinar o grau da antropidade do solo sobre a biomassa de bactérias e fungos, evidencia os impactos que o bioma tem sofrido. Eles verificaram contagens significativamente distintas ($p < 0,05$) de bactérias em unidades formadoras de colônia por grama (UFC g⁻¹) de solo, em valores de $4,2 \times 10^5$, $1,1 \times 10^5$ e $1,8 \times 10^5$, respectivamente, nos solos das áreas de cerrado nativo, cultivo agrícola e reflorestamento. As contagens fúngicas (UFC g⁻¹) também foram significativamente distintas, 9×10^4 (área nativa), 3×10^4 (cultivo agrícola) e $6,6 \times 10^3$ (reflorestamento), mas com valores inferiores à população bacteriana, indicando segundo os autores, a maior sensibilidade dos fungos à atividade antrópica.

Valadares-Pereira et al. (2017) também evidenciaram mudanças na comunidade fúngica em solo do cerrado tocantinense, ao comparar uma área nativa com outra destinada ao plantio de soja. Analisando o ácido desoxirribonucleico (DNA) do solo, por meio de Análise Espacial Intergênica Ribossomal Automatizada (ARISA), e comparando os resultados aos teores de cobre, cálcio, ferro, capacidade de troca de cátions, saturação por bases e relação cálcio/magnésio, de ambas as regiões, os pesquisadores observaram mudanças na estrutura da comunidade fúngica como efeito do manejo agrícola.

As alterações fitofisionômicas derivadas do desmatamento, que historicamente vêm assolando o bioma, podem promover mudanças na composição do solo e sua maior exposição aos raios solares, precipitando por exemplo, alterações físico-químicas na acidez e umidade, fatores esses essenciais à permanência e desenvolvimento da microbiota residente. Segundo Cavalcanti et al. (2010) projeções para o ano de 2040 indicam um cenário muito preocupante, com perda de área de mais de 753.776 km², o que corresponderia a 78% de destruição dos seus limites originais.

Dessa forma, estudar e entender a dinamicidade, funcionamento e interação dos micro-organismos existentes no Cerrado, e em especial nos solos dessa região, não só propicia um maior entendimento dos impactos ambientais e formas inadequadas de manejo que o bioma vem sofrendo (VALADARES-PEREIRA, et al.; 2017; NOVAK, et al., 2018), como também viabiliza a possibilidade de prospectar espécies com potenciais aplicações de interesse biotecnológico, por exemplo (NORILER et al., 2018).

Corroborando isso, Araujo et al. (2017) avaliaram a diversidade fúngica de uma área de cerrado preservado, na região nordeste do estado do Piauí, dentro do Parque Nacional das Sete Cidades, ao longo de distintos gradientes fitofisionômicos: formação campestre, cerrado *stricto sensu*, cerradão e floresta decidual (Figura 6). Os pesquisadores identificaram a maior riqueza de espécies na floresta decidual, sendo a maior porcentagem dos isolados pertencentes ao filo Ascomycota (45%), seguido do Basidiomycota (32%). Conforme os autores, as classes mais abundantes encontradas incluindo espécies com potencial biotecnológico foram: Agaricomycetes, Eurotiomycetes, Lecanoromycetes, Basidiobolus, Dothideomycetes e Taphrinomycetes.

Figura 6 – Tipos fitofisionômicos do Cerrado.



A área delimitada em vermelho representa o local de pesquisa realizado por Araujo et al. (2017).

Fonte: Ribeiro (2007).

Conforme Bononi et al. (2017), a diversidade de micro-organismos, e especialmente dos fungos presentes em regiões do Cerrado, ainda não é totalmente conhecida. Em coletas realizadas pelos pesquisadores, na região central do estado de Mato Grosso do Sul (MS), centro-oeste do Brasil, foram identificadas 18 espécies de fungos (*Conocybe crispa*, *Gymnopus dryophilus*, *Marasmius androsaceus*, *M. oreades*, *Mycena pura*, *Rhodocollybia butyraceae*, *Pleurotus eryngii*, *Coprinellus micaceus*, *Panaeolus rickenii*, *Hypholoma fasciculare*, *Clitocybe infundibuliformis*, *Tricholoma argyraceum*, *Fomitiporia robusta*, *Cymatoderma elegans*, *Athelopsis galzinii*, *Trametes ellipsospora*, *Guepinia helvelloides*, *Tremella mesenterica*) ainda não citadas e listadas nacionalmente, e 36 espécies com primeira citação para o estado. Do total de 62 espécies de basidiomicetos coletados, os autores identificaram 15 comestíveis, quatro tóxicas, 10 com propriedades medicinais, duas com potencialidade de aplicação em processos de biorremediação, e uma com propriedade bioluminescente, conforme comparações à literatura disponível.

Segundo Savi et al. (2018), plantas medicinais têm sido muito estudadas como reservatório de cepas de micro-organismos endofíticos com potencial biotecnológico. Nesse sentido, Noriler et al. (2018), estudaram comunidades fúngicas endofíticas associadas a folhas e pecíolos da planta medicinal *Stryphnodendron adstringens*, de ocorrência no Cerrado. Dentre os 117 morfotipos fúngicos (95,6% deles pertencentes ao filo Ascomycota) isolados pelos pesquisadores, cinco (*Diaporthe* sp. LGMF1530, *Diaporthe* cf. *heveae* LGMF1631, *Colletotrichum siamense* LGMF1604, *Fusarium* sp. LGMF1630 e *Epicoccum* sp. LGMF1641) apresentaram atividade inibitória (maior que 60%) sobre o crescimento micelial de *Phyllosticta citricarpa* (LGMF06) e

Colletotrichum abscissum (CA142), patógenos estes de grande importância na citricultura (CARSTENS et al., 2017; GUARNACCIA et al., 2017).

Isolados endofíticos também apresentaram efeito inibitório sobre patógenos de interesse clínico (NORILER et al., 2018), demonstrando as potencialidades biotecnológicas dos fungos encontrados, não só como alternativa ao controle biológico de fitopatógenos, como também de micro-organismos associados a saúde humana. *Phaeophleospora* sp.2 LGMF1513, *Epicoccum* sp.1 LGMF1598 e *Epicoccum* sp.2 LGMF1600 apresentaram alta atividade de ação (+++) contra *Staphylococcus aureus* (American Type Culture Collection - ATCC 33591) metilino-resistentes (MRSA). Alguns isolados fúngicos (*Diaporthe* sp. LGMF1548 e LGMF1614, *Diaporthe* cf. *heveae* LGMF1631, *Fusarium* sp. LGMF1630 e *Hypoxyton* sp.1 LGMF1613) se mostraram também ativos contra *S. aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Acinetobacter baumannii* (BACHAC-ABA) e *Klebsiella pneumoniae* (BACHC-KPC) produtora de carbapenemase (KPC).

Em um estudo realizado com *Miconia albicans* (Sw.) Triana (*Melastomataceae*), planta fanerógama endêmica do Cerrado, conhecida popularmente como “quaresmeira-branca”, Piza, Hokka e Sousa (2015) também isolaram e verificaram alta atividade antagonista do fungo actinomiceto *Amycolopsis orientalis* sobre *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Shigella sonnei*.

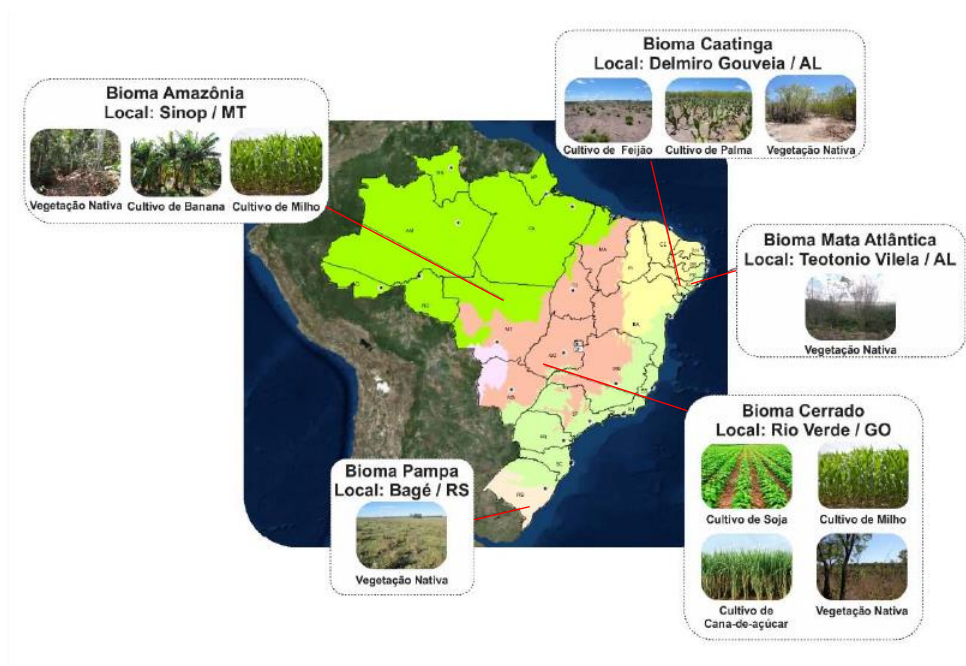
Alternativas de controle biológico de artrópodes-praga sobre culturas agrícolas, também vêm sendo muito aplicadas. Por exemplo, em sistemas agroflorestais da região neotropical, alguns organismos destacam-se como as principais pragas que assolam as culturas agrosilvícolas, sendo as formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, muito citadas. Tais formigas, conhecidas popularmente como saúvas e quenquês atacam as partes frescas das plantas e as carregam para o interior dos seus ninhos, onde servirão de substrato ao fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer (Basidiomycota: Agaricales: Lepiotaceae) do qual elas se alimentam (DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014).

A forma mais usual de controle desses insetos é pelo método químico, entretanto a busca por alternativas ambientalmente corretas tem sido estimulada. Nesse sentido, Dornelas et al. (2016) realizaram estudo prospectivo de fungos filamentosos, associados a operárias de *Atta sexdens* e *A. laevigata* da região do cerrado tocantinense, com propriedades patogênicas. Os autores isolaram de *A. sexdens* os fungos *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin, *Aspergillus flavus*

Link, *Acremonium* sp.1, *Aspergillus* sp.1, *Colletotrichum* sp. e *Acremonium* sp. 2, e de *A. laevigata*, *Mucor* sp., *A. flavus*, *Fusarium solani* (Martius) Saccardo, *A. niger* van Tieghem; entretanto o teste de patogenicidade contra a formiga *A. sexdens* foi realizada somente com os fungos *A. flavus*, *A. niger* e *M. anisopliae*, pois esses apresentaram alta produção de conídios e elevada prevalência no estudo. Foi verificada uma taxa de letalidade de 50% das operárias em apenas cinco dias, nos testes com *A. niger* e *M. anisopliae*, sendo essa duração significativamente inferior ao tratamento controle.

Estudo realizado por Zanardo (2015) em solos dos cinco biomas do Brasil corrobora a importância que o Cerrado tem em abrigar uma das maiores quantidades de fungos entomopatogênicos. A autora determinou a abundância de fungos ao longo de dois anos em amostras de solos de cultivos anuais, perenes e vegetação nativa, durante estação climática seca e úmida, de cinco áreas representativas dos biomas brasileiros (Figura 7), e verificou no geral, maiores densidades de entomopatogênicos no Cerrado ($2,27 \pm 1,58 \times 10^3$ a $3,46 \pm 1,51 \times 10^4$ UFC g⁻¹ de solo), sendo o gênero *Metarhizium* spp. o de maior predominância.

Figura 7 – Biomas brasileiros, cidades e estados, tipos de cultivos agrícolas e vegetação nativa onde as amostras de solo foram coletadas.



Fonte: Zanardo (2015).

Conforme mencionado anteriormente, além do emprego dos fungos no controle biológico e como bioindicadores da qualidade do solo em manejos diversos, esses micro-organismos tem importância preponderante no setor agrícola. Podem atuar na melhoria da produtividade das culturas, realizando a ciclagem de nutrientes, ao decompor e transformar materiais orgânicos em minerais, que serão assim aproveitados pelas plantas. E também, associar-se simbioticamente (micorrizas) com raízes de muitas espécies vegetais, proporcionando a essas aumento da superfície de contato com o solo, para absorção de água e sais minerais (ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2015; LIMA et al.; 2015; NASCIMENTO et al., 2016; STOFFEL et al.; 2016).

Dentre os grupos de micorrizas destacam-se os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), também denominados endomicorrizas, que tem como característica diferencial desenvolver um micélio que penetra internamente no córtex da raiz, invadindo tanto o espaço intra quanto intercelular. Berude et al. (2015), em pesquisa bibliográfica, compilaram outros distintos benefícios às plantas quando de sua associação aos FMA: redução ao estresse hídrico e salino, diminuição de sítios de infecção por patógenos, aumento na absorção de fósforo e nitrogênio do solo e maior tolerância a metais pesados.

Experimento realizado por Salgado et al. (2016), ilustra a potencialidade de fungos isolados do Cerrado em propiciar o crescimento inicial de plantas de feijoeiro e soja. Os pesquisadores coletaram, isolaram e identificaram FMA (*Acaulospora scrobiculata*, *Claroideoglossum etunicatum*, *Dentiscutata heterogama*, *Gigaspora margarita* e *Rhizophagus clarus*) provenientes de solo do Cerrado (região sudoeste de Goiás), os quais foram associados ao estimulante de colonização (7-hidroxi,4'-metoxi-isoflavona) e inoculados sobre ambas culturas. Eles observaram aumento da biomassa nas plantas, mais de 200% para o feijoeiro e mais de 80% para a soja, partindo-se dos seguintes parâmetros de avaliação: massa seca da parte aérea, massa seca da raiz, colonização micorrízica, massa de nódulos e acúmulo de cálcio, zinco e fósforo na massa seca da parte aérea.

Em outro experimento, partindo das mesmas condicionantes, Salgado et al. (2017), determinaram os efeitos de tal combinação sobre o crescimento inicial de plantas de algodão e milho, e verificaram que baixa densidade de propágulos de FMA inoculados e associados a estimulante de colonização foram também benéficos ao desenvolvimento de ambas culturas.

Santos A. et al. (2018), avaliaram os efeitos da inoculação de FMA, provenientes de solo de Cerrado conservado, sobre uma região degradada pela construção de uma usina hidrelétrica, no município de Selvíria-MS. Eles verificaram que a combinação de resíduos orgânicos/minerais com a aplicação dos fungos influenciou positivamente o solo degradado, pois o teor de carbono da massa microbiana (CBM), carbono de gás carbônico liberado (C-CO₂) e quociente microbiano (qMic) elevaram-se. Todos esses parâmetros são indicadores de qualidade do solo (MELO et al., 2017).

Outro aspecto a se considerar são os estudos sobre emprego da atividade fúngica para a melhoramento de processos de produção, extração, solubilização e transformação no setor industrial. Os mesmos vêm crescendo e propiciando vantagens em termos ambientais e de obtenção de produtos com maior valor econômico agregado. A produção de biossurfactantes por micro-organismos, por exemplo, é uma opção promissora em termos de obtenção de produtos biotecnológicos, haja visto a baixa toxicidade, alta biodegradabilidade e melhor compatibilidade ambiental quando comparados aos surfactantes sintetizados quimicamente (SOUSA et al., 2016).

Partindo disso, Passone et al. (2015) avaliaram o potencial biossurfactante de três fungos isolados de ambientes do Cerrado na região do Triângulo Mineiro, codificados como C18, C35 e C40, sobre diferentes concentrações de glicerol, empregando fermentação submersa. Os autores observaram índices de emulsificação variando de 28,6 a 71,4%. Foi notado também aumento nesse parâmetro (em média 10%), com o aumento do tempo de fermentação (48 para 72 h), nos cultivos contendo concentrações de glicerol 2,5, 5,0 e 10,0% (v/v) inoculados com o fungo C35, além de um dos menores valores de tensão superficial (40 mN m⁻¹) na condição de 1,5% (v/v) de glicerol a 48 h. Altos índices de emulsificação e baixos valores de tensão superficial são bons indicativos de atividade surfactante (LIMA, 2007).

A produção e oferta interna de fertilizantes fosfatados no Brasil ainda tem sido um gargalo no setor agrícola, especialmente porque a rocha fosfática, principal insumo da indústria de fertilizantes, é um mineral pouco disponível no país e ainda apresenta baixo teor de pentóxido de fósforo (P₂O₅). Solos aráveis, como os do Cerrado, demandam fósforo que é pouco disponibilizado e muitas vezes insolúvel para ser utilizado pelas culturas agrícolas, necessitando assim serem suplementados com fertilizantes (CARNEIRO et al., 2016). Associado a isso, a extração dos fosfatos é

realizada empregando-se ácido fosfórico (H_3PO_4) ou sulfúrico (H_2SO_4), o que gera resíduos. Tais condições tornam o custo da produção nacional elevado e ambientalmente pouco sustentável, suscitando pesquisas que se utilizem de métodos naturais renováveis e que agredam menos o ambiente, tal como a biossolubilização realizada por micro-organismos (EMBRAPA, 2015; BRASIL, 2018).

Nesse sentido, Cabral et al. (2017) isolaram *Trichoderma harizianum*, um fungo filamentoso do filo Ascomycota, de um complexo minerador do município de Araxá-MG, e testaram sua capacidade de biossolubilizar fósforo a partir de concentrado de rocha fosfática (teor de P_2O_5 igual a 37,5%) originária do complexo de mineração do município de Tapira-MG. Empregando-se fermentação submersa em biorreator *air-lift* com reciclo do meio reacional, e variando o fluxo volumétrico de ar ascendente e a concentração de rocha fosfática, os pesquisadores obtiveram uma concentração de fósforo solúvel em meio líquido igual a 244,9 partes por milhão (ppm) ou 33,78% de solubilização, em um período de três dias a $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Gomes et al. (2017), obtiveram 11,95% (94,8 ppm) de solubilização de fósforo em 14 dias, e 6,81% (52 ppm) em 9 dias, empregando o mesmo concentrado de rocha fosfática, na fermentação sólida e líquida, respectivamente, com o fungo *T. reesei*, coletado no Cerrado.

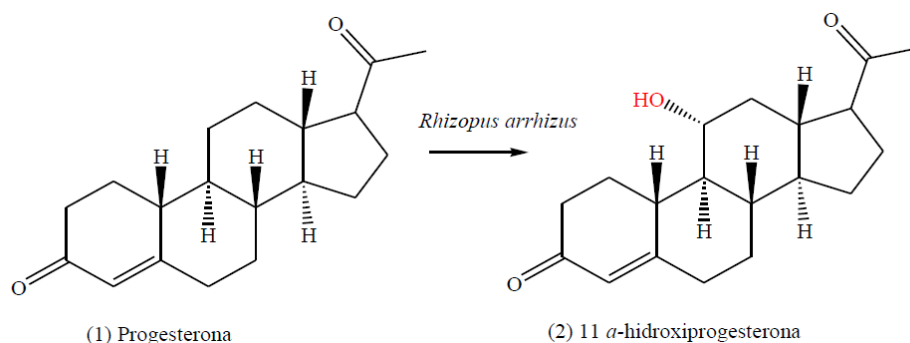
Estudo realizado por Rocha (2017), com a levedura *Torulaspora globosa*, isolada da rizosfera de milho, no município de Araras-SP, evidenciou também a rápida solubilização de fosfato tricálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) em fermentação submersa. A autora obteve quantidade máxima de fósforo solúvel (42%) em apenas 48 h, demonstrando a potencialidade do fungo em aplicações industriais e agrícolas.

Propiciar o aumento e variedade da quimiodiversidade, isto é, da obtenção de novas substâncias derivadas da ação metabólica de micro-organismos e/ou enzimas isoladas, sobre compostos orgânicos ou sintéticos, tem sido uma nova estratégia biotecnológica alternativa de síntese química, dentro da área de química verde. Para Hegazy et al. (2015), o uso desse processo apresenta vantagens quando comparado à síntese tradicional: baixo custo; quimio, estereo e regioseletividade; manutenção das cepas; redução no número de animais experimentais; maior quantidade e variedade de compostos produzidos; consumo mínimo de energia e menor geração de resíduos, especialmente compostos tóxicos e danosos ao ambiente.

Historicamente, os processos de biotransformação via micro-organismos foram impulsionados em 1952, quando Peterson e Murray patentearam o emprego do fungo

Rhizopus arrhizus para converter progesterona em 11 α -hidroxiprogesterona (Figura 8) (ASHA; VIDYAVATHI, 2009).

Figura 8 – Biotransformação de progesterona (1) em 11 α -hidroxiprogesterona (2) por *Rhizopus arrhizus*.



Fonte: Adaptado de Peterson et al. (1952).

Silva (2015) testaram cepas de *Beauveria* sp. isoladas de solo do Cerrado da região de Goiás, sobre ácido gálico (AG) e elágico (AE), utilizando cultivo submerso em meio glicose e *Corn Steep* (milho macerado), durante 96 h a 27°C e 200 rotações por minuto (rpm). Empregando-se Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), foi notado que todas as cepas foram eficientes na biotransformação dos compostos, sendo que o meio contendo *Corn Steep* proporcionou maior variedade e quantidade de compostos formados para ambos substratos. Os derivados do AG obtidos e caracterizados estruturalmente por métodos espectroscópicos foram: ácido benzoico, 3-O-metil- β -glucopiranosil-galatoester (Labiocn 465); ácido benzoico, 4-[[6-O-(3,4-diidroxi-5-metoxibenzoico)- α -D-glucopiranosideo]oxi]-3-hidroxi-5metoxi (Labiocn 484); ácido gálico 3-O- β -glucopiranoside (Labiocn 510) e ácido 3,4-diidroxi-5-metoxi-benzoico-2-hidroxi-5-metoxicarbonil-fenilester (Labiocn 530). E os do AE: 3,8-dimetoxi-dibenzo[b,d]piran-6-one (Labiocn 511) e o ácido elágico 4-O,3'-O-metil- β -D-glicose (Labiocn 534).

Na indústria de alimentos, algo que tem se tornado corriqueiro é o emprego de insumos e/ou ingredientes com caráter mais natural (KUMAR et al., 2015; CAROCHO et al., 2017) para a elaboração de produtos alimentícios, dada a mudança de atitudes do consumidor e sua maior preocupação com a saúde (RIBEIRO et al., 2017). Para isso, tem-se por exemplo substituído o emprego de aditivos químicos artificiais, por compostos naturais derivados de animais, plantas ou mesmo micro-organismos.

Conforme Rao, Xiao e Li (2017), a demanda por corantes alimentícios naturais derivados de micro-organismos, por exemplo, tem aumentado dia a dia, não somente pelos efeitos nocivos cientificamente relatados da ingestão de alguns corantes sintéticos, mas também porque pigmentos de origem microbiana apresentam vantagens quando comparados a outros produtos naturais: rapidez na produção; fácil processamento; independência das condições climáticas e propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anticancerígenas.

Entre os distintos pigmentos microbianos, aqueles derivados de fungos ambientais e especialmente do solo, têm sido pesquisados e vem apresentando-se como alternativa favorável não só na medicina, como também na indústria cosmética, têxtil e principalmente alimentícia (AKILANDESWARI; PRADEEP, 2016). Nesse sentido, Machado (2018) isolou leveduras com potencial carotenogênico do ambiente (folhas, solo, flores, frutos silvestres e insetos) do Cerrado e verificou que as espécies *Rhodotorula glutinis*, *R. graminis*, *R. aurantiaca*, *R. lactosa* e *R. mucilaginosa* se destacaram na produção de carotenoides. Realizando testes de otimização em condições de cultivo experimental submerso com variação de agitação (130 a 230 rpm), temperatura (25 a 35°C), pH (4,5 a 6,5) e componentes do meio de cultivo, o autor observou que a levedura *R. mucilaginosa* foi a mais efetiva na bioprodução do pigmento (4164,45 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Em outro estudo bioprospectivo de fungos endofíticos de folhas de *Hymenaea coubaril* (jatobá), árvore típica do Cerrado, Romano (2015) identificou potencial produção de pigmento vermelho pelo fungo *Talaromyces minioluteus*, empregando-se diferentes meios de cultivo a 28°C, por 72 h e a 200 rpm, ao se comparar a mensuração da biomassa após os cultivos, com índices de absorbâncias obtidos a 510 nm. Conforme o autor, a intensa coloração vermelha obtida em todos os cultivos realizados evidencia o possível emprego biotecnológico da espécie, entretanto, sugere-se a continuidade das pesquisas visando não somente identificar quimicamente o pigmento, como verificar a micotoxidade, empregar substratos alternativos de menor custo e também otimizar o processo de produção.

No setor industrial, especialmente alimentício, a produção biotecnológica de frutooligossacarídeos (FOS) e exopolissacarídeos (EPS) empregando-se micro-organismos tem sido muito demandada, não somente por serem considerados naturais (LI et al., 2017); como também pela praticidade e facilidade de obtenção quando comparado à extração realizada de fontes vegetais (LIU; WILLFÖR; XU,

2015); além desses polissacarídeos apresentarem benefícios à saúde, bem como propriedades tecnológicas que melhoram as características físico-químicas, reológicas e sensoriais dos produtos destinados ao consumidor (FREITAS; TORRES; REIS, 2017; BARCELOS et al., 2019; MACEDO; VIMERCATI; ARAÚJO, 2020).

Diante dos benefícios e aplicações dos FOS, Zaninette et al. (2019) observaram atividade hidrolítica e capacidade de transfrutossilagem de solução de sacarose (150 g L⁻¹), com produção de 8 g L⁻¹ de 1-cestose (FOS do tipo inulina) e 7,3 g L⁻¹ de neocestose (FOS do tipo neolevana, comumente não produzido por fungos filamentosos), pelo fungo *Penicillium janczewskii* Zaleski CCIBt 3352, isolado da rizosfera de uma planta do Cerrado (*Chrysolaena obovata*), evidenciando a promissora capacidade sintetizadora de FOS por uma cepa selvagem. Outro estudo realizado com diferentes frutos do Cerrado (SILVEIRA, 2018), corrobora a necessidade de estudos prospectivos com viés biotecnológico mais sistematizados sobre o bioma. A autora isolou 17% de micro-organismos (de um total de 59), com potencialidades de produção de EPS, sendo que uma das linhagens alcançou uma produção máxima desses bioprodutos de 1,2 g L⁻¹ após 2 h de processo a 30°C e 150 rpm.

No setor de energias renováveis, em especial na produção e melhoria de processos para obtenção de biocombustíveis e/ou biodiesel, os fungos também vem apresentando suas potenciais aplicações. Segundo Bechara et al. (2016), o crescimento incessante da população tem demandado o consumo de recursos energéticos para suprir o bem-estar individual, desempenho industrial ou mesmo serviços de manutenção; promovendo a escassez de fontes de energia não renováveis como o petróleo, por exemplo, e a intensa emissão de gases poluentes para a atmosfera (JONKER et al., 2016). Assim, o uso da bionconversão de diferentes resíduos empregando-se fermentação microbiana vem sendo adotado como alternativa para se otimizar a aquisição de combustíveis mais sustentáveis, e ao mesmo tempo minimizar alterações ambientais decorrentes da disposição de subprodutos e rejeitos com características poluentes (ZANONI et al., 2015; MARTÍNEZ-RUANO et al., 2019).

Um dos principais motivos do emprego de micro-organismos para obtenção de biocombustíveis é exemplificado na obtenção do etanol de segunda geração (E2G). Conforme Davis et al. (2015) e Johnson (2016), ainda existem dificuldades de se despolimerizar as longas cadeias de carboidratos que constituem a parede celular

vegetal, para se poder disponibilizar os açúcares fermentescíveis que serão convertidos em álcool. Assim, diferentes estudos e esforços públicos e privados têm sido realizados, visando selecionar micro-organismos que apresentem tal capacidade bioconversora, de forma a se reduzir o custo atual do refinamento da biomassa vegetal.

Dabaja et al. (2019), testaram 43 culturas de fungos endofíticos isolados de *Annona crassiflora* (araticum), uma planta nativa e exclusiva do Cerrado, e verificaram que 8% apresentaram atividade esterásica; 34,43% atividade celulolítica; 73,91% atividade fosfatásica; 78,26% atividade lipolítica e 91,3% atividade β -frutocfuranosidásica. Os autores ainda realizaram a fermentação submersa para determinação da atividade lipolítica, visto serem as lipases enzimas muito aplicadas em biocombustíveis (principalmente na produção de biodiesel), e constataram uma atividade expressiva de 27,34 U g⁻¹ em 60 h de fermentação a 28°C.

Bessa (2019) isolou fungos do solo do Cerrado e verificou atividades lipolíticas promissoras de 9,268 U mg⁻¹ e 7,032 U mg⁻¹ para duas cepas *Paecilomyces formosus* (isolado I e II); e 6,447 U mg⁻¹ para *Aspergillus tubingensis*. A autora ainda observou que o extrato enzimático bruto proveniente do isolado II de *P. formosus* conseguiu atingir 41,60% de conversão de óleo:metanol em ésteres metílicos. Conforme Ahmad et al. (2019), enzimas com a capacidade de catalisar reação de transesterificação quando na presença de um triacilgerol e álcool, têm forte potencial de serem empregadas na produção de biodiesel, haja visto este processo ser considerado mais limpo quando comparado ao uso de catalisadores químicos.

Dentre os distintos micro-organismos presentes no solo do Cerrado, bactérias e fungos, especialmente aqueles que apresentam capacidade de excretar enzimas para o meio, tem sido alvo de interesse nos estudos relacionados à bioprospecção e biotecnologia. Isso porque, a secreção extracelular enzimática, realizada naturalmente pelo micro-organismo com objetivo de promover a degradação de compostos complexos para sua posterior absorção e nutrição, reduz custos nos sistemas de isolamento de tais bioprodutos quando comparado aos processos onde é necessário o rompimento celular (ANDRADE-LINHARES; VERESOGLOU; RILLIG, 2015). Além disso, biocompostos excretados tendem, de forma geral, a ser mais estáveis aos distintos fatores ambientais, quando comparados àqueles que se mantêm no interior da célula, em condições fisiológicas favoráveis.

Silva et al. (2015), por exemplo, estudando a capacidade de 66 estirpes de *Trichoderma* spp. isoladas do solo e madeira em decomposição da região do cerrado tocantinense, verificaram que dois dos isolados (UFTJCO85 e UFTMG15) apresentaram atividades enzimáticas celulásicas satisfatórias para FPase (1,34 UI mL⁻¹) e CMCase (0,81 UI mL⁻¹), haja visto que não foram empregados tratamentos prévios do sabugo de milho testado.

Oliveira et al. (2015) testaram a atividade amilolítica de enzimas produzidas por leveduras isoladas de ambientais naturais (frutas e serrapilheira) e industriais (mosto de usina de cana-de-açúcar) da região de Dourados (MS), e identificaram três cepas de um total de 54, com boas capacidades de produzir amilases, a partir de farelo de trigo a 70% de umidade. Entre as cepas destacaram-se *Candida parapsilosis* com atividade máxima 14,68 U mL⁻¹; *Rhodotorula mucilaginosa* com 25,0 U mL⁻¹ e *Candida glabrata* com 25,39 U mL⁻¹, empregando FES por 120 h a 28°C. A amilases produzidas por tais cepas exibiram atividade máxima em pH 7,0 e temperatura de 60°C; apresentaram atividade mesmo após 1 h de incubação a 50°C; mantiveram atividade catalítica residual maior que 70% após exposição à solução de 15% de etanol; e ainda apresentaram maiores atividades enzimáticas em amido de milho, quando comparado aos amidos de batata, trigo e mandioca.

Santos et al. (2016) destacaram o potencial biotecnológico de outro fungo também isolado do solo da região de Dourados (MS) (22°10'49.2"S 54°56'57.4W), com capacidade de produção de β -glicosidades, enzimas empregadas na produção de biocombustíveis; vinificação e desenvolvimento de alimentos funcionais. A cepa de *G. butleri* isolada apresentou a máxima produção de β -glicosidades (21,5 U mL⁻¹), em FES a 30°C por 96 h, sobre farelo de trigo a 55% de umidade. Os autores verificaram ainda uma atividade catalítica máxima em pH 4,5 e temperatura de 65°C, com retenção de 80% da atividade mesmo após manutenção a 50°C por 1 h.

Em pesquisa realizada por Melo et al. (2018), em amostras de solo e serrapilheira coletados no Parque Estadual do Cerrado em Jagariúna (PR) (24°09'S e 50°18'W), região nativa de Cerrado, 89,3% dos isolados fúngicos pertencentes ao filo Ascomycota e Basidiomycota, apresentaram atividade celulásica em meio de cultura contendo carboximetilcelulose (CMC), tendo se destacado *Colletotrichum boninense* e *Trichoderma* sp. Os autores observaram ainda que todas as cepas apresentaram alguma atividade lipolítica, demonstrando potencialidades para serem empregadas

em processos biotecnológicos que envolvam degradação de biomassa vegetal e produção de biocombustíveis.

2.3 *Gongronella butleri*: características gerais, emprego e possibilidades evidenciadas em estudos atuais

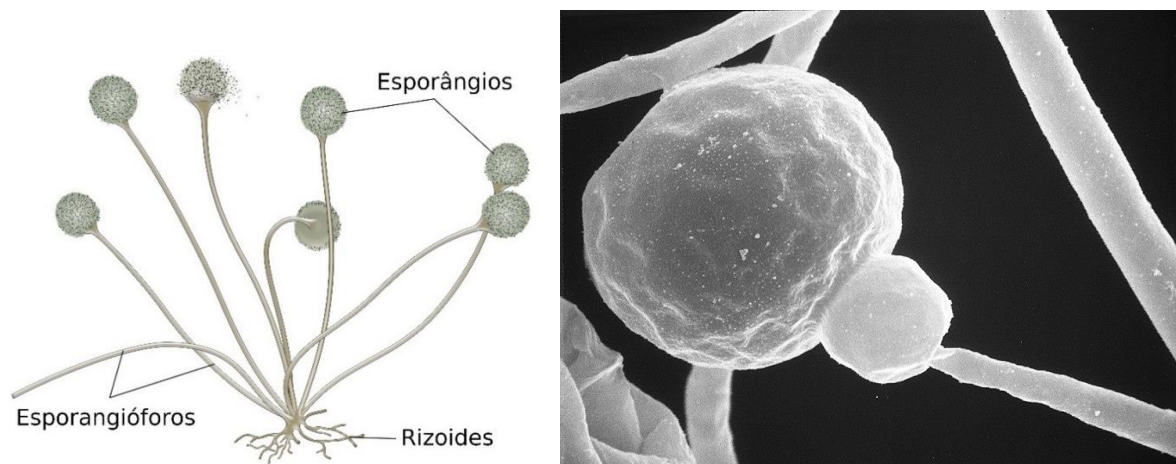
O gênero *Gongronella* foi inicialmente elucidado por Ribaldi (1952) tendo *G. urceolifera* Ribaldi (atualmente renomeada como *G. butleri* Lendn.), como primeira espécie categorizada. Anos mais tarde Peyronel e Dal Vesco (1955) reclassificaram e agruparam *Absidia butleri* Lendn. dentro da espécie *G. butleri* Lendn., tendo por base protuberâncias morfológicas características observadas nos esporângios de *A. butleri*, que são semelhantes às presentes nas espécies do gênero *Gongronella*. A partir daí, novos estudos inseriram mais espécies ao gênero.

Atualmente conforme Freitas et al. (2021) são reconhecidas cientificamente dez espécies de *Gongronella*: *G. brasiliensis*; *G. eborensis*; *G. koreana*; *G. lacrispora*; *G. orasabula*; *G. sichuanensis*; *G. zunyiensis*; *G. pedratalhadensis*; *G. guangdongensis*; e *G. butleri*. Todas as cepas padrão foram isoladas do solo estando depositadas em micotecas da China, Coreia, Reino Unido, Portugal e Brasil.

As espécies do gênero *Gongronella* são fungos pertencentes ao sub-reino Mucoromycota; filo Mucoromycota (antigo Zygomycota); subfilo Mucoromycotina; ordem Mucorales (TEDERSOO et al., 2018). Os indivíduos pertencentes a essa ordem são essencialmente terrestres ubíquos; predominantemente saprófitos; formados por hifas cenocíticas e apresentam crescimento rápido, sendo capazes de assimilar diferentes tipos de açúcares. A reprodução pode ocorrer de forma assexuada, pela formação de esporos denominados esporangiósporos, que ocorre no interior de esporângios (Figura 9); ou em condições específicas e menos frequente, de forma sexuada, pela fusão gametangial de duas hifas, seguida de divisão meiótica e formação dos zigósporos (MARTINS et al., 2016; SENNA, 2018).

Dentre as características distintivas dos fungos agrupados dentro do gênero *Gongronella* estão: a formação de pequenas colônias miceliais; a produção de esporângios globosos com protuberâncias; esporangiósporos em forma de feijão e elípticos e produção de zigosporângios ornamentados (LI et al., 2016a).

Figura 9 – Desenho esquemático das estruturas morfológicas gerais de fungos pertencentes ao subfiló Mucoromycotina e fotomicrografia do esporângio de *Gongronella butleri*.



Fonte: Griskeviciene (2021) e ZyGoLife Research Consortium (2016).

Pesquisas têm mostrado que representantes desse gênero taxonômico, em especial a espécie *G. butleri*, têm potencial biotecnológico e econômico, podendo ser empregada em processos de produção de enzimas e outros bioprodutos como a quitosana; biorremediação e descontaminação; no controle biológico; entre outros (BABU et al., 2016; MORALES; CASANOVA, 2015; MARTINS et al., 2017).

No setor agrícola e ambiental têm-se evidenciado o emprego de isolados de *Gongronella* spp. no controle biológico de nematoides e na degradação de diferentes substâncias no ambiente, principalmente aquelas de caráter tóxico. Santos et al. (2020) verificaram efeitos promissores na capacidade de infecção de ovos e inibição da eclosão de juvenis do nematoide fitoparásita *Meloidogyne javanica*, por isolados de *Gongronella* spp. provenientes de solo de área agrícola. Conforme os autores, embora não se tenha registros massivos do emprego desse gênero fúngico como agente de controle de nematoides, os resultados apresentaram alto potencial biotecnológico. Acredita-se que o parasitismo dos ovos esteja associado a capacidade de desacetilação da quitina (composto predominante na casca) à quitosana, que é assim incorporada à biomassa do fungo (GHORMADE; PATHAN; DESHPANDE, 2017). Varela-Benavides, Durán-Mora e Guzmán-Hernández (2017) também observaram potencial controle *in vitro* de *M. exigua*, ao utilizar *G. butleri*.

Em termos de degradação e estabilização de substâncias químicas, Morales e Casanova (2015), obtiveram altos rendimentos de redução da acetofenona empregando células de *G. butleri* imobilizadas em espuma de poliuretano. Como ressaltado pelos autores, além dos melhores rendimentos e menor tempo de conversão, o emprego do fungo como biocatalisador é muito específico gerando uma menor quantidade de substâncias tóxicas secundárias, em contraposição aos processos de conversão que empregam catalisadores inorgânicos.

Estudo realizado por Martins et al. (2017) também evidenciou o potencial biotecnológico do emprego do gênero *Gongronella* para a degradação de compostos xenobióticos e recalcitrantes, como o fungicida metalaxil, muito empregado no combate de fitopatógenos.

Seguindo esse mesmo viés da química verde e sustentável existem relatos da atividade de *G. butleri* na degradação de polihidroxialconatos - PHA (polímeros constituintes dos bioplásticos degradáveis), que têm substituído gradualmente os plásticos sintéticos tradicionais (VOLOVA; BOYANDIN; PRUDNIKOVA, 2015).

Um estudo recente com fungos isolados de uma mina de urânio inativada, na cidade de Caldas (MG), também mostrou em testes de resistência/tolerância, o potencial de *G. butleri* na biorremediação de urânio por meio de bioissorção desse elemento químico em água contaminada (COELHO E. et al., 2020).

A capacidade catalítica de *G. butleri* também foi evidenciada por Kollerov et al. (2015) na hidroxilação de 6 α -fluoro-16 α -metil-desoxicorticosterona 21-acetato (FM-DCA) à 6 α -fluoro-16 α -metil-corticosterona, um esteroide ativo, sendo atingindo um rendimento otimizável de 65% de conversão ao se empregar 6 g L⁻¹ de FM-DCA. Segundo os autores, essa capacidade está associada a um sistema de enzimas 11 β -hidroxilantes na membrana celular do fungo, propiciando uma ferramenta eficaz de modificação de esteroides, que seriam de difícil obtenção por métodos sintéticos convencionais (KOLLEROV et al., 2019).

A produção de quitosana e enzimas derivadas de *G. butleri* tem sido muita pesquisada para emprego em diferentes setores de atividade econômica, especialmente no alimentício, bebidas, médico-farmacêutico, limpeza e higiene.

A quitosana é um biopolímero derivado da desacetilação da quitina, o segundo carboidrato mais abundante da natureza. Por apresentar características não tóxicas, biodegradáveis, biocompatíveis e eco-amigáveis, tem sido um polímero amplamente utilizado em recursos biotecnológicos. Durante longos períodos sua extração vem

sendo realizada a partir de resíduos das carapaças de crustáceos, entretanto, os processos extrativos são complexos, empregam solventes quimicamente agressivos, e a produção do carboidrato é muito dependente das condições ambientais. Tais características são consideradas pouco vantajosas quando comparadas à produção a partir de fontes fúngicas, o que têm ganhado atenção nos últimos anos (RAZAK et al., 2018). Vantagens tecnológicas também se somam a obtenção desse composto a partir de fungos, tais como: polímeros de comprimento mais homogêneo, com alto grau de desacetilação e solubilidade em relação às fontes marinhas (GHORMADE; PATHAN; DESHPANDE, 2017).

Além da quitosana ser encontrada naturalmente em paredes celulares de fungos como: *Absidia glauca*, *A. coerulea*, *A. blakesleeanus*, *Aspergillus niger*, *Mucor rouxii*, *G. butleri*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Rhizopus oryzae*, *Trichoderma reesei*, e *Lentinus edodes* (RAJKUMARI; BUSI, 2018); enzimas quitosanases podem ser isoladas dos mesmos, podendo ser empregadas na despolimerização da quitosana, com formação de quitoooligossacarídeos (QOS), que são oligômeros com propriedades biológico-farmacêuticas e tecnológicas específicas (LI et al.; 2016b). Existem relatos do emprego dos QOS com função anti-inflamatória (AZUMA et al., 2015); antifúngica (SEKI; NISHIYAMA; MITSUTOMI, 2019); antibacteriana (LAOKULDILOK et al., 2017); antioxidante (YANG et al., 2017); antitumoral (ZOU et al., 2019); como componentes de embalagens (CASTILLO et al., 2017) e em produtos lácteos (VELA GUROVIC et al., 2015).

Essa capacidade de produção de quitosanases por *G. butleri* foi identificada em um estudo recente onde se purificou e caracterizou uma exo-quitobiohidrolase monomérica de 47.000 Da, com atividade ótima em pH 4,0 e temperatura de 45°C; e estabilidade entre pH de 5,0 - 11,0 e temperaturas abaixo de 30°C (SEKI; NISHIYAMA; MITSUTOMI, 2019).

O emprego de *G. butleri* na produção de enzimas, tendo por base seu cultivo em subprodutos agroindustriais, tem apresentado resultados satisfatórios, especialmente por tais substratos apresentarem uma fonte potencial de nutrientes e energia de baixo custo, haja visto estarem amplamente disponíveis em países que têm sua economia pautada na agropecuária, como o Brasil (MORAES et al., 2017; SAMPAIO; HADDAD; WIENDL, 2018).

A diversificada produção de enzimas por *G. butleri* relatada em estudos recentes, tais como: amilases, xilanases, quitosanases, celulasas, dentre outras;

demonstra sua potencial versatilidade metabólica, e a necessidade de estudos prospectivos distintos empregando-se condições de cultivo e substratos de composição química diferenciados, visando-se induzir e otimizar enzimas, que podem ser empregados nos mais variados produtos e processos (SANTOS et al.; 2016; CAVALHEIRO et al., 2017; SENNA et al., 2017; SENNA, 2018; SENNA et al. 2018; SEKI; NISHIYAMA; MITSUTOMI, 2019)

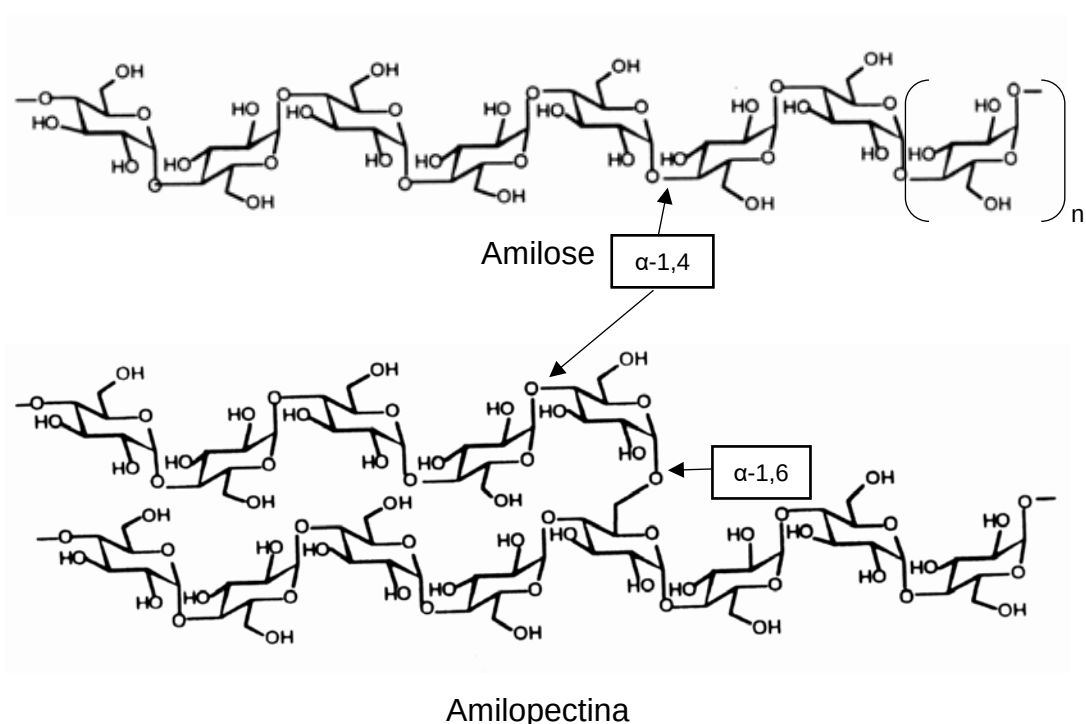
2.4 Amilases

As amilases são carboidrases que catalisam a quebra das ligações glicosídicas presentes no amido, glicogênio e sacarídeos derivados. Podem ser obtidas de plantas, e animais, mas as amilases derivadas de micro-organismos, especialmente fungos filamentosos, têm sido mais empregadas comercialmente, uma vez que a indução da produção desses catalisadores por tais fungos requer processos de fácil aplicação e baixo custo, e podem ocorrer em curtos períodos de tempo, tornando a obtenção economicamente viável (PASIN et al., 2014).

Outro fator que corrobora a adoção industrial de amilases fúngicas, está relacionado à capacidade desses organismos de sintetizar uma série de enzimas com diferentes características. Segundo Elizei et al. (2014), essa capacidade relaciona-se à diversidade de habitats distintos colonizados por esses micro-organismos ao longo da evolução. Conforme os mesmos autores, estima-se que 60% dos catalisadores biológicos utilizados em processos industriais derivam de fungos filamentosos, seguidos por 24% de bactérias, 6% de animais, 4% de vegetais e 4% de leveduras.

O amido é um homopolissacarídeo de reserva, estruturalmente complexo, constituído de centenas a milhares de unidades de D-glicose ligadas entre si por ligações *O*-glicosídicas do tipo α -1,4 e α -1,6, sendo largamente encontrado nas plantas (sementes, folhas, raízes, bulbos, túberculos e rizomas), na forma de grânulos, constituídos por duas frações: amilose e amilopectina (Figura 10). A proporção dessas frações varia conforme cada espécie vegetal, mas em média a amilose representa de 15 a 30% do amido, e amilopectina de 70 a 85%. Por ser um açúcar largamente presente nos vegetais e também nos subprodutos derivados destes; torna-se um dos principais substratos a serem empregados em bioprocessos industriais, pela ação das amilases, gerando diferentes compostos derivados com ampla aplicação (PASIN et al., 2019).

Figura 10 – Fórmulas estruturais da amilose e amilopectina.



Fonte: Adaptado de Alves-Prado (2005).

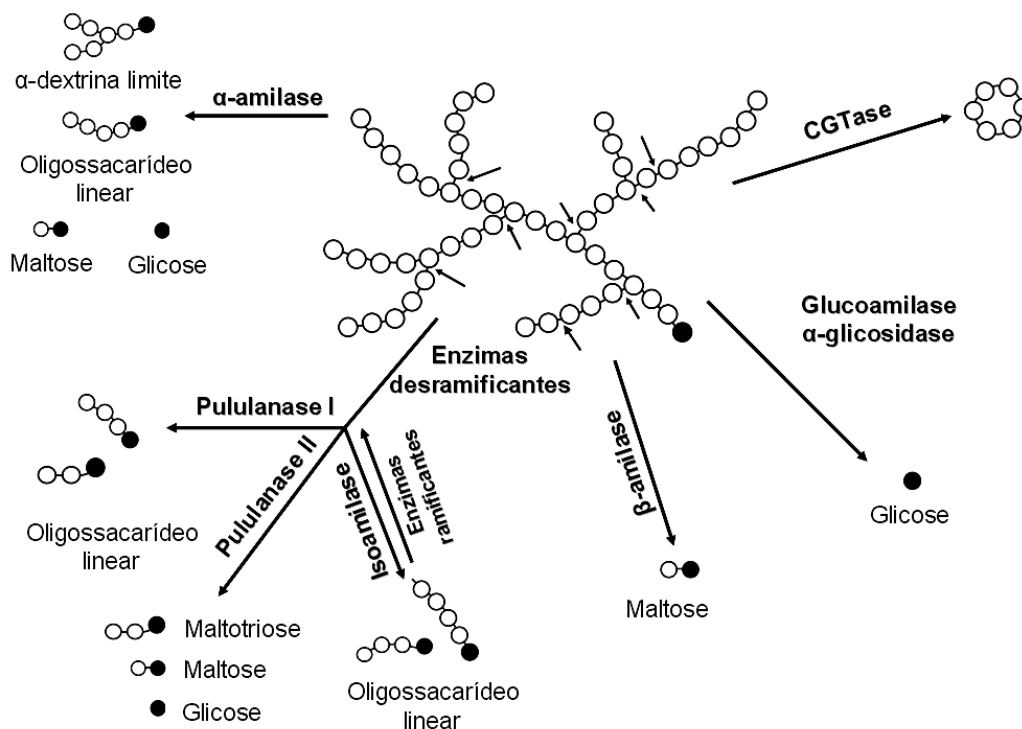
A maior parte do amido usado industrialmente é quimicamente modificado, e para isso faz-se importante empregar processos de hidrólise dessa molécula. Como o emprego de enzimas necessita de condições menos enérgicas e ainda é específico, gerando menor quantidade de outros subprodutos de não interesse, quando comparado aos catalisadores químicos; pesquisas têm sido dedicadas a se produzir e isolar tais catalisadores biológicos (GUIMARÃES, 2016).

Devido à complexidade estrutural do amido, formado por partes lineares de D-glicose, dispostas de forma helicoidal (amilose), e partes ramificadas (amilopectina), faz-se necessário aplicar sistemas multienzimáticos, constituídos por diferentes enzimas, visando-se obter distintos hidrolisados de amido (POLIZELI; SILVA, 2016).

As amilases podem ser agrupadas de acordo com diferentes características: modo de ação (endo- ou exo-), retenção ou inversão de configuração (α ou β), afinidade por ligações do tipo α -1,4 ou α -1,6, atividade de transglicosilação ou não (KOBELITZ, 2010).

De acordo com o seu modo de ação na estrutura do amido (Figura 11) as amilases podem ser classificadas como endoamilases, exoamilases, desramificantes ou transferases.

Figura 11 – Representação esquemática da ação das enzimas envolvidas na degradação do amido.



(•) molécula de glicose com extremidade redutora; (o) molécula de glicose sem extremidade redutora;
(→) indicam o ponto de clivagem preferido na molécula de amido.

Fonte: Bertoldo e Antranikian (2002) modificado por Alves-Prado (2005).

As endoamilases hidrolisam o amido de forma casual no interior da molécula, rompendo ligações do tipo α -1,4, gerando oligossacarídeos de diversos comprimentos, e promovendo de forma geral a redução da viscosidade da solução de amido. As principais representantes desse grupo são α -amilases (EC 3.2.1.1), que têm ação rápida sobre substratos de alta massa molecular, dando origem a uma mistura de oligossacarídeos de pesos moleculares distintos, denominados de dextrinas ou maltodextrinas. Em longos tempos de reação, essas enzimas podem produzir glicose e maltose a partir de amilose; e oligossacarídeos (de 4 ou mais unidades de glicose) contendo as ligações α -1,6, a partir de amilopectina (VAN DER MAAREL et al., 2002). As α -amilases são estabilizadas na presença de íons de cálcio, e algumas podem ser ativadas (apresentando maior taxa de hidrólise) na presença de halogênios. É interessante ressaltar também, que leveduras alcoólicas não sintetizam tais enzimas (KOBBLITZ, 2010).

As exoamilases hidrolisam, consecutivamente, as ligações glicosídicas partindo da terminação não redutora da molécula, produzindo basicamente açúcares redutores, como a glicose ou a maltose. Como exemplos pode-se citar as β -amilases (EC 3.2.1.2) e glicoamilases/amiloglicosidases (EC 3.2.1.3), que formam produtos de configuração β e dextrinas; e α -glicosidases (EC 3.2.1.20) que formam as α -glicoses (BERTOLDO; ANTRANIKIAN; 2002). As β -amilases hidrolisam especificamente as ligações α -1,4, e são produzidas principalmente por vegetais, sendo a soja a melhor fonte de obtenção comercial, mas existem relatos de sua produção por micro-organismos, não sendo conhecidas β -amilases de origem animal. As glicoamilases são capazes de romper tanto ligações α -1,4, quanto α -1,6, tendo mais afinidade pelas primeiras, e sendo produzidas principalmente por fungos filamentosos (KOBLITZ, 2010).

As enzimas desramificantes são amilases que tem alta afinidade pela ligação α -1,6. Destacam-se as isoamilases (EC 3.2.1.68), que clivam ligações da amilopectina e dextrinas ramificadas (não atuando satisfatoriamente sobre amilopectina nativa, e nem tendo capacidade de hidrolisar isomaltose), sendo produzidas por vegetais e bactérias; e as pululanases (EC 3.2.1.41) produzidas por leveduras, que além de atuarem sobre a amilopectina, também hidrolisam o pululano (polímero de maltotrioses unidas por ligações α -1,6) (KOBLITZ, 2010).

As transferases são enzimas que fazem a quebra das ligações glicosídicas α -1,4 da molécula doadora, transferindo parte dessa molécula para um aceptor glicosídico e formando uma nova ligação. Essa transglicosilação pode ser intermolecular ou intramolecular. As ciclodextrina-glicosiltransferases (CGTase, EC 2.4.1.19) e as amilomaltases (EC 2.4.1.25) formam uma nova ligação tipo α -1,4; sendo que a primeira forma produtos cíclicos, e a segunda, produtos lineares. Já, as enzimas ramificadoras (EC 2.4.1.18) formam uma ligação α -1,6 (VAN DER MAAREL et al., 2002).

2.5 Pectinases

As pectinases são enzimas capazes de reconhecer as ligações glicosídicas do tipo α -1,4 entre unidades de ácido galacturônico (principal monômero constitutivo da pectina) e seu derivado metoxilado, hidrolisando-as; ou promover a desesterificação da pectina. São produzidas por vegetais e micro-organismos, tendo como ponto de

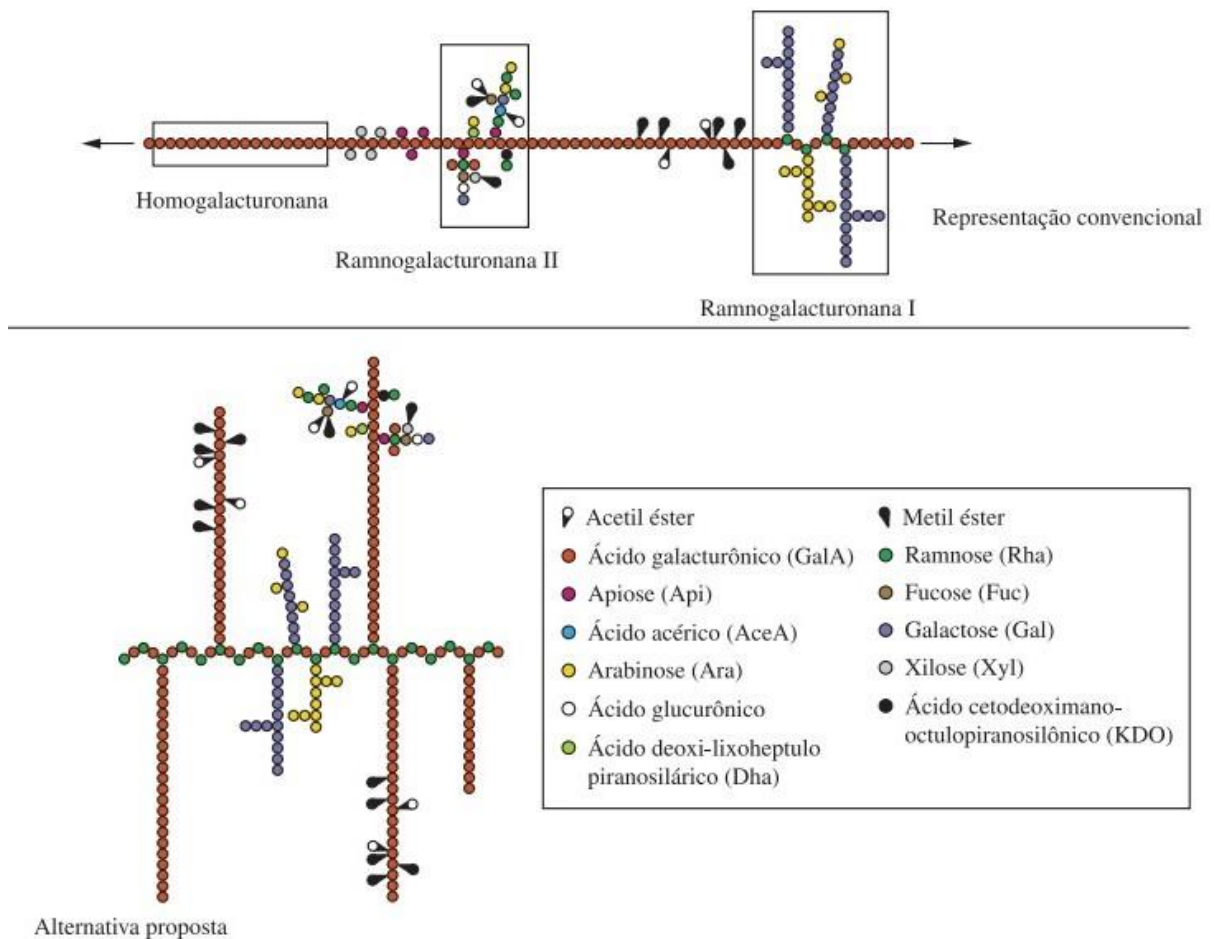
atuação a lamela média e a parede celular primária vegetal. No primeiro caso, as enzimas endógenas atuam de forma a promover o afrouxamento da parede celular ao longo do processo de multiplicação, desenvolvimento, maturação e senescência celular. No segundo caso, as enzimas exógenas atuam de modo a facilitar o acesso do micro-organismo ao interior da célula vegetal, permitindo maior infectividade e/ou obtenção de nutrientes (KOBBLITZ, 2010; COSTA, 2019).

As pectinases são aplicadas em diferentes processos industriais, como extração de sucos e óleos; controle da turbidez, viscosidade e clarificação de alguns tipos de bebidas; branqueamento do papel; tratamento de fibras têxteis; produção de derivados de interesse à saúde humana; agregação de propriedades sensoriais e nutricionais a produtos alimentícios; entre outros (SANTI; BERGER; SILVA, 2014). Conforme Melo (2021), dentre os micro-organismos com maior emprego na produção de pectinases de interesse biotecnológico, destacam-se os fungos filamentosos, capazes de produzir elevados títulos de concentrações proteicas.

O principal substrato de atuação das pectinases são as pectinas, uma família heterogênea de substâncias pécticas, formadas por oligo e polissacarídeos, que em conjunto dão origem a uma macromolécula complexa. Apesar da constituição molecular variada, as substâncias pécticas têm em comum uma estrutura molecular esquelética formada por uma cadeia linear de ácidos D-galacturônicos (um derivado oxidado do monossacarídeo galactose) unidos entre si por ligações do tipo α -1,4. Algumas dessas unidades monoméricas podem estar metiladas, acetiladas ou ligadas a açúcares como a D-apiose, L-arabinose, L-ramnose, D-fucose, D-galactose, D-xilose e alguns ácidos específicos (CANTERI et al., 2012).

A combinação entre os monossacarídeos presentes na molécula é diversa, dificultando a elaboração de um esquema estrutural único. Entretanto, Willats, Knox e Mikkelsen (2006), propuseram uma representação convencional, onde a macromolécula é formada basicamente por três agrupamentos distintos, sendo eles: homogalacturonana, a ramnogalacturonana I e a ramnogalacturonana II. A partir de outros estudos e com novas evidências analíticas, uma estrutura hipotética alternativa, foi proposta (Figura 12) (CANTERI et al., 2012).

Figura 12 – Representação esquemática da estrutura das substâncias pécicas.



Fonte: Willats, Knox e Mikkelsen (2006), adaptado por Canteri et al. (2012).

A parte homogalacturonana é basicamente linear e formada pela sequência de de ácidos galacturônicos unidos por ligações $\alpha(1\rightarrow4)$. Estima-se que pode corresponder a 60-65% de toda a pectina, sendo predominante em tecidos reprodutivos como frutas e sementes (VORAGEN et al., 2009). A ramnogalacturonana I é a combinação entre ácido galacturônico dextrogiro e ramnose levogira, unidas por ligações $\alpha(1\rightarrow2)$, o que possibilita a adição de novas cadeias de glicanos ligadas à ramnose, como a arabinose e galactose, por exemplo. Estima-se que este agrupamento corresponda a aproximadamente 20 a 35% das substâncias pécicas (ATMODJO; HAO; MOHNEN, 2013). A ramnogalacturonana II é a variação mais complexa e menos presente na pectina, ocupando 10% de toda a composição. Nela há a presença de açúcares pouco comuns, como a apiose e os ácidos deoxi-lixoheptulo piranosídico (Dha) e cetodeoximano-octulopiranosilônico (KDO). Pode conter ainda estruturas secundárias ligadas a cadeia galacturônica, sendo dois

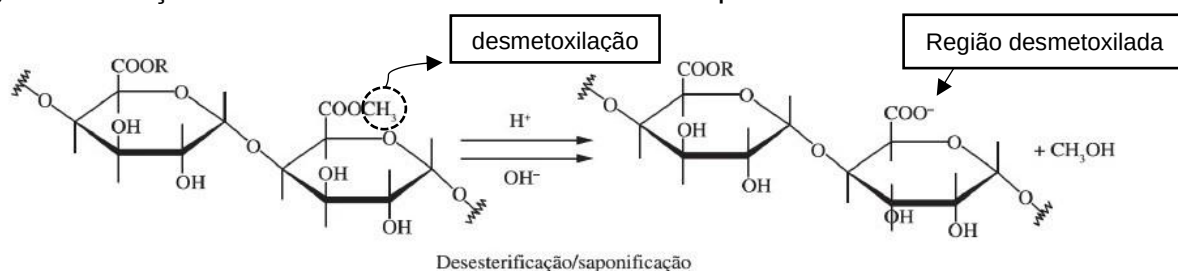
dissacarídeos, um octassacarídeo e um nonassacarídeo, estando ou não metilados ou acetilados (VORAGEN et al., 2009; ATMODJO; HAO; MOHNEN., 2013).

Em termos genéricos as substâncias pécticas podem ser agrupadas em pectina, ácido pectínico e ácido péctico (pectato). Basicamente, a diferença entre essas três denominações está relacionada a grau de metoxilação dos grupos carboxílicos do ácido galacturônico. As pectinas formam geis em meio ácido e presença de açúcar, podendo apresentar de 75% ou mais de seus ácidos galacturônicos esterificados com metanol. Os ácidos pécticos praticamente não se apresentam esterificados, e os ácidos pectínicos, são denominações intermediárias, onde alguns monômeros de ácido galacturônico estão metoxilados. Por isso, esses últimos são também denominados de pectinas de baixo teor de metoxilação (KOBELITZ, 2010).

As pectinases podem ser classificadas conforme seu modo de ação, substrato preferencial e reação catalisada. De forma geral, são agrupadas em desmetoxilantes (esterases) e despolimerizantes, podendo estas últimas atuarem como hidrolases ou liases (ou seja, rompem a ligação α -1,4, e formam uma dupla ligação entre os carbonos 4 e 5 de um dos ácidos galacturônicos) (UENOJO; PASTORE, 2007).

As enzimas desmetoxilantes, também conhecidas como pectinaesterases ou pectina-metil-esterases são hidrolases que atacam a ligação éster, desmetoxilando ácidos galacturônicos esterificados com o grupamento metil, dando origem a pectato e metanol (Figura 13). Essa ação tem como efeito, maior susceptibilidade do polissacarídeo ao ataque por enzimas despolimerizantes, e também maior facilidade de precipitação na presença de cálcio. São produzidas tanto por vegetais, quanto por micro-organismos, sendo que as de origem fúngica agem totalmente ao acaso sobre a molécula de pectina, gerando pectinas com baixo teor de metoxilação, porém resistentes à precipitação por cálcio (KOBELITZ, 2010).

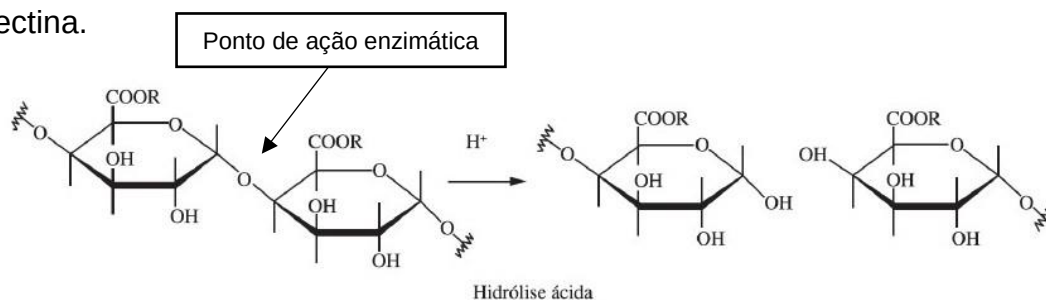
Figura 13 – Ação das esterases sobre a molécula de pectina.



Fonte: Adaptado de Canteri et al. (2012).

As pectinases despolimerizantes rompem as ligações glicosídicas α -1,4, podendo atuar preferencialmente sobre pectinas com alto teor de metoxilação (sendo denominadas de polimetilgalacturonases) ou sobre pectinas com baixo teor de metoxilação (sendo denominadas de poligalacturonases). Podem ter ação endo- ou exo- e hidrolisar a cadeia de pectina randomicamente ou a partir de sua extremidade, respectivamente (Figura 14) (CANTERI et al., 2012).

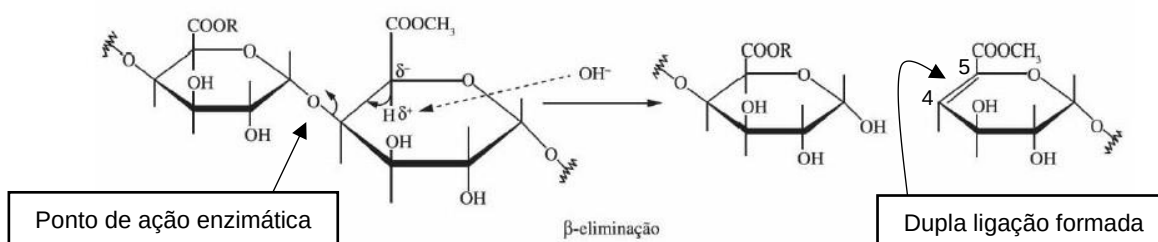
Figura 14 – Ação das polimetilgalacturonases e poligalacturonases sobre a molécula de pectina.



Fonte: Adaptado de Canteri et al. (2012). R = CH₃ (polimetilgalacturonases); R = OH (poligalacturonases).

As liases, atacam a ligação α -1,4 lisando-as por β -eliminação e formando uma dupla ligação entre os carbonos 4 e 5 de um dos monômeros da sequência. Podem atuar de forma endo- ou exo- sobre a molécula de pectina, e algumas (pectinaliases ou poligalacturonato liases) serem ativadas por cálcio ou outros íons divalentes (Figura 15). Um outro grupo de pectinases, também foi detectado em fungos filamentosos, sendo denominadas de ramnogalacturonases. Estas são capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas entre ramnose e ácidos galacturônico, nas regiões ramificadas das substâncias pécicas, liberando diferentes oligômeros formados por ácido galacturônico e açúcares neutros (ramnose, arabinose, galactose e xilose) (KOBLITZ, 2010).

Figura 15 – Ação de β -eliminação catalisada por liases sobre a molécula de pectina.



Fonte: Adaptado de Canteri et al. (2012).

2.6 Desafios e alternativas atuais associados ao problema dos resíduos agroindustriais

As perdas e desperdícios de alimentos na íntegra e/ou subprodutos agrícolas e agroindustriais, que poderiam ser aproveitados em outros processos e para elaboração de diferentes produtos destinados a distintos setores, ocorrem no mundo todo como consequências da ineficiência ou inadequado manejo ao longo da cadeia produtiva, tendo como causas questões econômicas, políticas, culturais, tecnológicas, dentre outras (DELIBERADOR, et al. 2018; BARROZO et al., 2019).

Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO/ONU, 2016), estima-se que aproximadamente um terço de todo o alimento produzido, ou seja cerca de 1,3 bilhão de toneladas são desperdiçados no mundo anualmente. Tal situação gera inúmeros efeitos sejam eles econômicos, com prejuízos anuais variando em torno de US\$ 750 bilhões de dólares, quanto de segurança alimentar e ambiental, comprometendo assim a sustentabilidade, uma vez que cerca de 30% dos alimentos produzidos no planeta são descartados, perdidos, estragam-se ou são deteriorados por pragas (MUNESUE; MASUI; FUSHIMA, 2015; PEIXOTO; PINTO, 2016).

Calcula-se que 54% das perdas agroindustriais de alimentos no mundo ocorram nas etapas da produção, da manipulação pós-colheita e da armazenagem dos produtos, sendo esses desafios mais intensos nos países em desenvolvimento; e que os 46% restantes são desperdiçados nas etapas de processamento e distribuição, estando associados especialmente ao comportamento inadequado constatado principalmente nas regiões mais industrializadas ou de renda média mais elevada (CAISAN, 2018; BARROZO et al., 2019).

Vários recursos são usados para se gerar sobras e subprodutos não consumidos na cadeia agroindustrial, mas que ainda apresentam nutrientes e energia que poderiam ser aproveitados. Só no Estados Unidos, por exemplo, se perde ou consome com esses produtos descartados, 30% dos fertilizantes, 31% das terras agrícolas, 25% da água doce total e 2% da energia (MUNESUE; MASUI; FUSHIMA, 2015). Associado a isso, ainda existe a possibilidade de desvalorização e desvantagens competitivas das empresas vinculadas ao setor agroindustrial, decorrentes não somente das pressões e legislações governamentais, como também

da maior exigência dos consumidores perante à oferta de produtos e serviços que não prejudiquem demasiadamente os recursos naturais (ARAÚJO et al., 2018).

Segundo Ribeiro, Jaime e Ventura (2017), o consumo de serviços e principalmente produtos derivados do setor agroindustrial tem sido impulsionado por problemáticas baseadas em novos elementos determinantes do processo decisório de uso e compra, sendo eles: qualidade, saúde e bem-estar, transparência, segurança e menores impactos ao meio ambiente. Nesse sentido, estudos sobre a perda e o desperdício de alimentos, associados ao aproveitamento eficiente e valorativo das sobras, têm se tornado constantes, desafiando os sistemas agroindustriais a encontrar novas formas de se reduzir o uso de recursos naturais e diminuir as externalidades negativas ao meio ambiente derivadas dos processos, produtos e serviços, como por exemplo, a disposição inadequada de rejeitos no solo, água ou ar (MCCARTHY; LIU, 2017; CAROTA et al., 2018; LIZARDI-JIMÉNEZ et al., 2019)

O setor agroindustrial, representando 25% do Produto Interno Bruto (PIB) do Brasil (ESTADO DE MINAS, 2020), participa significativamente do desenvolvimento do país, e vem adotando nos últimos anos novos processos de produção, aproveitamento e comercialização de produtos, visando um desenvolvimento mais sustentável (MOREIRA, 2019). Isso se deve não somente por uma regulamentação interna e externa mais exigente, mas também pela busca de uma maior visibilidade do setor e empresas perante aos clientes e consumidores.

A demanda por produtos dos inúmeros segmentos do setor agroindustrial consome recursos naturais e geram grandes quantidades de subprodutos e emissões, que necessitam ser devidamente manejados para que não provoquem problemas ambientais (FERRAREZE; BRAGA-JÚNIOR; BAPTISTA, 2018). Daí a necessidade da adoção de estratégias e ações de melhorias tecnológicas que visem buscar a excelência no processo produtivo.

Dentre tais estratégias, o emprego dos subprodutos agroindustriais como substrato para o cultivo de micro-organismos, com consequente produção de bioprodutos, biomassa e/ou energia têm se tornado uma alternativa promissora e sustentável, pois valores financeiros são agregados ao processo produtivo, gerando mais renda. Almeida et al. (2018), por exemplo, comparando o cultivo de *Pleurotus ostreatus* em diferentes substratos de origem agroindustrial, verificaram que a combinação de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com farelo de trigo, foi bem eficiente ao desenvolvimento do fungo, podendo complementar a renda do agricultor,

especialmente porque esta espécie pode ser comercializada por ser considerada comestível. Barbosa, Rodrigues e Oliveira (2017) também evidenciaram potencialidades do emprego de caroço de açaí no aumento de produtividade do mesmo fungo.

A bioprospecção de micro-organismos produtores de enzimas na presença de subprodutos agroindustriais também tem sido muito pesquisada, pois as enzimas ou coquetéis enzimáticos obtidos podem ser empregados em distintos processos promovendo melhorias de rendimento, qualidade e redução de custos e energia. Exemplo disso é demonstrado no estudo realizado por Silva J. et al. (2018), onde os autores empregaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae* JAY-270, sobre resíduos da coroa de abacaxi (*Ananas comosus*) pré-tratada com complexo enzimático celulolítico comercial (Cellic® CTec2 – Cellulase; Novozymes Latin America Ltda), e obtiveram boa produção ($18,80 \text{ g L}^{-1}$) de bioetanol de segunda geração, num período de 24 horas, com maior pico ($31,10 \text{ g L}^{-1}$) nas primeiras 4 horas de fermentação, demonstrando a importância da aplicação de enzimas para obtenção de maior rendimento etanólico.

Dentre as formas de obtenção de enzimas microbianas, o CES vêm sendo amplamente estudado e utilizado (SANTOS P. et al., 2018), especialmente no Brasil. Pesquisas indicam que a adoção desse método de produção enzimática seja mais vantajoso que o cultivo submerso (CSm), pois exige uma menor quantidade de água, evitando contaminação devida à água livre no sistema; emprega como substrato, subprodutos agroindustriais de baixo custo; fornece um meio mais concentrado; a fermentação é realizada em condições similares ao *habitat* natural (especialmente quando se emprega os fungos filamentosos, como agente biológico fermentativo). Além disso, evita a repressão catabólica; demanda baixo investimento, empregando instrumentos e equipamentos de cultivo rotineiramente usados em laboratório; necessita de menor demanda energética associada à remoção de produto do meio fermentado e proporciona produtividades volumétricas consideráveis (PITOL et al., 2016; SUHAIMI et al., 2016; IDRIS et al., 2017; ORTIZ et al., 2017; RODRIGUES, et al., 2017).

As celulasas têm sido as enzimas mais produzidas por CES empregando-se subprodutos agroindustriais, em pesquisas brasileiras (SANTOS P. et al., 2018). Entretanto, não menos importantes, as amilases e pectinases também se destacam comercialmente, constituindo de 10 a 33% do mercado internacional de enzimas

(MUKESH KUMAR et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015), pois são aplicadas em diferentes processos e/ou empregadas em produtos sejam eles da área alimentícia, bebidas, têxtil, química, entre outros (POLIZELI; SILVA, 2016; AMIN; BHATTI; BILAL, 2019).

Considerando que 40% dos investimentos requeridos nos custos dos meios de cultivo estão associados à fonte de carbono (OLIVEIRA et al., 2015), sendo ainda o farelo de trigo e o fungo *A. niger*, o subproduto e agente biológico, mais usados nos processos fermentativos por CES (SANTOS P. et al., 2018), faz-se necessário testar alternativas empregando-se outros substratos e micro-organismos, a fim de se ampliar a obtenção de enzimas (PEREIRA et al., 2017; RAVINDRAN et al., 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar as atividades enzimáticas amilolítica e pectinolítica do fungo filamentoso *G. butleri*, isolado do solo do Cerrado, sobre distintos subprodutos derivados do processamento agroindustrial, empregando-se cultivo em estado sólido *in vitro* em diversas condições, com o intuito de se otimizar a produção das enzimas.

3.2 Objetivos específicos

a) Realizar teste piloto de cultivo da cepa fúngica isolada, em relação a meios de cultura específicos que permitam presumir a produção de amilases e pectinases pelo micro-organismo;

b) Averiguar o crescimento e expansão micelial da cepa fúngica ao longo do tempo, em meio de cultura padrão, sob diferentes temperaturas, visando selecionar os melhores parâmetros para o cultivo nos subprodutos agroindustriais;

c) Caracterizar físico-quimicamente os subprodutos agroindustriais, a serem usados como substrato nas fermentações, antes e após a umidificação com solução mineral nutritiva;

d) Cultivar a cepa fúngica em estado sólido sobre diferentes substratos derivados do processamento agroindustrial, em distintas temperaturas e sob um tempo mais razoável à fermentação obtido no item 3.2b;

e) Determinar as atividades amilolítica e pectinolítica da cepa fúngica, visando determinar o melhor tempo e temperatura de fermentação a ser adotado em testes subsequentes, empregando para isso os métodos dextrinizante e de determinação dos açúcares redutores pelo ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS);

f) Determinar o pico de maior atividade enzimática para a cepa fúngica, a partir da fermentação e dosagem, a cada 24 h por cinco dias, empregando-se a

temperatura, o método e os substratos que obtiveram melhores resultados no item 3.2e; monitorando-se também as atividades enzimáticas específicas e o teor de proteínas totais;

g) Realizar testes de otimização da produção de amilases e pectinases pela cepa fúngica, empregando planejamentos experimentais com combinação e variação de fatores, a partir dos resultados obtidos para os melhores substratos do item 3.2f.

h) Mensurar a redução percentual da viscosidade de uma solução padronizada de pectina, após ação de pectinases contidas nos extratos brutos enzimáticos obtidos por planejamento experimental.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A cepa fúngica de *G. butleri* (nomeada como IPS 8.2, referente ao ponto de coleta no ambiente amostrado) empregada nos testes foi previamente isolada do solo do Cerrado (Mato Grosso do Sul, Brasil), em uma propriedade rural particular do município de Inocência (Latitude: -20 01' 39,45232"; Longitude: -51 46' 16,08534") (SENNA, 2014), sendo molecularmente identificada, comparada e registrada no banco de dados GenBank (número de acesso KU686888) (SENNA, 2018). Está mantida sob congelamento (-18 a -20°C) em meio ágar *Sabouraud* (AS) inclinado com uma camada de óleo mineral estéril, junto a coleção de micro-organismos do laboratório de Biotecnologia e Bioprocessos do Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia da Faculdade de Engenharia da UNESP, Campus Ilha Solteira (SP).

Os subprodutos agroindustriais, de diferentes níveis granulométricos, usados como substrato para cultivo e fermentação do fungo foram cedidos por empresas da região de Ilha Solteira (SP) e arredores, sendo acondicionados em sacos plásticos identificados a -18°C, visando manter suas propriedades e não serem degradados por micro-organismos ou pragas.

4.1 Reativação da cepa e teste piloto de produção de amilases e pectinases

A cultura fúngica mantida em meio de armazenamento foi reativada em meios líquidos contendo amido e pectina, para a determinação da atividade lítica de amilase e pectinase, respectivamente, conforme metodologias adaptadas de Hankin e Anagnostakis (1975) e Alves et al. (2002). Para isso uma alçada da cultura foi transferida em condições assépticas, com auxílio de alça de platina, para frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL do meio de cultivo previamente esterilizado a 121°C por 15 minutos. Os frascos foram mantidos sob agitação a 120 rotações por minuto (rpm) em incubadora *Biochemical Oxygen Demand* (B.O.D.) a 35°C por 18 a 24 h.

O meio de cultivo líquido contendo amido apresentou a seguinte composição (1% amido em pó solúvel; 0,2% de peptona; 0,2% de extrato de levedura; 0,1% de fosfato de potássio dibásico – K_2HPO_4 ; 0,05% de sulfato de magnésio heptahidratado – $MgSO_4 \cdot 7H_2O$). Já o meio de cultivo para determinação da atividade pectinolítica foi

composto dos mesmos constituintes e nas mesmas proporções, excetuando o amido, que foi substituído pela pectina em pó de maçã.

Após turvação e desenvolvimento de um maciço de hifas no meio sob agitação, uma alçada de cada um dos inóculos foi estriada (em triplicata) em condições assépticas, na superfície de ágar amido e ágar pectina, sendo a placas de Petri incubadas invertidas em B.O.D. nas mesmas condições de tempo e temperatura empregadas para se reativar as cepas em meio líquido, até o desenvolvimento de colônias visíveis a olho nu. A composição química dos meios de cultivos sólidos, contendo amido e pectina, foi a mesma dos meios de cultivo líquidos, só sendo acrescentado 1,5% de ágar ágar em pó comercial.

Para verificação da atividade amilolítica, as culturas formadas sobre as placas contendo amido foram expostas à micropérolas de iodo que, ao se sublimar e entrar em contato com o meio de cultivo, se combinaram ao amido formando um complexo químico de cor azul, demonstrando assim, que o mesmo não foi degradado. A transparência ao redor das colônias fúngicas evidenciou a atividade amilolítica. A atividade pectinolítica foi verificada diretamente no meio de cultivo pela observação de halos transparentes ao redor das colônias formadas.

4.2 Determinação do crescimento e expansão micelial da cepa fúngica em meio de cultivo padrão sob distintas temperaturas

Visando determinar a eficiência de desenvolvimento de *G. butleri* em temperaturas diferenciadas, inóculos da cepa fúngica pura, previamente cultivados em AS a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ por 72 h, foram repicados em condições assépticas, em triplicata, no centro de placas de Petri contendo meio de cultivo estéril *Potato Dextrose Agar* (PDA), conforme metodologia adaptada de Benassi e Almeida (2018), com o auxílio de alça de platina. As placas foram incubadas invertidas em B.O.D. a 25, 30, 35 e $40^{\circ}\text{C} \pm 0,5$, por períodos de tempo correspondentes ao completo preenchimento das mesmas pelo micélio fúngico. O crescimento micelial (baseado na média do diâmetro dos limites das duas maiores bordas) das colônias para cada placa foi mensurado a cada 24 h, e a média das medidas de cada replicata por temperatura foram adotadas para comparação e escolha dos melhores parâmetros adotados em testes subsequentes.

4.3 Caracterização físico-química dos substratos agroindustriais

A caracterização físico-química dos subprodutos agroindustriais empregados como substratos nos testes fermentativos foi determinada pela mensuração inicial do teor de sólidos solúveis – SS (°Brix); densidade aparente (g mL^{-1}); potencial hidrogeniônico – pH; teor de umidade (%); teor de cinzas (%) e teor de açúcares redutores totais – ART (mg g^{-1}), de forma isolada e após a adição da solução mineral nutritiva (neste caso, só não foi mensurada a densidade aparente), segundo metodologias adotadas por Andrade et al. (2018), sendo todos os testes realizados em triplicata.

O teor de SS foi quantificado adicionando-se em frascos Erlenmeyer (125 mL), 9 mL de água destilada estéril e 1 g do respectivo substrato, sendo a suspensão mantida sob agitação (200 rpm) a 25°C por 1 h. A mistura foi filtrada em bomba de vácuo, empregando-se papel de filtro qualitativo (80 g m^{-2} ; $14 \mu\text{m}$) adaptado em funil de *Buchner*, para se separar o resíduo sólido do sobrenadante. A mensuração foi feita em refratômetro portátil *Abbe*, sendo o resultado expresso em °Brix, multiplicado por 10, devido à diluição empregada.

Para determinação da densidade aparente, o substrato foi adicionado sem compactação à proveta de 100 mL, previamente tarada em balança analítica, sendo o volume de massa ocupado mensurado conforme Equação 1 (Eq. 1).

$$\text{Densidade aparente (g mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{massa do resíduo}}{\text{volume ocupado}} \quad (\text{Eq. 1})$$

O pH foi determinado em potenciômetro digital de bancada, previamente calibrado com soluções-padrão (pH 4,0 e 7,0), partindo-se de uma suspensão de 10 g do substrato em 100 mL de água destilada estéril, seguida de agitação e precipitação.

O teor percentual de umidade foi calculado colocando-se aproximadamente 2 g do substrato em placa de *Petri* estéril de massa conhecida, previamente seca e tarada. O conjunto amostra-placa foi pesado e mantido em estufa de secagem a 105°C ± 2 por 24 h, sendo resfriado por 1 h em dessecador contendo sílica gel, e em seguida novamente pesado. A determinação da umidade foi feita por meio da Equação 2 (Eq. 2).

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{(\text{massa inicial amostra} - \text{massa final amostra}) \times 100}{\text{massa inicial da amostra}} \quad (\text{Eq. 2})$$

Para a determinação do teor percentual de cinzas pesou-se 2 g do substrato em cadinho de porcelana previamente calcinado a 600°C por 30 min., e resfriado em dessecador. O conjunto amostra-cadinho foi aquecido em forno mufla até 600°C por 3 horas, sendo reduzida a 200°C por mais 1 h. O conjunto amostra-cadinho foi mantido em dessecador até resfriamento total e em seguida pesado novamente, sendo a mensuração calculada pela Equação 3 (Eq. 3)

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{\text{massa final da amostra}}{\text{massa inicial da amostra}} \quad (\text{Eq. 3})$$

Para a determinação do teor de ART adicionou-se em frascos Erlenmeyer (125 mL) 10 g do substrato, 20 mL de água destilada estéril e 5 mL de HCl 1 M. A mistura foi agitada (200 rpm) a 25°C por 1 h. Em seguida, adicionou-se 2 mL de NaOH 1 M à mistura e promoveu-se a filtração em bomba de vácuo, empregando-se papel de filtro qualitativo (80 g m⁻²; 14 µm) adaptado em funil de *Buchner*, afim de separar o sobrenadante contendo os açúcares solúveis, do resíduo sólido.

Empregou-se o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), onde 0,5 mL do filtrado foi colocado para reagir com 2,5 mL do reagente de DNS, em tubo de ensaio mantido a 100°C por 10 min. e resfriado em banho de gelo por 5 min., sendo acrescido posteriormente 3 mL de água destilada estéril. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm, sendo o branco feito a partir de água destilada ao invés da amostra. Uma curva padrão (APÊNDICE A) empregando-se solução de glicose (0,1%) em diferentes concentrações foi utilizada para se transformar a leitura da absorbância em mg ART por mL de solução, e mensurar assim a concentração de ART por g de amostra (mg ART g⁻¹ de amostra).

4.4 Cultivo da cepa fúngica sob diferentes substratos agroindustriais e temperaturas

Partindo-se da escolha do melhor tempo de desenvolvimento micelial obtido no item 4.2, a cepa foi submetida a cultivo em estado sólido (CES), conforme metodologia

utilizada por Senna (2018), sob as mesmas temperaturas em B.O.D. sem agitação, empregando-se os seguintes substratos secos e triturados: farelo de trigo (2 mm) não lavado (Agromix, Bunge Alimentos S.A.); farelo de soja (2 mm) (Cargill Três Lagoas); sabugo de milho (2 mm) safra 2017; resíduos do fermentado de vinho de uvas Santa Isabel e Bordô (2 mm); casca de maracujá (2 mm); fibra do resíduo de processamento da mandioca (≥ 2 mm); palha de milho verde (0,5 mm) lavada; quirera de arroz (≥ 2 mm) e farinha do caroço de abacate ($\leq 0,5$ mm) liofilizado (Lote: GENE-8963, Jardim de Minas, Belo Horizonte).

As fermentações para cada substrato e temperatura foram realizadas em triplicata sem agitação, em frascos Erlenmeyer (250 mL), contendo 5 g do substrato previamente umedecido com 10 mL de solução mineral nutritiva (0,26% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,22% K_2HPO_4 ; 0,02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,03% CaCl_2), e esterilizados a 121°C por 15 min. Cinco discos (5 mm cada) miceliais de *G. butleri*, previamente cultivados em PDA a 35°C $\pm$ 0,5 por 72 h, foram transferidos assepticamente para os frascos. Após término de cada período de fermentação adicionou-se assepticamente aos frascos 50 mL de água destilada estéril, sendo esses agitados (100 ciclos min^{-1}) a 25°C $\pm$ 0,5, por 1 h. O fermentado obtido foi filtrado em gaze de algodão hidrofílico (13 fios cm^{-2}) esterilizado, sendo na sequência centrifugado a 10.000 *g* por 10 min., e o sobrenadante utilizado para determinação da atividade enzimática.

4.4.1 Determinação das atividades enzimáticas

A determinação das atividades amilolíticas e pectinolíticas dos extratos brutos obtidos no item 4.4 foi realizada empregando-se os métodos dextrinizante (FUWA, 1954; PONGSAWASDI; YAGISAWA, 1987) e de redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959) para amilases; e método DNS para as pectinases.

A mensuração da atividade amilolítica pelo método dextrinizante foi realizada pela medida indireta da capacidade absorviva dos extratos brutos, empregando espectrofotometria a 700 nm, considerando-se a formação do complexo azulado de interação do iodo com o amido. O controle e branco foram preparados e mensurados da mesma maneira, substituindo-se o extrato bruto enzimático e o substrato reativo (conforme o caso) pelo volume equivalente em água destilada estéril. A unidade de atividade enzimática dextrinizante (UI) foi definida como sendo a quantidade de

enzimas necessárias à redução de 10% da intensidade da cor do complexo iodo-amido por minuto, de acordo com a Equação 4. (Eq. 4).

$$U \text{ mL}^{-1} = [(abs.C - abs.R) \div abs.C] * (k) * (v \times t) * fd \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde:

abs.C = absorbância do controle;

abs.R = absorbância do meio reacional;

k = constante igual a 10;

v = volume do extrato bruto testado;

t = tempo de reação da metodologia;

fd = fator de diluição do extrato bruto enzimático.

A determinação das atividades amilolíticas e pectinolíticas pela redução do DNS foi mensurada por espectrofotometria a 540 nm, comparando-se as absorbâncias com curvas de calibração padronizada da solução do DNS, obtidas por diluições de solução de glicose e ácido D-galacturônico a 0,1%, respectivamente (APÊNDICE B). As medidas foram expressas em UI por mililitro de extrato bruto enzimático ($U \text{ mL}^{-1}$) ou por gramas de substrato ($U \text{ g}^{-1}$), que corresponde à quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de glicose ou ácido galacturônico (conforme o caso) por minuto de reação.

Para determinação da atividade enzimática empregou-se a Equação 5 (Eq. 5), onde o branco foi preparado substituindo-se os volumes dos extratos brutos e substratos reativos, pelo equivalente em água destilada estéril. Os controles foram preparados conforme os mesmos métodos do procedimento reacional, só que invertendo as etapas de adição dos reagentes (substrato $\rightarrow$ solução DNS $\rightarrow$ extrato bruto enzimático).

$$U \text{ mL}^{-1} = [(x) \div (v * t)] * fd \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde:

x = resultado da solução da equação da reta de calibração;

v = volume de extrato bruto enzimático;

t = tempo da reação em minutos;

fd = fator de diluição do extrato bruto enzimático.

4.4.2 Determinação do perfil das atividades enzimáticas e atividades específicas

A partir dos melhores resultados obtidos no procedimento dos itens 4.4 e 4.4.1 foram definidos os seguintes parâmetros para se determinar o perfil e pico da atividade enzimática de amilases e pectinases: método de redução do DNS; temperatura de incubação/fermentação de $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5$; e sete substratos (farelo de trigo, farelo de soja, sabugo de milho, resíduos do fermentado de vinho de uvas Santa Isabel e Bordô, casca de maracujá, palha de milho verde e farinha do caroço de abacate).

O monitoramento da produção enzimática foi realizado em triplicata para cada tipo de substrato e ao longo de 24, 48, 72, 96 e 120 h, empregando os mesmos passos e procedimentos adotados nos itens 4.4 e 4.4.1.

As médias dos resultados da atividade enzimática das replicatas foram plotadas em gráfico e comparadas visando-se definir os melhores substratos e temperatura para testes subsequentes de otimização.

As atividades específicas (U mg^{-1} proteína) foram determinadas dividindo-se o valor de atividade enzimática (U mL^{-1}), pela respectiva concentração de proteína total (mg mL^{-1}) dos extratos brutos obtidos.

4.4.3 Determinação de proteínas

Na quantificação de proteínas totais a mistura de reação foi composta de 500 μL do extrato bruto contendo enzimas, 450 μL do reagente A ($2,0 \text{ g L}^{-1}$ de $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $100,0 \text{ g L}^{-1}$ Na_2CO_3 ; $0,5 \text{ mL L}^{-1}$ solução NaOH a 1 N), seguida de incubação em banho-maria a 50°C por 10 min, e posterior resfriamento a $\pm 25^{\circ}\text{C}$. Na sequência, foi adicionado à mistura reacional, 50 μL do reagente B (2% $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 10% solução NaOH , a 1 N) e incubada à temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Posteriormente, foi adicionado 1,5 mL do reagente C (Folin Ciocalteu diluído em água destilada na proporção 1:15) à mistura, e incubada em banho-maria a 50°C por 10 min. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 650 nm, após a mistura atingir temperatura aproximada de $\pm 25^{\circ}\text{C}$, conforme o método Hartree-Lowry (HARTREE, 1972), sendo a concentração de

proteínas (mg mL^{-1}) determinada empregando-se a curva de calibração (APÊNDICE C) de soro albumina bovina – BSA ($0 - 300 \mu\text{g mL}^{-1}$).

4.5 Teste de otimização da produção de enzimas e mensuração da atividade pectinolítica por método viscosimétrico empregando planejamento fatorial 2^3

No teste de otimização da produção de amilases e pectinases por *G. butleri*, foi empregado planejamento experimental fatorial 2^3 com três repetições no ponto central (BARROS-NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010) totalizando-se 11 experimentos. Como variáveis independentes do planejamento foram adotados a combinação e variação das proporções dos dois substratos que obtiveram os melhores resultados no item 4.4.2; além da variação da umidade inicial desses, por meio de diferentes volumes de solução mineral nutritiva adicionados; como também pela variação da quantidade de CaCl_2 . As atividades enzimáticas, bem como o percentual de redução da viscosidade (nesse caso somente para determinação de pectinases) foram empregadas como variáveis resposta (dependentes) do delineamento experimental.

Os fatores codificados e o planejamento experimental encontram-se explicitados na Tabela 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 – Fatores codificados do planejamento experimental 2^3 .

Códigos	-1		0		1	
Substrato	A	B	A	B	A	B
Proporção dos substratos (g)	1,25	3,75	2,5	2,5	3,75	1,25
Volume (mL) de solução mineral nutritiva adicionada ao meio fermentativo	5,0		7,5		10	
Quantidade (%) de CaCl_2 na solução mineral nutritiva	0		0,015		0,03	

Fonte: Elaborado pelo autor.

A condução das fermentações e a mensuração das atividades enzimáticas dos 11 experimentos seguiram os mesmos procedimentos dos itens 4.4 e 4.4.1, sendo uma temperatura fixada, assim como o tempo de fermentação que apresentou os maiores picos de atividade enzimática determinado no item 4.4.2.

Tabela 2 – Planejamento experimental fatorial 2³, com três repetições do ponto central.

Experimento	Proporção dos substratos (g)			Volume (mL) de solução mineral nutritiva adicionada ao meio fermentativo		Quantidade (%) de CaCl ₂ na solução mineral nutritiva	
	A	B					
1	-1	(1,25)	(3,75)	-1	(5)	-1	(0)
2	+1	(3,75)	(1,25)	-1	(5)	-1	(0)
3	-1	(1,25)	(3,75)	+1	(10)	-1	(0)
4	+1	(3,75)	(1,25)	+1	(10)	-1	(0)
5	-1	(1,25)	(3,75)	-1	(5)	+1	(0,03)
6	+1	(3,75)	(1,25)	-1	(5)	+1	(0,03)
7	-1	(1,25)	(3,75)	+1	(10)	+1	(0,03)
8	+1	(3,75)	(1,25)	+1	(10)	+1	(0,03)
9	0	(2,5)	(2,5)	0	(7,5)	0	(0,015)
10	0	(2,5)	(2,5)	0	(7,5)	0	(0,015)
11	0	(2,5)	(2,5)	0	(7,5)	0	(0,015)

Fonte: Elaborado pelo autor.

A atividade do complexo pectinolítico também foi mensurada em duplicata pela capacidade de redução da viscosidade de uma solução padrão de pectina cítrica, conforme metodologia adaptada de Santos et al. (2008). Para isso, em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 100 mL de pectina cítrica 1% (p/v) preparada em solução tampão de acetato de sódio 200 mM pH 4,5; foi adicionado 10 mL do extrato bruto enzimático prosseguindo a reação por 7,14 min. a 26,5°C ± 1,5. Completado esse tempo e ainda na mesma temperatura, a viscosidade da mistura reacional foi mensurada em viscosímetro copo Ford (orifício 01). Ensaio branco foi feito adicionando-se à solução de pectina, 10 mL de tampão acetato 200 mM pH 4,5, ao invés do extrato enzimático. Pela diferença entre os valores da viscosidade do ensaio em branco com o extrato enzimático calculou-se a redução percentual da viscosidade devida à ação enzimática.

Os resultados de atividade enzimática bem como de redução percentual da viscosidade da solução de pectina cítrica foram submetidos à regressão múltipla e análise de variância (ANOVA), com subsequente possível construção de diagramas tridimensionais de superfície de resposta, visando-se obter modelos matemáticos empíricos ajustados (SANTOS et al., 2008; BARROS-NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010), de modo a investigar a influência das variáveis e a interação entre as mesmas,

assim como obter melhores valores dos parâmetros estudados que maximizem os resultados esperados. As análises estatísticas foram efetuadas nos *softwares* Protimiza Experimental Design e Excel 2016 (Microsoft®).

4.6 Planejamento um fator por vez, seguido de delineamento composto central rotacional (DCCR)

Com bases nos resultados e significância estatística obtidos no planejamento fatorial 2³ (item 4.5), foi realizado estudo da influência da fonte de substrato sobre a produção de amilases e pectinases, empregando-se planejamento um fator por vez. Para isso, diferentes combinações dos mesmos substratos do item 4.5 (A e B) foram testados, totalizando-se cinco experimentos. Os ensaios foram realizados em duplicatas, de 24 a 120 h, sendo o volume inicial de solução mineral nutritiva (10 mL) e a temperatura (35°C) padronizados (Tabela 3).

Tabela 3 – Planejamento um fator por vez, combinando-se os substratos A e B em diferentes proporções.

Experimento	Proporção dos substratos (g)		Proporção percentual
	A	B	
1	0,0	5,0	B (100%)
2	1,25	3,75	A:B (25%:75%)
3	2,5	2,5	A:B (50%:50%)
4	3,75	1,25	A:B (75%:25%)
5	5,0	0,0	A (100%)

Fonte: Elaborado pelo autor.

A determinação da variável resposta (atividades enzimáticas amilolíticas e pectinolíticas pelo método DNS) foi mensurada conforme procedimentos do itens 4.4 e 4.4.1. Também foi realizado monitoramento do teor de proteínas totais (mg mL⁻¹), conforme item 4.4.3; e determinação das respectivas atividades enzimáticas específicas.

Foi empregado ANOVA seguida de Teste de Tukey (5%) visando determinar a existência de diferenças entre os experimentos para cada tempo de cultivo e também entre os diferentes tempos de cultivo para um mesmo experimento, de modo a se obter os parâmetros (tempo de cultivo e combinação de substratos), que melhor influenciaram na mais alta produção de amilases e pectinases.

4.6.1 Planejamento experimental usando delineamento composto central rotacional (DCCR)

Visando determinar os fatores (teor de umidade inicial do meio de cultivo; temperatura e tempo de incubação) mais influentes sobre a variável resposta (atividades enzimáticas), e consequentemente obter o ponto ótimo de maior produção enzimática, assim como um modelo quadrático que descreva o processo, foi empregado Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com quatro repetições no ponto central (BARROS-NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Partindo-se da nomeação dos fatores x_1 = tempo de cultivo (h); x_2 = temperatura de incubação (°C); e x_3 = teor de umidade inicial do meio de cultivo, considerando o volume de solução mineral nutritiva (solução salina) adicionada (mL); e utilizando a Equação 6 (Eq. 6) foi possível a codificação e decodificação dos fatores estudados, possibilitando relacionar os valores reais para cada variável independente em estudo com os valores do DCCR.

$$x_n = \frac{x_0 - \bar{x}}{\sigma_x} \quad \text{Eq. 6}$$

Onde: x_n é o valor da variável codificada; x_0 é o valor da variável não codificada; $\bar{x}$ é o valor médio para cada variável; σ_x é o delta (variação) para cada fator.

As Tabelas 4 e 5 mostram os níveis, valores reais dos fatores e a matriz com os fatores codificados/decodificados para cada experimento.

Tabela 4 – Níveis codificados e reais das variáveis independentes do Delineamento composto central rotacional (DCCR).

Variáveis independentes (fatores)	Níveis codificados e reais dos fatores				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
x_1 (Tempo h)	27,8	36	48	60	68,2
x_2 (Temperatura °C)	21,6	25	30	35	38,4
x_3 (Umidade mL)	3,3	5	7,5	10	11,7

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os valores axiais α (-1,68; +1,68) foram calculados em função do número de variáveis independentes (k) por meio da Equação 7 (Eq. 7).

$$\alpha = (2^k)^{1/4} \quad \text{Eq. 7}$$

As faixas de variação (níveis) entre o limite inferior e superior de cada variável independente foram estabelecidas de acordo com os resultados obtidos nos testes experimentais anteriores.

Optou-se por realizar um DCCR com quatro repetições no ponto central, sendo o número total de experimentos obtido por meio da Equação 8 (Eq. 8).

$$n = 2^k + 2k + pc \quad \text{Eq. 8}$$

Onde: n é quantidade de experimentos totais do DCCR; k é o número de fatores; pc é a quantidade de experimentos no ponto central.

Aplicou-se análise de regressão múltipla e ANOVA, com subsequente possível construção de diagramas tridimensionais de superfície de resposta, visando-se obter modelos empíricos ajustados, de modo a investigar a influência das variáveis e a interação entre as mesmas, assim como obter melhores valores dos parâmetros estudados que maximizem os resultados esperados. As análises estatísticas foram efetuadas nos *softwares* Protimiza Experimental Design e Excel 2016 (Microsoft®).

Tabela 5 – Matriz do planejamento experimental DCCR (valores decodificados e codificados) para os fatores umidade (%); temperatura de incubação (°C); e tempo de cultivo (h).

Experimento	Fatores reais* (valores codificados)				
	Umidade (%)**		Temperatura (°C)		Tempo (h)
1	53,15	(-1)	25	(-1)	36 (-1)
2	53,15	(-1)	25	(-1)	60 (+1)
3	53,15	(-1)	35	(+1)	36 (-1)
4	53,15	(-1)	35	(+1)	60 (+1)
5	66,76	(+1)	25	(-1)	36 (-1)
6	66,76	(+1)	25	(-1)	60 (+1)
7	66,76	(+1)	35	(+1)	36 (-1)
8	66,76	(+1)	35	(+1)	60 (+1)
9	45,21	(-1,68)	30	(0)	48 (0)
10	70,94	(+1,68)	30	(0)	48 (0)
11	61,37	(0)	22	(-1,68)	48 (0)
12	61,37	(0)	38	(+1,68)	48 (0)
13	61,37	(0)	30	(0)	28 (-1,68)
14	61,37	(0)	30	(0)	68 (+1,68)
15	61,37	(0)	30	(0)	48 (0)
16	61,37	(0)	30	(0)	48 (0)
17	61,37	(0)	30	(0)	48 (0)
18	61,37	(0)	30	(0)	48 (0)

*Os valores reais dos fatores (temperatura e tempo de cultivo) foram matematicamente arredondados, visando facilitar o monitoramento durante os testes experimentais.

**A umidade (%) inicial do meio de cultivo foi calculada após adição da solução mineral nutritiva e autoclavação, conforme Equação 2 (item 4.3).

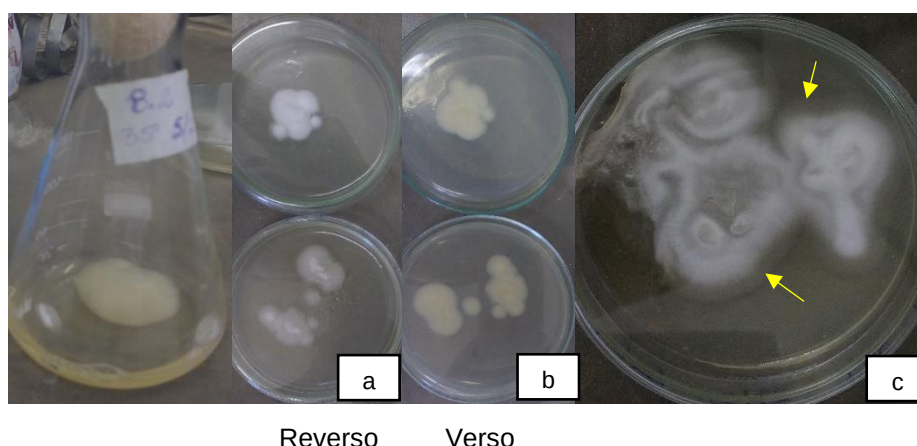
Fonte: Elaborado pelo autor.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teste piloto de produção de amilases e pectinases

Foi observado qualitativamente crescimento da cepa fúngica de *G. butleri* IPS 8.2, com formação de micélio visível a olho nu, e halos transparentes de degradação ao redor das colônias, em um período de até 24 h, tanto em meio líquido quanto em meio sólido contendo amido e pectina (Figura 16).

Figura 16 – Desenvolvimento celular de *Gongronella butleri* a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ por 24 horas, em meio líquido (a), e sólido (b, c), contendo amido.



As setas amarelas indicam o halo transparente ao redor da colônia em meio sólido.

Fonte: Autoria própria.

Tal evidência corrobora estudos recentes que demonstram a potencialidade e versatilidade metabólica que o fungo filamentoso possui para hidrolisar e/ou se utilizar de diferentes substratos como fonte principal de carbono e/ou energia.

Benassi e Almeida (2018) reportaram altas atividades amilolíticas do substrato amido (1%), em fungos da mesma ordem taxonômica empregada no presente estudo. Foi verificada atividade de $2,25 \text{ U mL}^{-1}$ em um isolado de *Mucor* sp. e $1,63 \text{ U mL}^{-1}$ em dois isolados de *Rhizopus* sp., a 35°C por 48 h.

Santos et al. (2016) por exemplo, verificaram o potencial de produção de β -glicosidade por *G. butleri* em diferentes subprodutos agroindustriais (casca de arroz, farelo de trigo, farelo de soja, palha de milho, espiga de milho), tendo a cepa apresentado maior atividade de produção enzimática quando cultivado em farelo de trigo ($213,6 \text{ U g}^{-1}$ de substrato). Cavalheiro et al. (2017), empregando o mesmo fungo,

também observaram a capacidade de produção de amilases em palha e espiga de milho, casca de arroz, farelo de trigo e de soja, como principais fontes de carbono disponíveis no meio.

Martins et al. (2017) relataram altas taxas de degradação do fungicida sistêmico metalaxyl [metil N-(2,6-dimetil-fenil)-N-(metoxyacetil)-alaninato], evidenciando a capacidade da cepa de *Gongronella* sp. isolada do solo, de utilizar o composto como principal fonte de carbono e energia. Hu et al. (2019) verificaram em um sistema de co-cultura que *Gongronella* sp. w5 na presença de sacarose produziu glicose e frutose por meio de uma invertase intracelular, estimulando a produção de lacase por sintrofismo em *Coprinopsis cinerea*. Seki, Nishiyama e Mitsutomi (2019) conseguiram purificar uma nova exoquitinase a partir do filtrado da cultura de uma cepa de *G. butleri*.

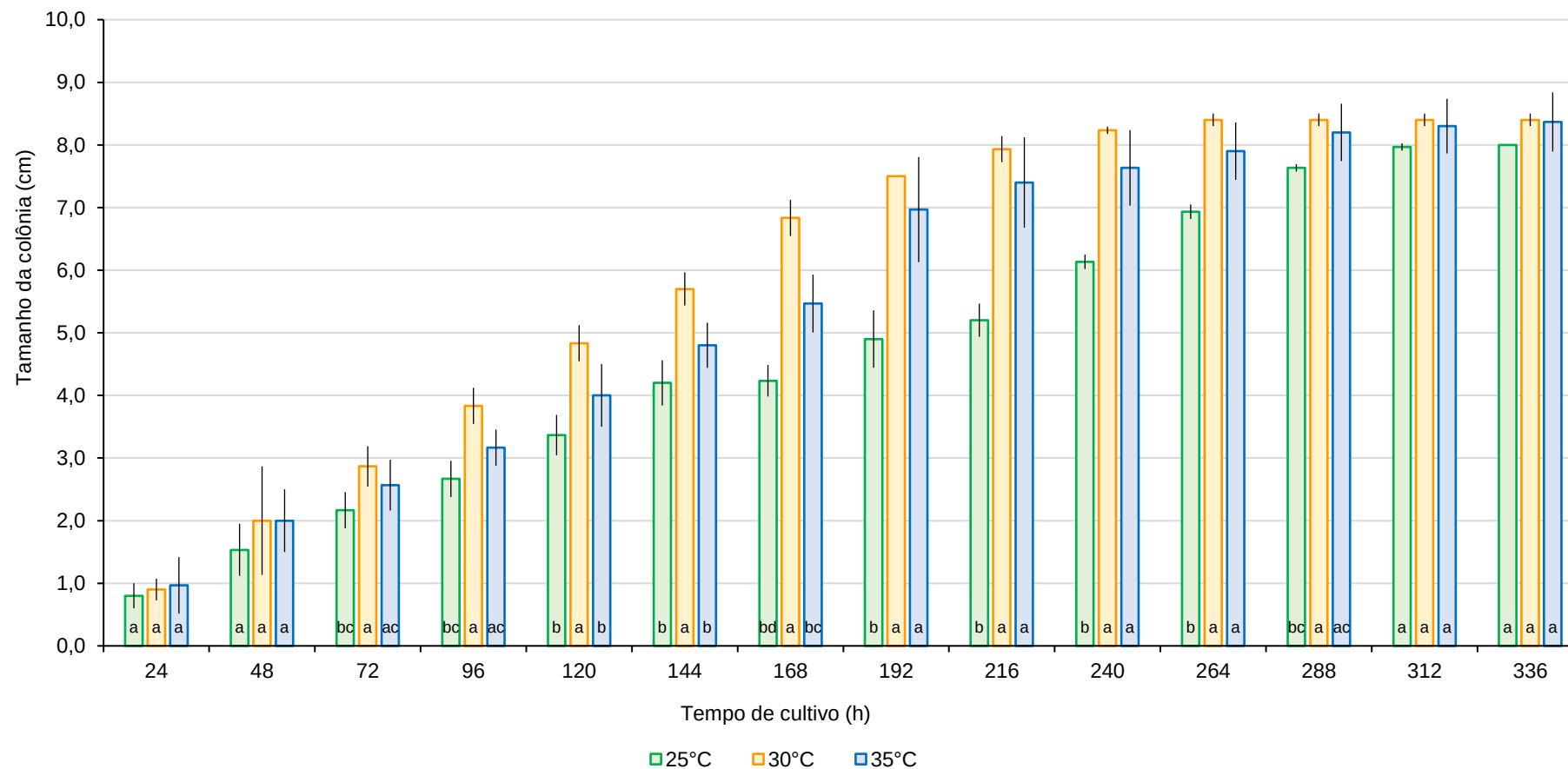
Estudo realizado por Senna et al. (2018) com a mesma cepa usada no presente estudo evidenciou considerável produção de xilanases (493,5 U g⁻¹ de substrato) empregando farelo de trigo como substrato durante 72 h de fermentação à 30°C.

5.2 Crescimento e expansão micelial de *G. butleri* IPS 8.2 em ágar PDA, ao longo do tempo, em distintas temperaturas

O menor tempo do crescimento micelial adotado para realização de testes e fermentações posteriores foi o de 72 h (Figura 17), haja visto ser o tempo onde foi observada a primeira diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (diferentes temperaturas de incubação) testados.

A escolha desse tempo de cultivo foi também pautada pelo fato dele encontrar-se dentro da faixa de 24 a 96 h, período considerado como corrente para emprego em aplicações industriais (COELHO et al., 2001), além de apresentar a menor variância estatística (APÊNDICE D) entre os três tratamentos empregados, corroborando a maior homogeneidade entre as replicatas das diferentes amostras.

Figura 17– Crescimento micelial (cm) médio ($\pm$ desvio padrão) de *Gongronella butleri* em diferentes temperaturas ao longo do tempo, em *Potato Dextrose Agar* (PDA).



Fonte: Elaborado pelo autor. Médias com letras diferentes dentro de um mesmo agrupamento, diferem entre si ($p \leq 0,05$).

A escolha da temperatura foi fixada em 35°C, pois além de não ter sido anteriormente empregada como parâmetro inicial em estudos preliminares de fermentação, que adotaram o mesmo fungo e/ou a mesma cepa (SANTOS et al., 2016; CAVALHEIRO et al., 2017; SENNA et al., 2018); a expansão micelial não diferiu estatisticamente ($p \leq 0,05$) do tratamento realizado a 30°C em um período de 72 h (Figura 17).

Comparando a taxa de crescimento micelial (cm h^{-1}) do presente estudo, com um trabalho realizado por Benassi e Almeida (2018), que isolaram e testaram em PDA 48 fungos filamentosos coletados de amostras ambientais em Minas Gerais, verifica-se que a taxa de crescimento micelial de *G. butleri* a 35°C ($0,0356 \text{ cm h}^{-1}$) apresentou-se superior a 62% dos isolados coletados pelas autoras, que constataram média de crescimento de $0,0184 \text{ cm h}^{-1}$. Dentre os gêneros fúngicos relatados pelas pesquisadoras, 83% estavam associados a *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Acremonium*, *Mucor* e *Rhizoctonia*.

Estudo do crescimento de *Trametes* sp. e *Pycnoporus sanguineus* (FERREIRA et al., 2016), fungos degradadores de madeira e consequentemente produtores de enzimas de interesse biotecnológico, isolados em Manaus (AM), também demonstraram taxas médias de crescimento de $0,00285 \text{ cm h}^{-1}$ e $0,00229 \text{ cm h}^{-1}$, respectivamente, durante 12 dias a 35°C sobre ágar malte (2%). É importante ressaltar que além de tais fungos serem basidiomicetos, foi empregado um meio de cultura diferente do utilizado na presente pesquisa, o PDA, que além de conter amido de batata, também têm dextrose. Segundo Moore-Landecker (1996), meios de cultivo contendo alta concentração de carboidratos tendem a estimular maior crescimento micelial. Tal característica também foi observada por Cano et al. (2020) ao comparar a diferença significativa ($p \leq 0,01$) no crescimento micelial a 25°C por 192 h, de *Colletotrichum graminicola* (ascomiceto) em ágar PDA a 3,9% ($0,0430 \text{ cm h}^{-1}$) e ágar-água 2% ($0,00391 \text{ cm h}^{-1}$).

Conforme observado na Figura 17, o crescimento micelial de *G. butleri* aumentou linearmente com o tempo para todas as temperaturas testadas, atingindo em 30 e 35°C todo o diâmetro da placa (85 mm) por volta de 264 h (11 dias). Característica similar de crescimento micelial em PDA foi observado em cepas de *Cunninghamella* sp. (um fungo também da ordem Mucorales) isoladas do solo de Gurupi (TO). Entretanto, a completa ocupação da placa ocorreu à temperatura de 28°C em um período de 96 h (ANDRADE et al., 2015). Segundo classificação adotada

por esses mesmos autores, a velocidade de crescimento de *G. butleri*, pode ser considerada como intermediária a 30 e 35°C em PDA, haja visto que o tempo para o micélio ocupar toda a placa está na faixa de 8 a 14 dias. Não foi observado desenvolvimento de *G. butleri* a 40°C, fato também relatado em 16,7% das amostras coletadas por Benassi e Almeida (2018), estando entre estas, fungos da mesma ordem taxônômica de *G. butleri*.

5.3 Características físico-químicas dos subprodutos agroindustriais

Quando tratamos de CES empregando subprodutos agroindustriais, diferentes são os fatores que podem interferir no desenvolvimento do micro-organismo e, conseqüentemente, no desempenho do processo fermentativo, sendo um deles as características físico-químicas do substrato utilizado.

Os parâmetros físico-químicos referem-se aos sete subprodutos agroindustriais (excetuando-se fibra do processamento da mandioca e quirera de arroz), empregados como substratos, que apresentaram os melhores resultados para os testes de determinação de atividade enzimática (item 5.4). Os parâmetros mensurados nos substratos sem e após adição da solução mineral nutritiva estão apresentados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 6 - Parâmetros (médias $\pm$ desvio padrão) físico-químicos dos substratos agroindustriais, sem adição de solução mineral nutritiva, empregados no cultivo em estado sólido de *Gongronella butleri*.

Subtrato	pH	Densidade aparente (g mL ⁻¹)	Sólidos solúveis (°Brix)	Açúcares redutores totais (mg g ⁻¹)	Teor de umidade (%)	Teor de cinzas (%)
FT	6,59 $\pm$ 0,11 ^a	0,35 $\pm$ 0,01 ^{bdfgi}	15,3 $\pm$ 4,04 ^{bdegi}	0,23 $\pm$ 0,01 ^{bc}	12,57 $\pm$ 0,09 ^a	5,03 $\pm$ 0,10 ^{bdfg}
FS	6,43 $\pm$ 0,06 ^{bc}	0,60 $\pm$ 0,03 ^a	28,0 $\pm$ 1,00 ^{ac}	0,02 $\pm$ 0,00 ^{bdfhj}	11,23 $\pm$ 0,58 ^{ac}	6,50 $\pm$ 0,03 ^{bde}
SM	6,32 $\pm$ 0,25 ^{ace}	0,33 $\pm$ 0,01 ^{bdfgijl}	2,0 $\pm$ 0,00 ^{bdfhjlm}	0,03 $\pm$ 0,02 ^{bdfhj}	6,17 $\pm$ 0,15 ^{bdfhi}	1,11 $\pm$ 0,05 ^{bdfhjlm}
UV	3,56 $\pm$ 0,06 ^{bdfhjlm}	0,46 $\pm$ 0,00 ^{bce}	19,0 $\pm$ 1,00 ^{bde}	0,13 $\pm$ 0,02 ^{bdeg}	5,55 $\pm$ 0,06 ^{bdfhj}	10,41 $\pm$ 1,06 ^a
PM	5,43 $\pm$ 0,25 ^{bdfhi}	0,37 $\pm$ 0,01 ^{bdfg}	18,3 $\pm$ 0,58 ^{bdeg}	0,14 $\pm$ 0,01 ^{bde}	5,03 $\pm$ 0,27 ^{bdfhj}	2,05 $\pm$ 0,04 ^{bdfhjl}
FA	6,01 $\pm$ 0,21 ^{bcegi}	0,57 $\pm$ 0,01 ^{ac}	10,0 $\pm$ 0,00 ^{bdfhil}	0,10 $\pm$ 0,00 ^{bdfgi}	9,98 $\pm$ 0,10 ^{bcegi}	4,54 $\pm$ 0,04 ^{bdfhi}
CM	3,93 $\pm$ 0,12 ^{bdfgijl}	0,27 $\pm$ 0,00 ^{bdfhjlm}	35,0 $\pm$ 4,93 ^a	0,34 $\pm$ 0,01 ^a	11,07 $\pm$ 0,13 ^{bce}	7,88 $\pm$ 0,01 ^{bc}

Fonte: Elaborado pelo autor. FT = farelo de trigo (2 mm); FS = farelo de soja (2 mm); SM = sabugo de milho (2 mm); UV = resíduo do fermentado de vinho de uvas Santa Isabel e Bordô (2 mm); palha de milho (0,5 mm); FA = farinha do caroço de abacate ($\leq$ 0,5 mm); CM = casca de maracujá (2 mm). Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ($p \leq 0,05$).

Tabela 7 - Parâmetros (médias $\pm$ desvio padrão) físico-químicos dos substratos agroindustriais adicionados da solução mineral nutritiva (10 mL) empregados no cultivo em estado sólido de *Gongronella butleri*.

Substrato	pH	Sólidos solúveis (°Brix)	Açúcares redutores totais (mg g ⁻¹)	Teor de umidade (%)	Teor de cinzas (%)
FT	6,40 $\pm$ 0,02 ^{ac}	10,0 $\pm$ 0,00 ^{bceg}	0,07 $\pm$ 0,01 ^{bde}	69,43 $\pm$ 0,42 ^{bc}	1,91 $\pm$ 0,01 ^{bdfg}
FS	6,42 $\pm$ 0,02 ^a	12,3 $\pm$ 0,58 ^a	0,02 $\pm$ 0,00 ^{bdfhj}	68,69 $\pm$ 1,18 ^{bce}	2,33 $\pm$ 0,07 ^{bde}
SM	5,18 $\pm$ 0,03 ^{bdfg}	2,3 $\pm$ 0,58 ^{bdfhjm}	0,02 $\pm$ 0,00 ^{bdfhj}	65,97 $\pm$ 0,44 ^{bdfhil}	0,60 $\pm$ 0,02 ^{bdfhjm}
UV	4,06 $\pm$ 0,06 ^{bdfhjm}	12,3 $\pm$ 2,31 ^{ac}	0,04 $\pm$ 0,01 ^{bdfhi}	66,71 $\pm$ 0,37 ^{bdfhj}	3,19 $\pm$ 0,19 ^a
PM	5,04 $\pm$ 0,02 ^{bdfhi}	6,7 $\pm$ 1,53 ^{bdfgil}	0,14 $\pm$ 0,01 ^a	68,60 $\pm$ 0,87 ^{bceg}	0,83 $\pm$ 0,07 ^{bdfhjl}
FA	6,36 $\pm$ 0,10 ^{ace}	9,3 $\pm$ 1,15 ^{bcegi}	0,06 $\pm$ 0,00 ^{bdeg}	64,98 $\pm$ 0,52 ^{bdfhjl}	1,77 $\pm$ 0,03 ^{bdfhi}
CM	4,39 $\pm$ 0,03 ^{bdfhjl}	10,7 $\pm$ 0,58 ^{bce}	0,09 $\pm$ 0,01 ^{bc}	73,84 $\pm$ 1,10 ^a	2,60 $\pm$ 0,06 ^{bc}

Fonte: Elaborado pelo autor. FT = farelo de trigo (2 mm); FS = farelo de soja (2 mm); SM = sabugo de milho (2 mm); UV = resíduo do fermentado de vinho de uvas Santa Isabel e Bordô (2 mm); palha de milho (0,5 mm); FA = farinha do caroço de abacate ($\leq$ 0,5 mm); CM = casca de maracujá (2 mm). Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ($p \leq 0,05$).

O pH ótimo para o crescimento e atividade enzimática é muito variável entre os micro-organismos, especialmente quando consideramos CES, entretanto, de forma geral, fungos têm preferência por pHs mais ácidos (MADIGAN et al., 2016). Santos e Orlandelli (2019), por exemplo, citam que o pH relativamente ácido demonstrou ser mais promissor para obtenção de xilanases empregando-se CES, conforme os diferentes trabalhos elencados.

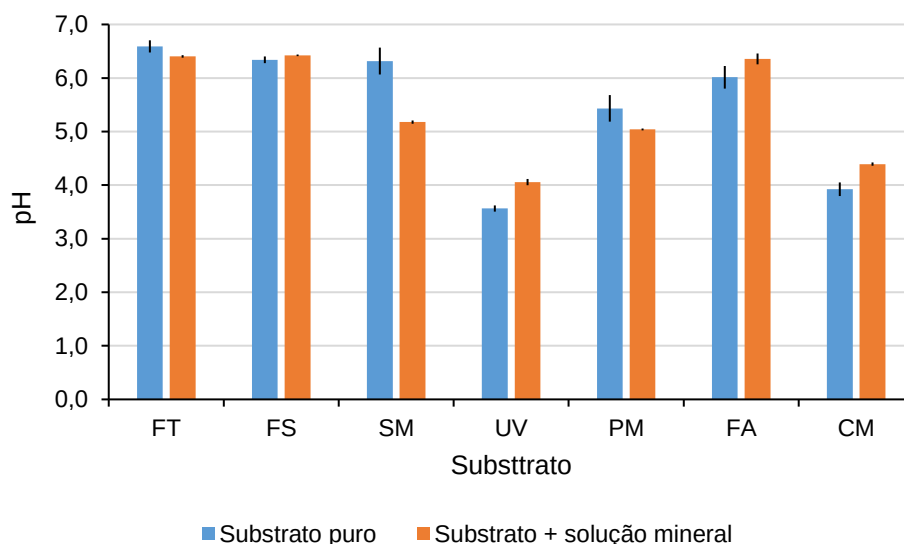
Considerando somente o fator pH (Tabela 7) pode-se inferir que o farelo de trigo, farelo de soja e farinha de caroço de abacate seriam os substratos mais viáveis ao desenvolvimento da cepa de *G. butleri*, partindo-se do princípio que ao longo do processo fermentativo pode ocorrer redução do pH do meio, e que em estudos anteriores (SANTOS et al., 2016; CAVALHEIRO et al., 2017; SENNA et al., 2018) com esse fungo, onde foram testadas a produção de diferentes enzimas, as maiores atividades catalíticas ocorreram entre pH 4,0 e 5,5.

Sabe-se que o controle e manutenção do pH em processos envolvendo CES são complicados de serem realizados devido à característica heterogênea da biomassa empregada (ANDRADE et al., 2018), bem como pelo processo de fermentação em nível laboratorial acontecer na maioria das vezes sem agitação. Dessa forma, optou-se por somente determinar o pH inicial do meio a ser fermentado.

O pH foi o único parâmetro analisado que não apresentou variação significativa ($p \geq 0,05$), para a maioria dos substratos testados, após a adição da solução mineral nutritiva (Figura 18). Tal fato é importante, haja visto que não foi empregada solução

tamponante na etapa de umidificação dos substratos; e caso essa adição tivesse alterado bruscamente o pH inicial do meio, poderia influenciar previamente no desenvolvimento fermentativo (MARRA et al., 2015).

Figura 18 – Determinação do pH (média $\pm$ desvio padrão) inicial dos meios de cultivo com e sem adição de solução mineral nutritiva.



Fonte: Elaborado pelo autor. FT = farelo de trigo (2 mm); FS = farelo de soja (2 mm); SM = sabugo de milho (2 mm); UV = resíduo do fermentado de vinho de uvas Santa Isabel e Bordô (2 mm); palha de milho (0,5 mm); FA = farinha do caroço de abacate ($\leq 0,5$ mm); CM = casca de maracujá (2 mm). Médias entre colunas do mesmo grupo de substrato, não diferem entre si ($p \geq 0,05$).

A densidade aparente é um parâmetro indireto da compactação dos grãos do substrato e pode influir na aeração do meio de cultivo, delimitando poros e espaços que propiciam a passagem de gases e o consequente melhor desenvolvimento do micro-organismo (ANDRADE et al., 2018).

Pelos resultados, nota-se que o farelo de soja e a farinha de caroço de abacate podem apresentar maior compactação, entretanto é importante frisar que a similaridade estatística entre as densidades de ambos substratos (Tabela 6), deve-se ao fato da menor granulometria dos grãos da farinha do caroço de abacate, o que propicia fisicamente mais partículas por unidade de volume ocupado. Além disso, deve-se considerar também, a constituição química proteica do farelo de soja, que garante aos grãos uma maior massa.

Se fosse considerado somente o fator densidade aparente, a casca de maracujá ($0,27 \pm 0,00 \text{ g mL}^{-1}$) seria teoricamente mais viável ao desenvolvimento do

fungo, pois forneceria maior porosidade para a transferência de gases no meio. É prudente pontuar, que essa maior porosidade facilita a ocupação dos espaços vazios, pela solução aquosa nutritiva adicionada ao sistema. Além do mais, nota-se um baixo valor de pH ($4,39 \pm 0,03$) inicial, juntamente com o alto ($73,84 \pm 1,10\%$) teor de umidade (Tabela 7), podendo tais parâmetros influenciar no desenvolvimento fúngico. Como o substrato já possui uma considerável umidade (Tabela 6), pouca água é absorvida pelos grãos do mesmo, e sobrarão um maior teor de água livre entre as partículas, ocupando os espaços vazios e consequentemente reduzindo as trocas gasosas.

Partindo-se do mesmo raciocínio anterior, poderia se considerar que o baixo teor de umidade apresentado pelo resíduo do fermentado de uvas ($5,55 \pm 0,06\%$) e pela palha de milho ($5,03 \pm 0,27\%$) (Tabela 6) seriam pontos favoráveis ao melhor desenvolvimento do fungo, entretanto, nota-se que ambos substratos apresentam baixo pH inicial (Tabelas 6 e 7) quando comparado ao farelo de trigo e soja, por exemplo.

A adição da solução mineral nutritiva aos substratos, aumentou de 5,5 a 13,6 vezes a umidade inicial dos sistemas de cultivo, atingindo teores entre 65 a 74% (Tabela 7). A umidificação do substrato no CES, além de fornecer uma quantidade de água necessária à dissolução e transporte dos nutrientes para o interior das hifas do fungo, também propicia indiretamente a redução da concentração de açúcares facilmente metabolizáveis no meio, que podem inibir ou reprimir catabolicamente a atividade de determinadas enzimas (ANTONIÊTO et al., 2014; CARRILLO-SANCEN et al., 2016; LIMA, 2019).

Como apresentado na Tabela 8, o teor de SS ($^{\circ}$ Brix), um parâmetro indireto estimativo da quantificação de açúcares em solução, assim como o teor ART (mg g^{-1}), apresentaram reduções aproximadas de até três vezes, após adição da solução mineral nutritiva, com exceção dos meios de cultivo contendo sabugo de milho, que não teve alteração significativa em nenhum dos dois parâmetros; e farelo de soja e palha de milho que mantiveram o teor de ART praticamente constantes.

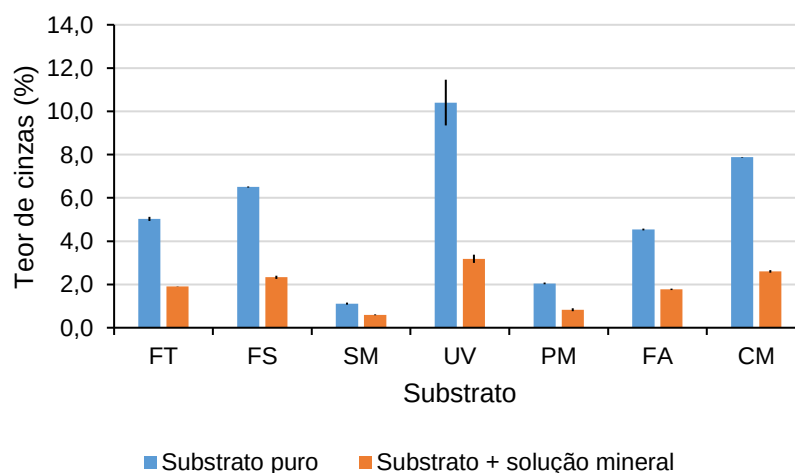
Tabela 8 – Redução percentual e numérica no teor de sólidos solúveis e açúcares redutores totais dos sistemas de cultivo contendo diferentes substratos, após adição inicial de solução mineral nutritiva.

Substrato	Sólidos solúveis (°Brix)		Açúcares redutores totais (mg g ⁻¹)	
FT	34,6%	(1,53 x)	69,6%	(3,29 x)
FS	56,11%	(2,28 x)	constante	constante
SM	constante	Constante	constante	constante
UV	35,3%	(1,54 x)	69,2%	(3,25 x)
PM	63,4%	(2,73 x)	constante	constante
FA	7,0%	(1,08 x)	60%	(1,67 x)
CM	69,4%	(3,27 x)	73%	(3,77 x)

Fonte: Elaborado pelo autor. FT = farelo de trigo (2 mm); FS = farelo de soja (2 mm); SM = sabugo de milho (2 mm); UV = resíduo do fermentado de vinho de uvas Santa Isabel e Bordô (2 mm); palha de milho (0,5 mm); FA = farinha do caroço de abacate ($\leq 0,5$ mm); CM = casca de maracujá (2 mm).

O teor percentual de cinzas reduziu-se em até três vezes com a adição da solução mineral nutritiva, algo já previsto, considerando-se a fórmula para o cálculo desse parâmetro físico-químico (Eq. 3 do item 4.3). Entretanto, não foi observada variação considerável nas médias entre os distintos substratos antes e após a umidificação (como notado na sequência idêntica entre as letras que acompanham as médias das Tabelas 6 e 7, e também na Figura 19), haja visto a reduzida quantidade de sais presente na solução mineral adicionada.

Figura 19 – Determinação do teor percentual de cinzas (média $\pm$ desvio padrão) inicial dos meios de cultivo com e sem adição de solução mineral nutritiva.



Fonte: Elaborado pelo autor. FT = farelo de trigo (2 mm); FS = farelo de soja (2 mm); SM = sabugo de milho (2 mm); UV = resíduo do fermentado de vinho de uvas Santa Isabel e Bordô (2 mm); palha de milho (0,5 mm); FA = farinha do caroço de abacate ($\leq 0,5$ mm); CM = casca de maracujá (2 mm).

É importante destacar que outros fatores são também necessários a serem considerados, e que influem no efetivo desenvolvimento do micro-organismo, como o maior valor nutricional apresentado pelo trigo e soja ao ser comparado aos outros substratos aqui empregados.

5.4 Atividades enzimáticas amilolíticas e pectinolíticas sob diferentes temperaturas e tempo fixado

Conforme explicitado no item 5.2, o tempo de cultivo foi fixado em 72 h, e as fermentações realizadas a 25, 30 e 35°C $\pm$ 0,5.

Para atividades enzimáticas determinadas pelo método dextrinizante (Figura 20), nota-se que em 88,9% dos substratos foram verificadas atividades amilolíticas inferiores a 2,5 U mL⁻¹ em ao menos uma das temperaturas testadas. A maior atividade enzimática (9,6 U mL⁻¹) foi atingida a 35°C em farelo de trigo (FT). Cavalheiro et al. (2017) também evidenciaram atividade dextrinizante por *G. butleri*, entretanto os autores obtiveram aproximadamente 7,3 U mL⁻¹ empregando extrato bruto obtido de CES em farelo de trigo a 25°C por 96 h. O valor de atividade dextrinizante aqui obtido, também foi superior ao potencial dextrinizante de *Thermoascus aurantiacus* (fungo termofílico) isolado por Oliveira et al. (2016) em serrapilheira de fragmento de Mata Atlântica, localizada em Dourados – MS. Os autores observaram atividade despolimerizante aproximada de 6,0 U mL⁻¹, em extratos brutos obtidos a partir do cultivo do fungo em farelo de trigo (pH inicial 5,0 e 75% de umidade) a 45°C por 120 h.

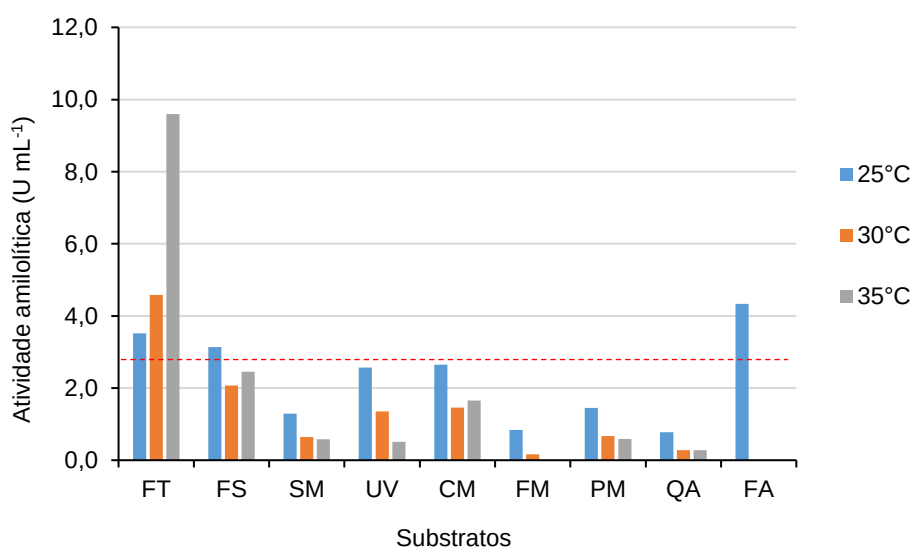
Considerando que a determinação da atividade dextrinizante estima a produção de enzimas induzidas pela presença de amido e maltose (como as α -amilases – endoamilases que atuam ao longo da cadeia de amilose e amilopectina hidrolisando aleatoriamente ligações α -1,4 com formação de oligossacarídeos ramificados e lineares com cadeias de diferentes comprimentos) (MICHELIN et al., 2010), pode-se considerar que os maiores valores de atividade observados, ao se empregar FT, estejam também associados a maior disponibilidade do amido no substrato, haja visto que o mesmo não foi previamente lavado.

Sabe-se que dentre os substratos testados a fibra do resíduo de processamento da mandioca (FM) e a quirera de arroz (QA), apresentam as maiores porcentagens constitutivas de amido, entretanto nota-se que as atividades

enzimáticas sobre tais substratos, foram as menores observadas. Tal fato possivelmente esteja relacionado a maior granulometria desses substratos, o que conforme Souza et al. (2010), dificulta o rendimento da absorção dos nutrientes pelas hifas, devido a menor área superficial de contato; bem como a composição nutricional dos mesmos.

Para Almalki (2018), o rastreamento de uma variedade de substratos, visando-se encontrar o composto mais adequado à produção de uma enzima específica, é essencial, haja visto, que as fontes de carbono e nitrogênio são aspectos determinantes nessa produção em CES. Farelo de trigo, casca de batata, palha de trigo, palha e casca de arroz, resíduos da banana e do café são alguns exemplos de substratos utilizados para a produção de amilases (MAHMOOD et al., 2018). Entretanto, testar a produção enzimática em novas e distintas biomassas faz-se importante, não somente porque as capacidades catalíticas variam de micro-organismo para micro-organismo; mas também por poder ampliar os modos de obtenção das enzimas, assim como dar um destino mais sustentável aos subprodutos agroindustriais.

Figura 20 – Atividade amilolítica (U mL^{-1}) dextrinizante média de *Gongronella butleri*, em cultivo em estado sólido por 72 horas, em diferentes temperaturas e subprodutos agroindustriais.

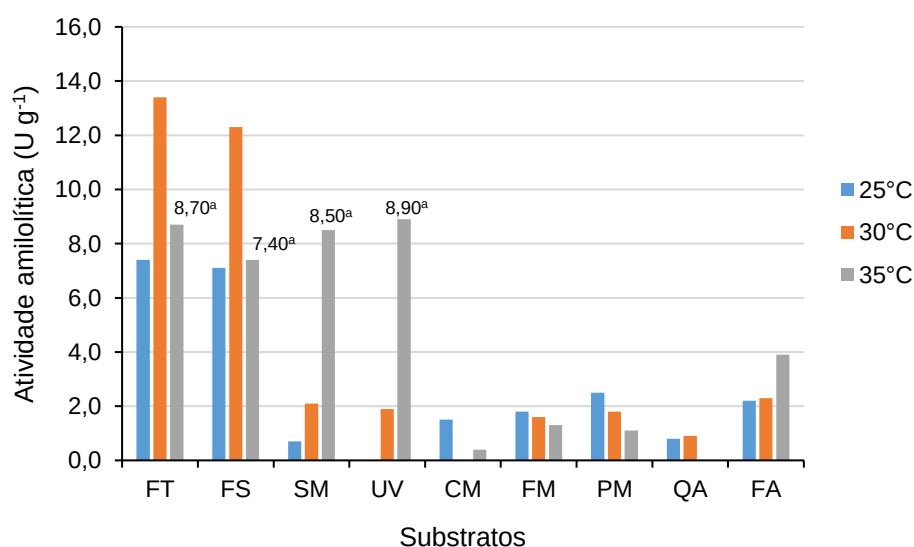


Fonte: Elaborado pelo autor. FT = farelo de trigo (2 mm); FS = farelo de soja (2 mm); SM = sabugo de milho (2 mm); UV = resíduo do fermentado de vinho de uvas Santa Isabel e Bordô (2 mm); CM = casca de maracujá (2 mm); FM = fibra do resíduo de processamento da mandioca (≥ 2 mm); PM = palha de milho (0,5 mm); QA = quirera de arroz (≥ 2 mm); FA = farinha do caroço de abacate ($\leq 0,5$ mm).

A ausência de atividade enzimática dextrinizante observada a 30 e 35°C no cultivo sobre a farinha de caroço de abacate (FA), possivelmente esteja relacionada à reduzida granulometria do substrato ($\leq 0,5$ mm), que promove um meio mais empacotado dificultando as trocas gasosas e favorecendo o superaquecimento; associada ao baixo teor de umidade ($64,98\% \pm 0,52$) (Tabela 7).

As atividades enzimáticas determinadas pelo método DNS estão apresentadas na Figuras 21 e 22.

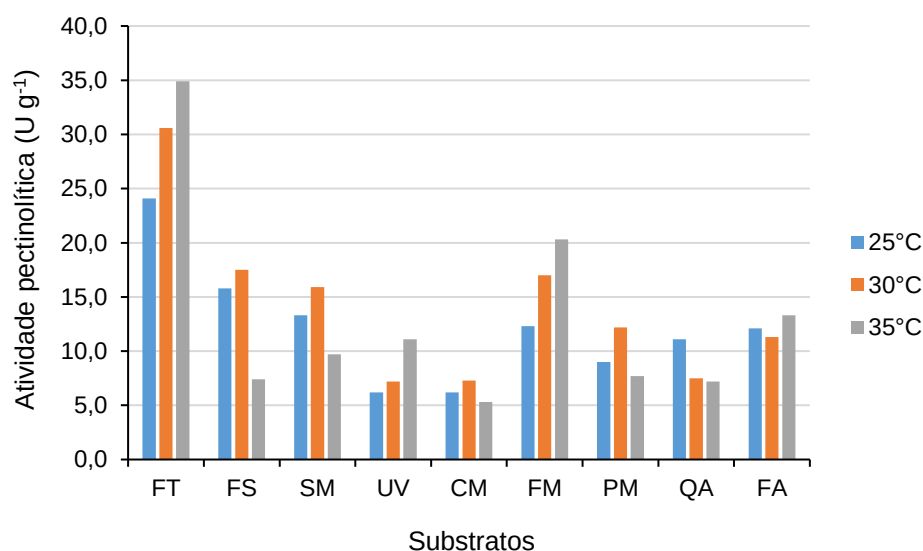
Figura 21 – Atividade amilolítica (U g^{-1}) média, pelo método de redução do ácido-3,5-dinitrosalicílico, de *Gongronella butleri* em cultivo em estado sólido por 72 horas, sob diferentes temperaturas e subprodutos agroindustriais.



Fonte: Elaborado pelo autor. FT = farelo de trigo (2 mm); FS = farelo de soja (2 mm); SM = sabugo de milho (2 mm); UV = resíduo do fermentado de vinho de uvas Santa Isabel e Bordô (2 mm); CM = casca de maracujá (2 mm); FM = fibra do resíduo de processamento da mandioca (≥ 2 mm); PM = palha de milho (0,5 mm); QA = quirera de arroz (≥ 2 mm); FA = farinha do caroço de abacate ($\leq 0,5$ mm). Médias com letras iguais, em colunas diferentes, não diferem entre si ($p \geq 0,05$).

Nota-se na Figura 21, que tanto para o farelo de trigo (FT) quanto para o farelo de soja (FS), a atividade amilolítica pelo método DNS, apresentou-se mais alta em praticamente todas as temperaturas testadas, quando comparado aos outros substratos. Efeito similar foi observado na atividade pectinolítica empregando FT (Figura 22), e nesse caso ainda, o aumento da temperatura de 25°C para 35°C foi um fator que estimulou a produção enzimática (31%), atingindo $34,9 \text{ U g}^{-1}$ de substrato.

Figura 22 – Atividade pectinolítica (U g^{-1}) média, pelo método de redução do ácido-3,5-dinitrosalicílico, de *Gongronella butleri* em cultivo em estado sólido por 72 horas, sob diferentes temperaturas e subprodutos agroindustriais.



Fonte: Elaborado pelo autor. FT = farelo de trigo (2 mm); FS = farelo de soja (2 mm); SM = sabugo de milho (2 mm); UV = resíduo do fermentado de vinho de uvas Santa Isabel e Bordô (2 mm); CM = casca de maracujá (2 mm); FM = fibra do resíduo de processamento da mandioca (≥ 2 mm); PM = palha de milho (0,5 mm); QA = quirera de arroz (≥ 2 mm); FA = farinha do caroço de abacate ($\leq 0,5$ mm).

Santos et al. (2016) e Cavalheiro et al. (2017), ao usar o mesmo fungo, também evidenciaram maiores atividades β -glicosídicas e amilolíticas, respectivamente, empregando-se farelo de trigo e soja, em comparação com outros substratos testados (palha de milho, espiga de milho e casca de arroz). Rocha (2010) empregando testes otimizados que combinaram resíduo de arroz (farelo e casca) com casca de maracujá, obtiveram atividade pectinásica máxima de $9,0 \text{ U g}^{-1}$, em um período de 288 h (12 dias) a 35°C , ao usar cepa padrão *A. niger* ATCC 16404; valor esse, inferior aos resultados obtidos no presente estudo com *G. butleri* IPS 8.2, aplicando a mesma temperatura, em um período de tempo inferior (72 h), sobre FT ($34,9 \text{ U g}^{-1}$), SM ($9,7 \text{ U g}^{-1}$), UV ($11,1 \text{ U g}^{-1}$), FM ($20,3 \text{ U g}^{-1}$) e FA ($13,3 \text{ U g}^{-1}$) (Figura 22). Isso evidencia o potencial para produção de pectinases do agente biológico aqui empregado, haja visto ser *A. niger*, a espécie mais usada em estudos com CES (SANTOS P. et al., 2018).

Ao se realizar comparação entre as médias das atividades de FT, FS e SM e UV (Figura 21) para a temperatura de 35°C , foi observado que as mesmas não diferiram estatisticamente ($p \geq 0,05$), corroborando dessa forma a escolha pelos

substratos FT e FS em testes subsequentes, especialmente o do planejamento experimental.

As baixas respostas em atividade enzimática para FM e QA observadas nos dois métodos (dextrinizante e DNS) de determinação empregados (Figuras 20, 21 e 22); assim como a aparente redução das atividades com o aumento da temperatura de 25°C para 35°C (com excessão da atividade pectinolítica de FM); e a maior granulometria desses substratos, foram condições que fizeram com que tais substratos não fossem empregados nos testes subsequentes.

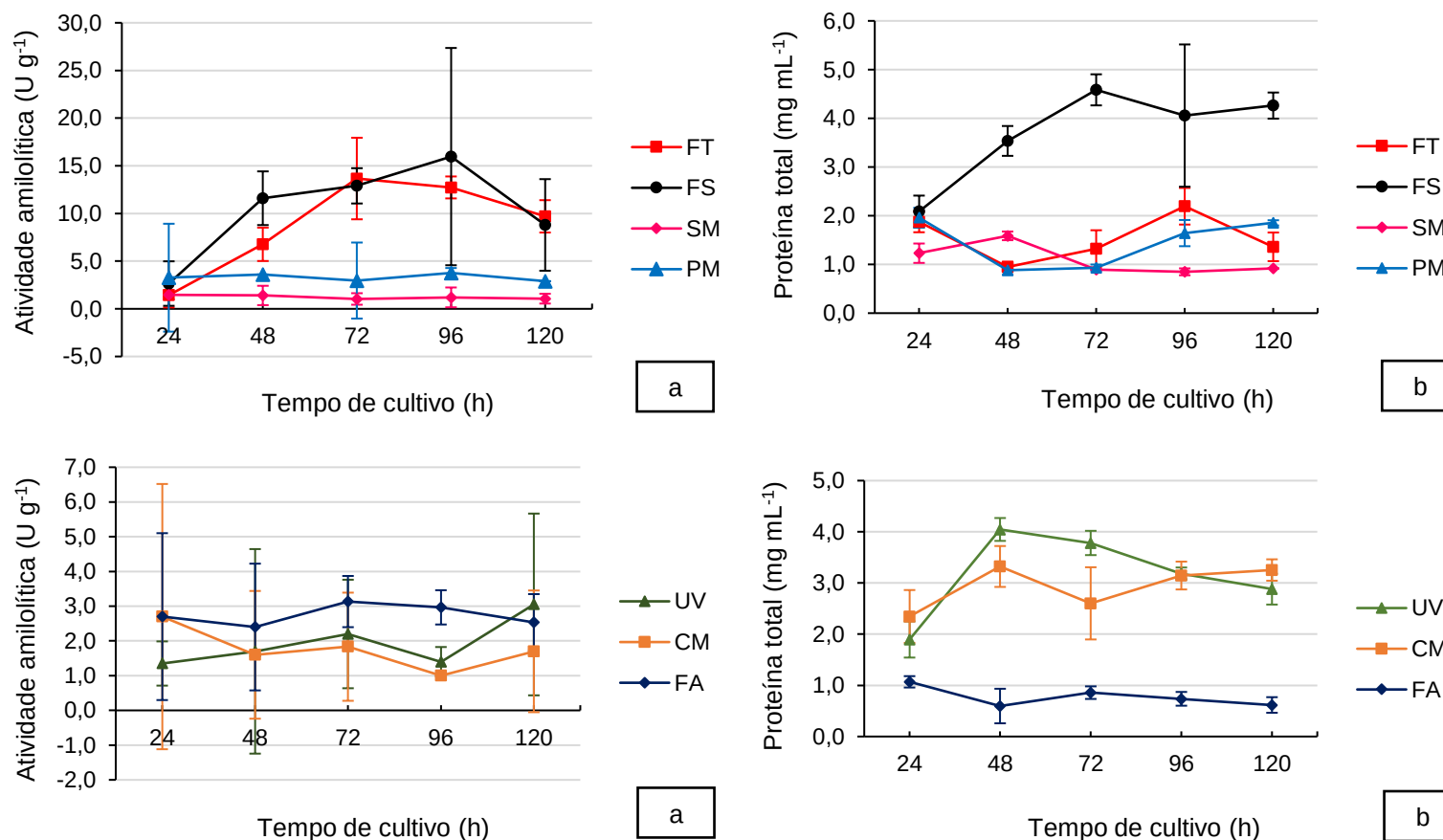
Os altos resultados de atividade enzimática obtidos em FT ou FS, pelo método dextrinizante e DNS, sugerem a capacidade sinérgica de *G. butleri* em produzir endoamilases (enzimas dextrinizantes), como as α -amilases; e exoamilases (enzimas sacarificantes), como as β -amilases que hidrolisam a penúltima ligação α -1,4 a partir da extremidade não redutora da molécula de amilose, liberando maltose; assim como glicoamilases que rompem ligações α -1,4 e α -1,6 do amido e oligossacarídeos, removendo unidades de glicose a partir da extremidade não redutora desses substratos (BAGHERI; KHODARAHMI; MOSTAFAIE, 2014).

5.5 Perfil de atividade enzimática em diferentes tempos de fermentação e temperatura fixada, empregando o método do ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS)

O monitoramento da produção de enzimas por um micro-organismo ao longo do tempo, seguida da plotagem dos resultados indiretos obtidos pelas atividades enzimáticas, permite que se possa fazer comparações ao se empregar diferentes substratos de cultivo; e assim, observar em que tempo e em qual meio a produção enzimática foi mais ou menos intensa. Isso gera informações que podem facilitar na escolha de determinados parâmetros que poderão ser melhor otimizados futuramente.

O perfil da atividade amilolítica para *G. butleri*, assim como o teor de proteínas totais determinados nos extratos brutos estão apresentados na Figura 23.

Figura 23 – Perfil da atividade amilolítica (U g^{-1}) média de *Gongronella butleri* (a) e proteína total (mg mL^{-1}) média (b), em diferentes subprodutos agroindustriais, pelo método de redução do ácido-3,5-dinitrosalicílico, em cultivo em estado sólido a 35°C ao longo de 120 horas.



Fonte: Elaborado pelo autor. (a) FT = farelo de trigo (2 mm); FS = farelo de soja (2 mm); SM = sabugo de milho (2 mm); PM = palha de milho (0,5 mm). (b) UV = resíduo do fermentado de vinho de uvas Santa Isabel e Bordô (2 mm); CM = casca de maracujá (2 mm); FA = farinha do caroço de abacate ($\leq 0,5$ mm).

Nota-se aumento gradual e considerável da atividade amilolítica com o decorrer do tempo, para FT e FS, quando comparado ao restante dos substratos testados; atingindo o pico de atividade para FT ($13,7 \text{ U g}^{-1}$) a 72 h e em FS ($16,0 \text{ U g}^{-1}$) a 96 h. Maiores picos de atividade amilolítica, entre 72 h e 96 h, também foram observados por Silva G. et al. (2018), em CES de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* sobre fibra de algaroba (pH 5,4 e 70% de umidade inicial). Entretanto, os valores observados variaram de 6,4 a $6,6 \text{ U g}^{-1}$. Conforme verificado pelos autores, após 96 h de cultivo até o final da fermentação (240 h), houve redução da atividade amilolítica, assim como notado no presente estudo com FT e FS. O perfil de atividade amilolítica para SM, PM, UV, CM e FA manteve-se na faixa de $1,0 \text{ U g}^{-1}$ a $3,8 \text{ U g}^{-1}$, demonstrando que as características desses substratos não foram ideais para induzir considerável produção de amilases sacarificantes pelo fungo (Figura 23).

O aumento no teor de proteínas totais dos extratos brutos, entre 48 e 96 h, para FT e FS, fornece indícios da produção das amilases pela atividade metabólica do micro-organismo, apesar dos picos de maior atividade não coincidirem com os de maior produção enzimática. Tal fato também foi relatado por Gonçalves (2019), ao determinar o perfil amilolítico de isolados selvagens de *Rhizoctonia solani*, empregando FT lavado a 25°C . A pequena variação ou a discreta constância do teor proteico ao longo do tempo para UV, CM, SM e FA, sem alterações consideráveis nas atividades enzimáticas, demonstra que as proteínas determinadas podem ser outros tipos de biomoléculas que não as amilases (Figura 23).

A determinação da atividade específica (Tabela 9) também corrobora a maior efetividade de produção de amilases em FT e FS. Pode-se observar um aumento de mais de nove vezes na atividade amilolítica específica, sob o cultivo em FT a 72 h, quando comparado a 24 h de cultivo. Nota-se que a atividade amilolítica específica sobre FT diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) da atividade obtida ao se utilizar FS, no tempo de 72 h de cultivo; atingindo valores quatro vezes mais altos ($1,04 \pm 0,11 \text{ U mg}^{-1}$ de proteína, para FT e $0,28 \pm 0,04 \text{ U mg}^{-1}$ de proteína, para FS).

Apesar do pico da atividade amilolítica, sobre FS em 96 h de cultivo, ter sido aparentemente mais alto que em FT, nota-se que os desvios se sobrepuseram (Figura 23a) e as atividades específicas não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 9).

Dentre os sete substratos testados, UV e CM, foram os que apresentaram os menores valores de atividade amilolítica específica, não diferindo entre si, independentemente do tempo de cultivo empregado. Tal condição pode estar

associada ao baixo pH inicial desses sistemas de cultivo, quando comparado aos outros substratos empregados; assim como o alto teor de umidade inicial observado em CM (Tabela 7); ou a presença de taninos naturalmente encontrados em uvas. Gonçalves (2019), observou influências negativas na produção amilases por cepas de *R. solani*, ao empregar como substratos palha de café e casca de banana, que contém taninos em sua composição. Conforme Mohammed, Al-Zubaidy e Al-Asward (2008), e Antoniêto et al. (2014), taninos apresentam atividade antimicrobiana podendo inibir o desempenho enzimático de determinados micro-organismos, ao afetar a via de fosforilação oxidativa de carboidrases, proteases e lipases, necessárias a hidrólise do substrato para obtenção de nutrientes.

Pode-se observar também, que as atividades amilolíticas específicas, para os diferentes substratos testados, não diferiram ($p \geq 0,05$) entre si, nos tempos de cultivo de 24 e 120 h.

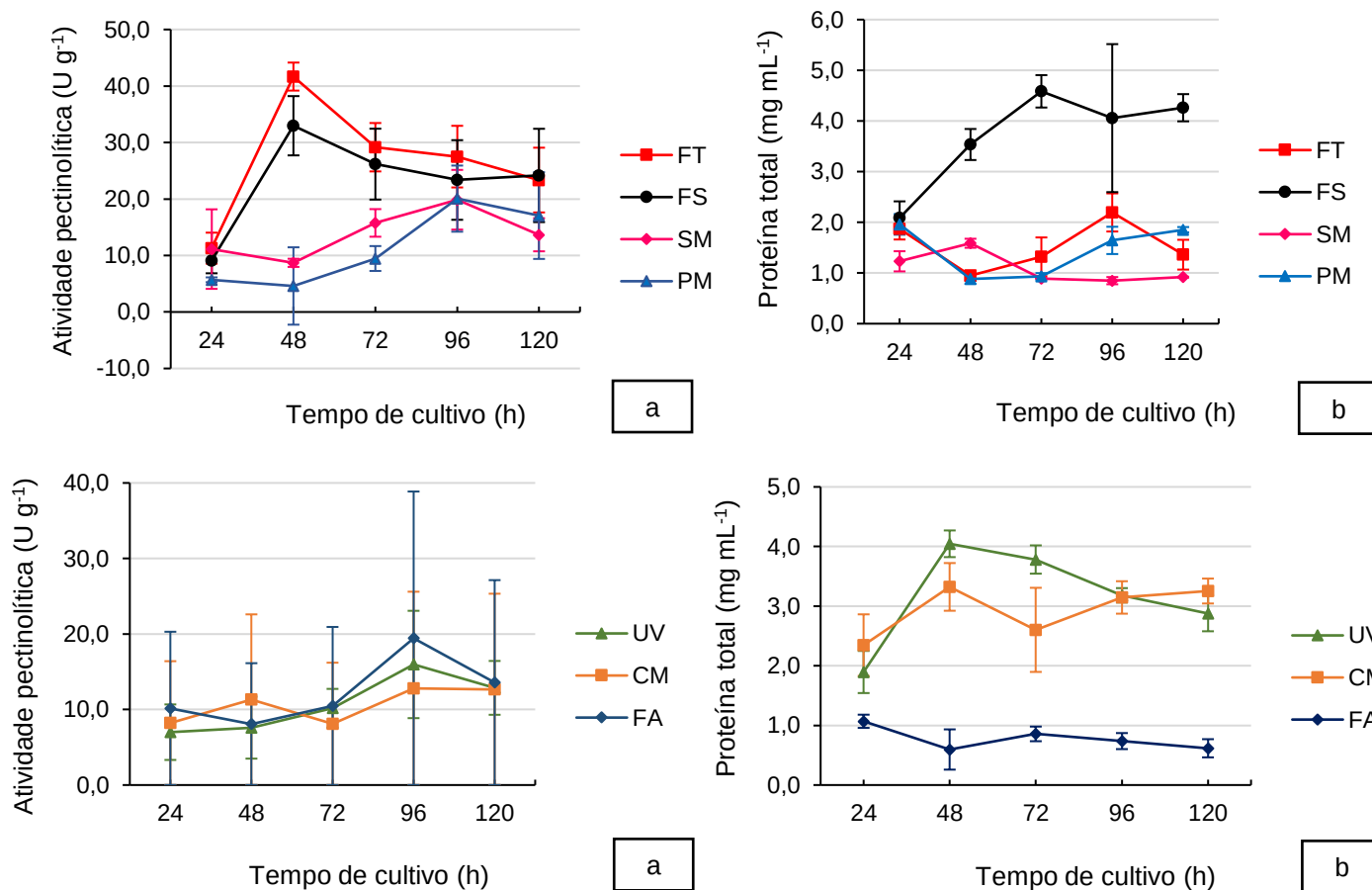
Tabela 9 – Atividades amilolíticas específicas ($U\ mg^{-1}$ proteína) médias de *Gongronella butleri*, em diferentes subprodutos agroindustriais, pelo método de redução do ácido-3,5-dinitrosalicílico, em cultivo em estado sólido a 35°C ao longo de 120 horas.

Subtrato	Tempo de cultivo				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
FT	$0,11 \pm 0,04^a$	$0,73 \pm 0,23^a$	$1,04 \pm 0,11^a$	$0,60 \pm 0,16^a$	$0,37 \pm 0,52^a$
FS	$0,11 \pm 0,09^a$	$0,33 \pm 0,08^{acd}$	$0,28 \pm 0,04^{bcef}$	$0,39 \pm 0,19^{ace}$	$0,21 \pm 0,13^a$
SM	$0,12 \pm 0,02^a$	$0,09 \pm 0,07^{bcefg}$	$0,12 \pm 0,07^{bdegh}$	$0,14 \pm 0,12^{bcefn}$	$0,12 \pm 0,06^a$
UV	$0,08 \pm 0,06^a$	$0,04 \pm 0,07^{bcefg}$	$0,06 \pm 0,04^{bdeghi}$	$0,04 \pm 0,01^{bdeghi}$	$0,07 \pm 0,09^a$
PM	$0,15 \pm 0,26^a$	$0,16 \pm 0,27^{bcd}$	$0,31 \pm 0,40^{ace}$	$0,24 \pm 0,07^{bcef}$	$0,15 \pm 0,01^a$
FA	$0,27 \pm 0,23^a$	$0,51 \pm 0,47^{ac}$	$0,37 \pm 0,08^{bc}$	$0,40 \pm 0,01^{ac}$	$0,45 \pm 0,21^a$
CM	$0,06 \pm 0,11^a$	$0,04 \pm 0,05^{bcefg}$	$0,06 \pm 0,05^{bdeghi}$	$0,03 \pm 0,00^{bdeghi}$	$0,05 \pm 0,06^a$

Fonte: Elaborado pelo autor. FT = farelo de trigo (2 mm); FS = farelo de soja (2 mm); SM = sabugo de milho (2 mm); UV = resíduo do fermentado de vinho de uvas Santa Isabel e Bordô (2 mm); palha de milho (0,5 mm); FA = farinha do caroço de abacate ($\leq 0,5$ mm); CM = casca de maracujá (2 mm). Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ($p \leq 0,05$).

O perfil da atividade pectinolítica para *G. butleri*, assim como o teor de proteínas totais determinados nos extratos brutos estão apresentados na Figura 24.

Figura 24 – Perfil da atividade pectinolítica (U g^{-1}) média de *Gongronella butleri* (a) e proteína total (mg mL^{-1}) média (b), em diferentes subprodutos agroindustriais, pelo método de redução do ácido-3,5-dinitrosalicílico, em cultivo em estado sólido a 35°C ao longo de 120 horas.



Fonte: Elaborado pelo autor. (a) FT = farelo de trigo (2 mm); FS = farelo de soja (2 mm); SM = sabugo de milho (2 mm); PM = palha de milho (0,5 mm). (b) UV = resíduo do fermentado de vinho de uvas Santa Isabel e Bordô (2 mm); CM = casca de maracujá (2 mm); FA = farinha do caroço de abacate ($\leq 0,5$ mm).

Assim como para a atividade amilolítica, a atividade pectinolítica atingiu picos bem mais altos ao se empregar FT ($41,7 \text{ U g}^{-1}$) e FS ($33,0 \text{ U g}^{-1}$), quando comparado aos outros substratos testados, diferindo somente no período de tempo para o atingimento do pico, que ocorreu a 48 h (Figura 24). Raymond, Mshandete e Kivaisi (2015), empregando CES de *Pleutorus* HK-37 a 28°C por 20 dias (480 h), obtiveram atividade pectinolítica máxima ($8,28 \pm 2,14 \text{ U g}^{-1}$), inferior ao do presente estudo, utilizado resíduo de sisal suplementado com esterco de vaca.

Os resultados aqui obtidos, em FT e FS, são superiores aos encontrados por Bonomini, Wisbeck e Gern (2017), ao empregar *Plerotus Sajor-caju*, cultivado em meio submerso a 35°C sob agitação, suplementado com pectina e extrato de trigo. Os autores obtiveram maior pico de produção de pectinases ($0,29 \text{ U mL}^{-1}$ ou $2,9 \text{ U g}^{-1}$) somente no 11º dia (264 h) de fermentação. Souza et al. (2010), ao investigarem o perfil de produção de poligacturonases, obtiveram máxima produção enzimática ($20,9 \text{ U g}^{-1}$) a 66 h, empregando CES de *A. niger* em casca/albedo de maracujá, com teor de 13,10% de pectina e umificação inicial de 40%. Malayil e Chanakya (2016), detectaram máxima produção pectinásica de $27,17 \text{ U g}^{-1}$, ao cultivarem *P. florida* por 16 dias (384 h) em meio semi-sólido contendo palha de arroz.

O fato do farelo de trigo e soja apresentarem maior capacidade indutora na produção de enzimas fúngicas deve-se à maior riqueza constitutiva em nutrientes (SANTOS et al., 2016; SANTOS; ORLANDELLI, 2019), quando comparado as outras biomassas, além do meio fermentativo exibir um pH inicial mais próximo do neutro e um teor de umidade aproximado de 70%, como já demonstrado na Tabela 7. Em estudo anterior, com a mesma cepa fúngica aqui testada, Senna (2018), também observou maior atividade xilanásica empregando-se FT com teor inicial de 70% de umidade.

Segundo Oliveira Júnior (2014), a umidade inicial do sistema fermentativo exerce influências sobre o crescimento fúngico, e consequentemente sobre o desempenho da produção enzimática. Em CES, a umidade inicial pode variar de 18 a 85%, dependendo das características do substrato, ou conjunto de substratos utilizados. De acordo com o autor, umidades elevadas podem aumentar o volume da biomassa, diminuindo os espaços entre os poros das partículas; ou tais espaços podem ser ocupados por água e, consequentemente dificultar as trocas gasosas.

Foi observado perfis de atividade pectinolítica sobre SM, PM, UV, CM e FA com

padrão bem semelhante, sendo que em todos esses substratos as atividades máximas foram atingidas somente a 96 h de fermentação (Figura 24).

O teor proteico, nos extratos brutos de FT e FS, também se elevou ao longo do tempo, atingindo valores máximos de $2,19 \pm 0,38 \text{ mg mL}^{-1}$ e $4,58 \pm 0,32 \text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente, em tempos de cultivo superiores aos obtidos pelos picos de atividade pectinásica. O teor de proteínas totais em FS a 72 h de cultivo teve um acréscimo de mais do que o dobro do teor observado no início na fermentação (24 h) (Figura 24b), demonstrando a capacidade metabólica do micro-organismo, para produzir enzimas. Aos altos teores proteicos observados em CM e UV, especialmente nos tempos iniciais de cultivo, associado ao pequeno acréscimo das atividades pectinolíticas, dão indícios de que as enzimas produzidas nesses substratos, não estão associadas às enzimas de interesse.

Os picos de maior atividade pectinolítica, em FT e FS, coincidiram com os de maior atividade específica, em 48 h de cultivo, sendo que somente neste tempo de fermentação é que foi verificada diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre ambos substratos, atingindo o valor $4,42 \text{ U mg}^{-1}$ para FT e $0,93 \text{ U mg}^{-1}$ proteína, para FS. As menores atividades específicas também foram observadas em CM e UV, não diferindo estatisticamente entre si, em nenhum dos tempos de cultivo empregados (Tabela 10).

Tabela 10 – Atividades pectinolíticas específicas (U mg^{-1} proteína) médias de *Gongronella butleri*, em diferentes subprodutos agroindustriais, pelo método de redução do ácido-3,5-dinitrosalicílico, em cultivo em estado sólido a 35°C ao longo de 120 horas.

Subtrato	Tempo de cultivo				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
FT	$0,62 \pm 0,20^a$	$4,42 \pm 0,41^a$	$2,39 \pm 1,00^a$	$1,25 \pm 0,06^{bdef}$	$0,56 \pm 0,97^{abdef}$
FS	$0,43 \pm 0,05^a$	$0,93 \pm 0,14^{bcd}$	$0,57 \pm 0,12^{acefh}$	$0,60 \pm 0,17^{bdeg}$	$0,58 \pm 0,23^{acde}$
SM	$0,86 \pm 0,45^a$	$0,55 \pm 0,08^{bcefg}$	$1,77 \pm 0,77^{ab}$	$2,32 \pm 0,43^{ac}$	$1,49 \pm 0,03^{ab}$
UV	$0,25 \pm 0,23^a$	$0,18 \pm 0,10^{bcefg}$	$0,27 \pm 0,09^{acegij}$	$0,51 \pm 0,24^{bdeghi}$	$0,46 \pm 0,17^{acdefg}$
PM	$0,31 \pm 0,02^a$	$0,59 \pm 0,90^{bcdf}$	$1,03 \pm 0,31^{acdf}$	$1,27 \pm 0,55^{bce}$	$0,91 \pm 0,38^{abd}$
FA	$0,61 \pm 0,60^a$	$1,81 \pm 1,34^{ac}$	$1,24 \pm 0,23^{abd}$	$2,58 \pm 0,59^a$	$2,39 \pm 1,29^a$
CM	$0,21 \pm 0,19^a$	$0,25 \pm 0,25^{bcefgi}$	$0,32 \pm 0,24^{aceghj}$	$0,39 \pm 0,03^{bdeghi}$	$0,40 \pm 0,23^{acdefg}$

Fonte: Elaborado pelo autor. FT = farelo de trigo (2 mm); FS = farelo de soja (2 mm); SM = sabugo de milho (2 mm); UV = resíduo do fermentado de vinho de uvas Santa Isabel e Bordô (2 mm); palha de milho (0,5 mm); FA = farinha do caroço de abacate ($\leq 0,5 \text{ mm}$); CM = casca de maracujá (2 mm). Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ($p \leq 0,05$).

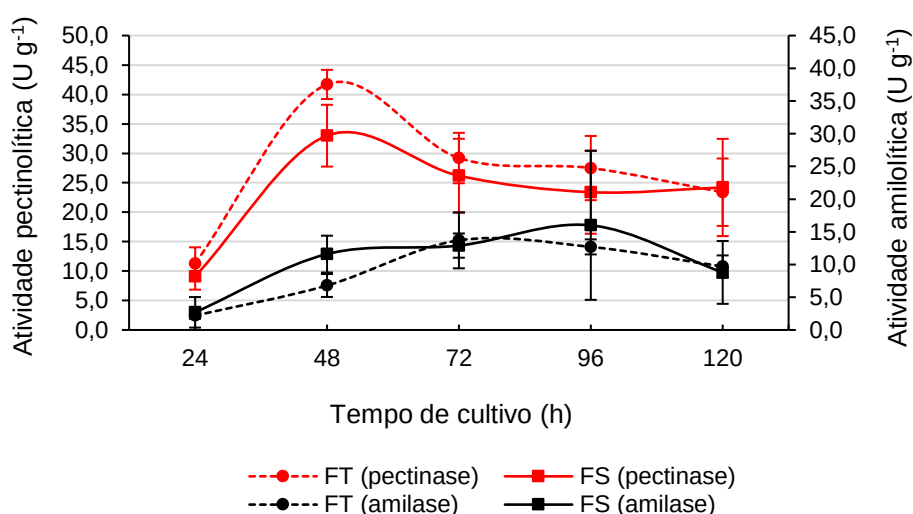
Foi verificado que em 96 h de incubação a atividade específica usando FA ($2,58 \text{ U mg}^{-1}$ proteína) como substrato, atingiu o dobro do valor obtido utilizando FT ($1,25 \text{ U}$

mg⁻¹ proteína), não sendo verificadas diferenças de atividade entre estes substratos nos outros tempos analisados.

É importante ressaltar que todos os picos de atividade enzimática, tanto para amilase quanto para pectinase, independente do substrato testado e do método de determinação da atividade empregado, encaixaram-se dentro da faixa de tempo considerada como corrente para a produção industrial de enzimas por micro-organismos (COELHO et al., 2001). Segundo Sooch e Kauldhar (2013), esse é um fator especialmente importante, pois favorece processos biotecnológicos economicamente mais viáveis.

Agrupando-se os resultados do perfil amilolítico e pectinolítico para FT e FS (Figura 25), nota-se que a produção de pectinases ao longo do tempo foi maior, indicando que tais biomassas têm maior potencial de induzir a produção dessas enzimas, quando comparadas à produção de amilases, para a cepa fúngica testada. Verifica-se que os desvios dos resultados para pectinase apresentaram sobreposição aos desvios dos resultados para amilase no tempo de 72 h de cultivo (Figuras 23a, 24a e 25), desta forma, esse tempo foi adotado para se estabelecer os testes de otimização subsequentes.

Figura 25 – Perfil da atividade amilolítica e pectinolítica (U g⁻¹) média de *Gongronella butleri*, em farelo de trigo e farelo de soja, pelo método de redução do ácido-3,5-dinitrosalicílico, em cultivo em estado sólido a 35°C ao longo de 120 horas.



Fonte: Elaborado pelo autor. FT = farelo de trigo (2 mm); FS = farelo de soja (2 mm).

Os valores de atividade pectinolítica máxima obtidas no presente estudo, empregando-se FT (41,70 U g⁻¹) ou FS (33,0 U g⁻¹) a 48 h (Figura 25), foram também superiores aos determinados por Finkler (2016), onde foi utilizado CES de *A. niger* sobre mistura de FT e bagaço de cana-de-açúcar. Mesmo empregando agitação intermitente em leito fixo, a 30-35°C, o autor obteve atividade pectinolítica média de $22,0 \pm 2,0$ U g⁻¹. Abdullah et al. (2018), testando diferentes substratos (incluindo casca de banana, farelo de trigo e farelo de arroz), suplementados com diferentes sais nitrogenados, sulfatados e fostatados, obtiveram máxima produção pectinolítica (15,5 U mL⁻¹) no meio contendo farelo de trigo, com pH 6, a temperatura de 30°C por 72 h, ao também utilizarem *A. niger* em cultivo submerso.

Considerando que *A. niger* é um dos agentes fúngicos mais relatados na literatura, na produção de pectinases (SANTOS P. et al., 2018), os resultados aqui encontrados evidenciam o potencial da capacidade despolimerizante *G. butleri*.

5.6 Otimização da produção enzimática empregando-se planejamento fatorial 2³

As atividades amilolíticas e pectinolíticas a 35°C por 72 h, após o emprego do planejamento experimental fatorial 2³, estão apresentados na Tabela 11.

Comparando-se os resultados da atividade amilolítica obtidos após combinação dos fatores pelo planejamento experimental (Tabela 11), com a média das atividades individualizadas obtidas em FT e FS a 72 h (Figura 25), verifica-se um acréscimo de mais de 82% (de 13,30 para 77,20 U g⁻¹) na atividade enzimática observada quando foi empregado o experimento 6, demonstrando que a redução de solução mineral nutritiva do meio fermentativo associado à adição de FS promoveu maior indução da produção de amilases. Tal característica também fica evidenciada ao se avaliar a atividade amilolítica específica (2,53 U mg⁻¹) desse experimento associado ao teor de proteínas totais ($3,06 \pm 0,15$ mg mL⁻¹) (Figura 26), dando indícios de que a alta atividade enzimática é consequente da produção dessas enzimas de interesse pelo metabolismo do fungo.

Em termos estatísticos, a redução do volume inicial da solução mineral nutritiva adicionada ao meio fermentativo foi a única variável que teve efeito significativo ($p \leq 0,05$) sobre a atividade amilolítica (Figura 27), com um coeficiente negativo (APÊNDICE E), indicando que essa redução é favorável à maior produção enzimática. De fato, como observado para os experimentos 1, 2, 5 e 6; em comparação aos

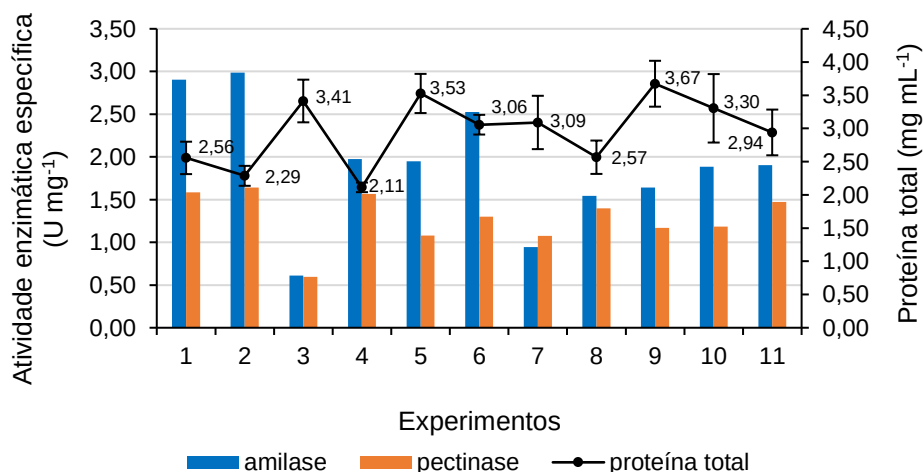
respectivos experimentos 3, 4, 7 e 8 (onde as outras variáveis não foram alteradas), nota-se que a redução de 10 para 5 mL de solução mineral nutritiva, propiciou maiores valores de atividade amilolítica (Tabela 11).

Tabela 11 – Resultados da atividade amilolítica e pectinolítica, pelo método de redução do ácido-3,5-dinitrosalicílico, de *Gongronella butleri* em cultivo em estado sólido a 35°C por 72 h, após planejamento experimental fatorial 2^3 , com três repetições do ponto central.

Experimento	Proporção dos substratos (g)		Volume (mL) de solução mineral nutritiva adicionada ao meio fermentativo	Quantidade (%) de CaCl_2 na solução mineral nutritiva	Atividade enzimática (U mL^{-1})		Atividade enzimática (U g^{-1})	
	FT	FS			A	P	A	P
1	1,25	3,75	5	0	7,43	4,05	74,30	40,50
2	3,75	1,25	5	0	6,83	3,75	68,30	37,50
3	1,25	3,75	10	0	2,08	2,03	20,80	20,30
4	3,75	1,25	10	0	4,17	3,31	41,70	33,10
5	1,25	3,75	5	0,03	6,87	3,81	68,70	38,10
6	3,75	1,25	5	0,03	7,72	3,97	77,20	39,70
7	1,25	3,75	10	0,03	2,92	3,32	29,20	33,20
8	3,75	1,25	10	0,03	3,96	3,59	39,60	35,90
9	2,5	2,5	7,5	0,015	6,03	4,29	60,30	42,90
10	2,5	2,5	7,5	0,015	6,23	3,91	62,30	39,10
11	2,5	2,5	7,5	0,015	5,60	4,33	56,00	43,30

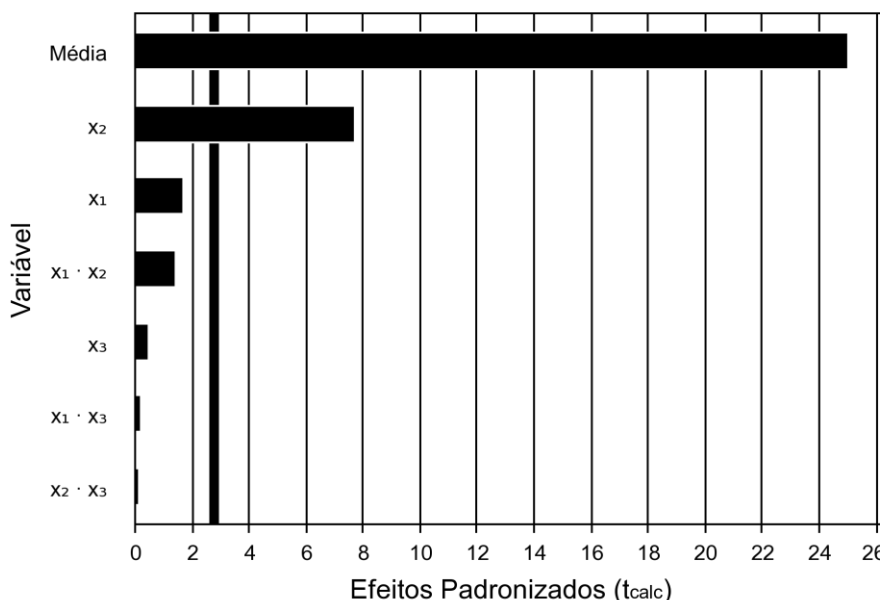
Fonte: Elaborado pelo autor. FT = farelo de trigo (2 mm); FS = farelo de soja (2 mm). A = atividade amilolítica; P = atividade pectinolítica.

Figura 26 – Atividades enzimáticas específicas (U mg^{-1}) e teor de proteínas totais (mg mL^{-1}) de *Gongronella butleri* em cultivo em estado sólido a 35°C por 72 h, após planejamento experimental fatorial 2^3 , com três repetições do ponto central.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 27 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis independentes sobre a atividade amilolítica, após cultivo em estado sólido de *Gongronella butleri*, a 35°C por 72 horas, empregando planejamento experimental fatorial 2^3 , com três repetições do ponto central.



Fonte: Elaborado pelo autor. Nível de significância de 5%. x_1 = proporção (g) de substratos; x_2 = volume (mL) de solução mineral nutritiva; x_3 = teor (%) de CaCl_2 .

O aumento percentual na atividade amilolítica sacarificante obtida no experimento 6 foi superior a um estudo realizado por Lima Júnior (2020), em CES com o fungo endofítico *Paecilomyces* sp. SF 021, apesar dos valores finais de atividade amilolítica obtidas pelo autor terem sido maiores que os do presente estudo. Lima Júnior (2020), adotando otimização das variáveis quantidade e umidade inicial do substrato e quantidade de discos de inóculo, obteve aumento de 62,53% na atividade amilolítica sacarificante (de 300,00 para 497,60 U g^{-1}) do extrato bruto, empregando FT como substrato.

França e Silva (2021), empregando planejamento fatorial 2^3 , tendo como variáveis independentes pH, extrato de levedura e resíduos de cascas de batata inglesa e mandioca, na otimização amilolítica de *A. niger* UCP 1095 em cultivo submerso a 37°C e 150 rpm; obtiveram atividade máxima bem inferior à observada no presente estudo com *G. butleri*. Os autores notaram que em ambos os substratos testados houve produção de amilases, entretanto a máxima atividade (0,91 U mL^{-1})

aconteceu a 144 h de cultivo, a pH 5,0, utilizando 1 g de extrato de levedura e 11 g de resíduo da casca de batata inglesa.

Rodrigues (2021), obteve máxima atividade amilolítica ($15,80 \text{ U mL}^{-1}$) ao adotar também planejamento fatorial 2^3 combinando os fatores umidade inicial (%), tempo de cultivo (h) e agitação (rpm); em CES de *A. niger* sobre bagaço de malte de cevada. Entretanto, a autora verificou que essa máxima atividade ocorreu a 50% de umidade, sem agitação e num período de tempo de 120 h, superior ao adotado no presente estudo.

Os menores teores de proteína total foram observados nos experimentos 1, 2 e 4 e não diferiram estatisticamente ($p \leq 0,05$) entre si. Nesses mesmos pontos experimentais nota-se também atividades amilolíticas específicas altas, denotando que o conteúdo proteico se refere às enzimas de interesse. As condições do experimento 3 (FT 25%, FS 75%; 10 mL de água no meio; 0% CaCl_2) não foram satisfatórias a uma boa produção de amilases e pectinases, apesar do alto teor de proteínas totais ($3,41 \pm 0,32 \text{ mg mL}^{-1}$) observado; as atividades amilolíticas e pectinolíticas específicas nesse experimento mativeram-se na média de $0,60 \text{ U mg}^{-1}$, valor esse quatro vezes inferior ao pontos de maior atividade específica amilolítica (experimentos 1, 2 e 6) e duas vezes inferior aos de maior atividade específica pectinolítica (experimentos 1, 2 e 4), respectivamente (Figura 26).

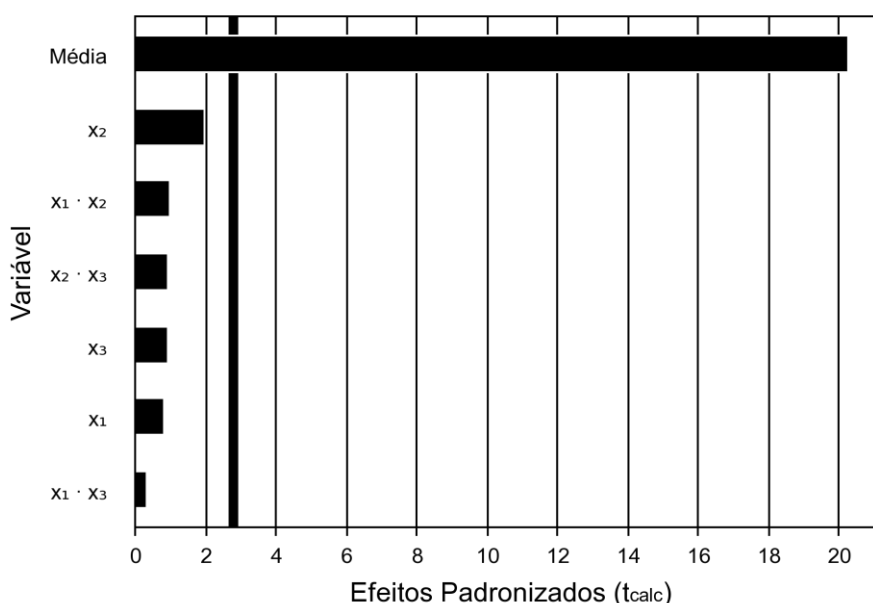
Comparando-se a média das atividades pectinolíticas obtidas no ponto central (experimentos 9 a 11, da Tabela 11) com a média das atividades individualizadas obtidas para FT e FS a 72 h (Figura 25), nota-se um acréscimo percentual de mais de 33% (de 27,70 para $41,77 \text{ U g}^{-1}$) na atividade pectinásica ao se empregar meio contendo partes iguais de cada substrato (FT e FS), com metade do teor de CaCl_2 e 25% a menos de água inicial. Apesar desse aumento, em termos específicos as maiores atividades pectinolíticas ocorreram nos experimentos 1, 2 e 4, atingindo valores respectivos de 1,58; 1,64 e $1,57 \text{ U mg}^{-1}$ (Figura 26). Estatisticamente, nenhuma das variáveis independentes, assim como suas combinações, apresentaram efeitos significativos ($p \leq 0,05$) sobre a atividade pectinolítica (Figura 28; APÊNDICE E), apesar de se notar que a variável x_2 (solução mineral nutritiva), assim como variável x_1 (proporção de substratos) para o caso do efeito sobre amilases (Figura 27), estão bem próximas a 95% de confiança.

Santos et al. (2008) empregaram o mesmo tipo de planejamento de otimização do presente estudo, visando determinar as melhores condições de produção de

poligalacturonases (as principais enzimas pectinolíticas com atividade despolimerizante), sobre o efeito da variação de umidade inicial do meio; adição de sulfato de amônia e fosfato de potássio. Testando o CES de *A. niger* CCT0916 em resíduo seco de pedúnculo de caju, os autores obtiveram a máxima atividade poligalacturonásica (16 U g^{-1}) na condição de 40% de umidade inicial; 1% de sulfato de amônio; e 0% de fosfato de potássio, em 30 h de fermentação. Medeiros (2016) também obteve valor ótimo de atividade poligalacturonásica, muito semelhante ($18,78 \text{ U g}^{-1}$), empregando a mesma cepa de *Aspergillus* em cultivo semi-sólido sobre farinha de bagaço de laranja pêra a 25°C por 70 h, na condição de 60% de teor de água inicial e 2% de fonte de nitrogênio.

Apesar das poligalacturonases serem somente parte do *pool* dos sistemas enzimáticos pectinolíticos, os valores de atividade pectinolítica total obtidos no presente estudo, demonstram as potencialidades despolimerizantes de *G. butleri*, especialmente se considerarmos que os maiores picos de atividade (Figura 25) ocorreram num curto período de tempo.

Figura 28 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis independentes sobre a atividade pectinolítica, após cultivo em estado sólido de *Gongronella butleri*, a 35°C por 72 horas, empregando planejamento experimental fatorial 2^3 , com três repetições do ponto central.



Fonte: Elaborado pelo autor. Nível de significância de 5%. x_1 = proporção (g) de substratos; x_2 = volume (mL) de solução mineral nutritiva; x_3 = e teor (%) de CaCl_2 .

5.6.1 Redução percentual da viscosidade

A Tabela 12 apresenta a redução percentual da viscosidade de uma solução de pectina, após o emprego dos extratos brutos obtidos no planejamento experimental 2³. Os resultados de redução percentual da viscosidade apresentaram-se, de forma geral, muitos próximos entre os diferentes experimentos realizados, sendo que a menor redução foi observada no experimento 3 (0,4%), que apresentou a menor atividade pectinolítica (20,30 U g⁻¹). A média das reduções percentuais da viscosidade dos pontos centrais dos experimentos (9, 10 e 11), atingiu valor de 8,2%, e nesses pontos foi observada atividade pectinolítica média de 41,77 U g⁻¹ (Tabela 11). Tal parâmetro indireto de mensuração da atividade enzimática também foi verificado por Santos et al. (2008) ao se estudar os efeitos e combinação de diferentes fatores na produção de poligacturonases por *A. niger* empregando-se resíduo do pedúnculo de caju.

Tabela 12 – Redução percentual da viscosidade de uma solução de pectina, devida a influência das pectinases produzidas por *Gongronella butleri*, sob diversas condições experimentais, empregando-se cultivo em estado sólido a 35°C por 72 horas.

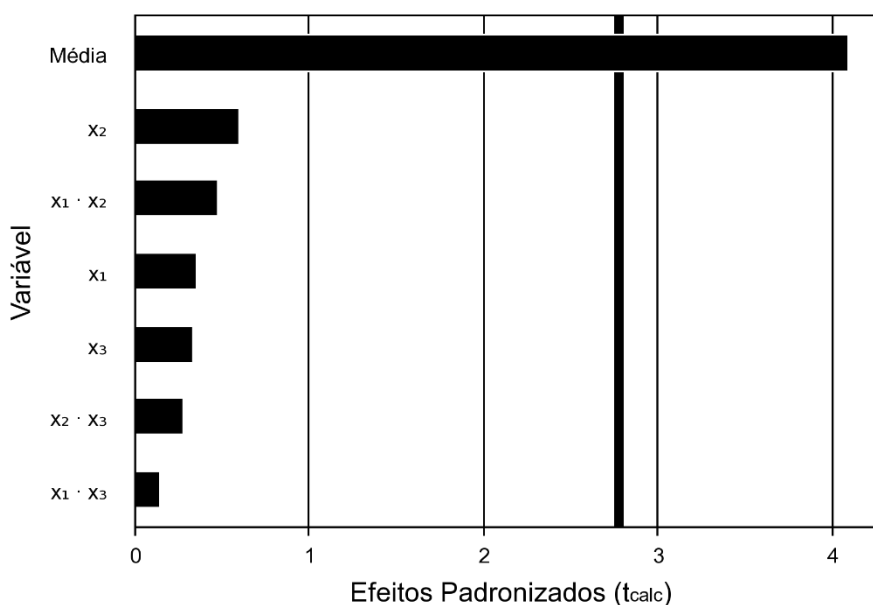
Experimento	Redução (%) da viscosidade
1	4,8
2	4,3
3	0,4
4	3,7
5	4,8
6	4,6
7	3,1
8	4,5
9	9,4
10	4,4
11	10,7

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em termos estatísticos, também não foi observado efeitos das variáveis independentes e suas interações, sobre a redução percentual da viscosidade de uma solução de pectina (Figura 29). E isso é corroborado pela proximidade dos valores das atividades pectinolíticas obtidas no presente estudo, para os diferentes experimentos. Além disso, a sensibilidade da metodologia adaptada, que foi aqui empregada, pode não ter sido suficiente para determinar essas mínimas diferenças.

Santos et al. (2008), observaram efeito negativo da umidade na redução percentual da viscosidade ($R^2 = 95,6\%$), quando empregou extrato enzimático obtido de *A. niger* cultivado sobre pedúnculo de caju com variações 10% no teor de umidade entre os experimentos testados.

Figura 29 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis independentes sobre a redução percentual da viscosidade de uma solução de pectina, após cultivo em estado sólido de *Gongronella butleri*, a 35°C por 72 horas, empregando planejamento experimental fatorial 2^3 , com três repetições do ponto central.



Fonte: Elaborado pelo autor. Nível de significância de 5%. x₁ = proporção (g) de substratos; x₂ = volume (mL) de solução mineral nutritiva; x₃ = e teor (%) de CaCl₂.

Testar a redução percentual de viscosidade por influência da ação de enzimas é importante, pois permite selecionar possíveis complexos enzimáticos para se poder melhorar processos industriais (especialmente aqueles associados ao setor de bebidas), reduzindo custos, facilitando a operacionalização, e o tempo de obtenção de determinados produtos (BARRETO et al., 2013). Mesmo tendo sido utilizada uma metodologia alternativa para a mensuração da viscosidade de uma solução de pectina, devido à ação de pectinases contidas no extrato bruto; a redução percentual desse parâmetro no experimento 11, atingiu valor aproximado a estudo sistematizado realizado por Ongaratto e Viotto (2016), com pectinases comerciais derivadas de *A.*

niger e empregadas sobre suco de pitanga, onde foi obtida redução de 15%, mesmo após o emprego de ferramentas de otimização.

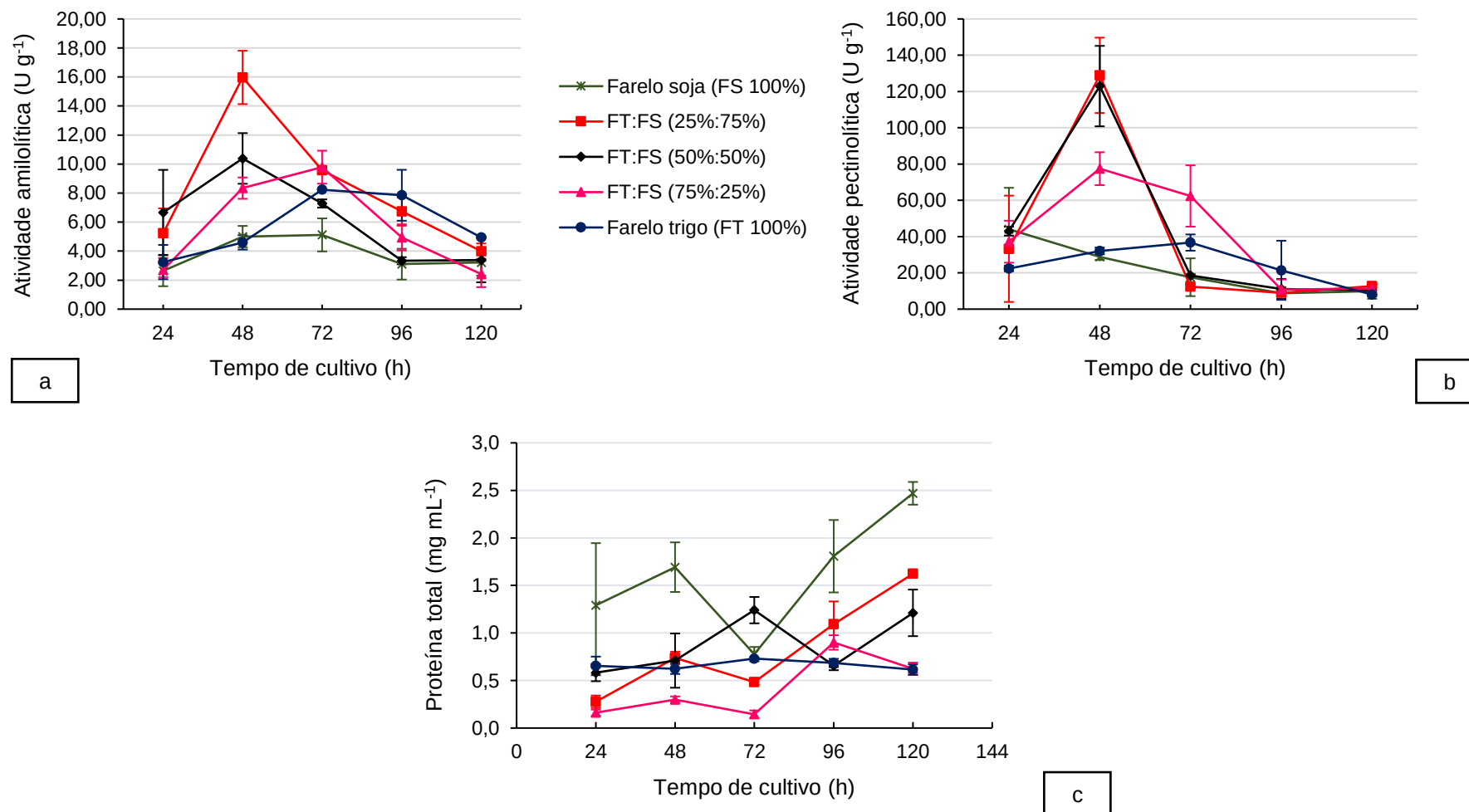
5.7 Efeito da combinação de substratos sobre a produção enzimática após emprego de planejamento um fator por vez, seguido de DCCR

Como a maioria das variáveis independentes testadas no planejamento fatorial 2^3 (item 5.6) não apresentaram significância estatística para a produção de amilases e pectinases, optou-se por estudar a influência da combinação de proporções distintas de FT e FS a 35°C, sobre essas variáveis respostas (Figura 30), ao longo de 120 h de cultivo e, a partir dos melhores resultados, aplicar DCCR utilizando como fatores umidade inicial do meio, temperatura e tempo de cultivo.

Nota-se que os maiores picos de atividade amilolítica (15,97 U g⁻¹) e pectinolítica (128,92 U g⁻¹) ocorreram a 48 h, na combinação de 25% de FT e 75% de FS, atingindo teor total de proteínas de 0,74 mg mL⁻¹. No caso das pectinases a combinação de partes iguais de substrato favoreceu também alta atividade enzimática (138,66 U g⁻¹), com teor proteico total de 0,91 mg mL⁻¹ (Figura 30).

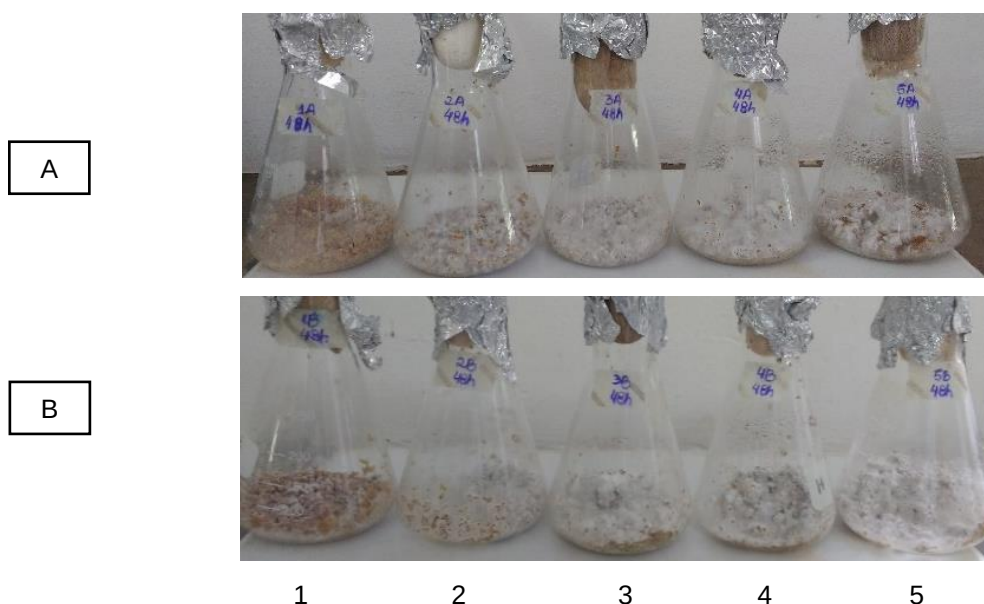
Percebeu-se que o emprego de um único tipo de substrato (FT ou FS na concentração de 100%), não teve tanto efeito na atividade enzimática, principalmente na atividade pectinolítica, evidenciando que a combinação de ambos substratos tende a ser mais interessante, podendo possivelmente suprir determinados nutrientes que não são encontrados em um substrato individualizado, mas que podem estar presentes no outro, favorecendo a atividade e crescimento do fungo (Figura 31). Estudo semelhante realizado por Nascimento et al. (2019) ao se empregar dois substratos, também evidenciou maior produção de fitases por *A. niger* var. *phoenicis* em cultivo submerso, quando foi utilizado uma combinação de 1,25% de farelo de arroz com 3,0% de milhocina.

Figura 30 – Perfil enzimático médio (U g^{-1}) de *Gongronella butleri* (a, b) e proteína total média (mg mL^{-1}) (c), em diferentes combinações de farelo de trigo e farelo de soja, pelo método de redução do ácido-3,5-dinitrosalicílico, em cultivo em estado sólido a 35°C ao longo de 120 horas.



Fonte: Elaborado pelo autor. FT = farelo de trigo (2 mm); FS = farelo de soja (2 mm)

Figura 31 – Colonização de *Gongronella butleri* a 35°C por 48 h, sobre substratos farelo de trigo e farelo de soja combinados em diferentes proporções.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor. A e B = replicatas. 1 = Farelo de soja FS (100%); 2 = FT:FS (25%:75%); 3 = FT:FS (50%:50%); 4 = FT:FS (75%:25%); 5 = Farelo de trigo FT (100%).

Com excessão do substrato contendo 100% de FT, foi observado de forma geral aumento gradativo no teor total de proteínas no meio, ao longo do tempo de 120 h de cultivo, entretanto, esse aumento praticamente não foi associado às atividades enzimáticas, que tenderam a se reduzir (especialmente após 72 h), o que pode indicar que parte dessas proteínas produzidas são outras que não as de interesse, aqui analisadas.

A análise das atividades enzimáticas específicas corrobora a baixa atividade amilolítica e pectinolítica, quando adotado 100% de um único tipo de substrato (FT ou FS) (Tabelas 13 e 14). No caso da adoção de 100% de FS, em praticamente todos os tempos de cultivo, as atividades mantiveram-se baixas. Para ambas enzimas a atividade específica nessas concentrações de substrato (FT ou FS 100%) somente diferiram significativamente ($p \leq 0,05$) a 120 h de cultivo.

Não foram observadas diferenças significativas para as atividades específicas amilolíticas em nenhum dos tempos de cultivo adotados, quando se empregou proporções de FT:FS (25%:75%) e FT:FS (75%:25%) (Tabela 13). Comportamento similar também foi observado nas atividades pectinolíticas específicas, quando do emprego de FT:FS (25%:75%), FT:FS (50%:50%) e FT:FS (75%:25%) (Tabela 14).

Tabela 13 – Atividades amilolíticas específicas (U mg⁻¹ proteína) médias de *Gongronella butleri*, em diferentes combinações de farelo de trigo e farelo de soja, pelo método de redução do ácido-3,5-dinitrosalicílico, em cultivo em estado sólido a 35°C ao longo de 120 horas.

Combinação de substrato	Tempo de cultivo				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
FS 100%	0,26 ± 0,21 ^a	0,30 ± 0,00 ^{bcde}	0,65 ± 0,08 ^{acdf}	0,17 ± 0,02 ^{abce}	0,13 ± 0,03 ^{bcde}
FT 25% : FS 75%	2,02 ± 1,09 ^a	2,18 ± 0,44 ^{ac}	1,98 ± 0,11 ^{ab}	0,64 ± 0,23 ^{ab}	0,25 ± 0,03 ^{bcde}
FT 50% : FS 50%	1,12 ± 0,33 ^a	1,54 ± 0,37 ^{acd}	0,59 ± 0,04 ^{acef}	0,51 ± 0,00 ^{abcd}	0,30 ± 0,19 ^{acd}
FT 75% : FS 25%	1,68 ± 0,04 ^a	2,78 ± 0,06 ^a	7,18 ± 2,82 ^a	0,55 ± 0,05 ^{abc}	0,38 ± 0,10 ^{bc}
FT 100%	0,52 ± 0,26 ^a	0,74 ± 0,14 ^{bcde}	1,13 ± 0,02 ^{acd}	1,14 ± 0,18 ^a	0,81 ± 0,06 ^a

Fonte: Elaborado pelo autor. FT = farelo de trigo (2 mm); FS = farelo de soja (2 mm). Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ($p \leq 0,05$).

Tabela 14 – Atividades pectinolíticas específicas (U mg⁻¹ proteína) médias de *Gongronella butleri*, em diferentes combinações de farelo de trigo e farelo de soja, pelo método de redução do ácido-3,5-dinitrosalicílico, em cultivo em estado sólido a 35°C ao longo de 120 horas.

Combinação de substrato	Tempo de cultivo				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
FS 100%	3,40 ± 0,05 ^a	1,71 ± 0,17 ^{bcef}	2,21 ± 1,12 ^{abcd}	0,47 ± 0,09 ^a	0,40 ± 0,15 ^{acde}
FT 25% : FS 75%	13,64 ± 13,80 ^a	17,40 ± 1,28 ^{acd}	2,57 ± 0,12 ^{abc}	0,82 ± 0,00 ^a	0,78 ± 0,03 ^{abde}
FT 50% : FS 50%	7,44 ± 0,72 ^a	18,17 ± 4,19 ^{ac}	0,51 ± 0,23 ^{abcd}	1,73 ± 0,97 ^a	0,90 ± 0,45 ^{abd}
FT 75% : FS 25%	22,75 ± 2,57 ^a	25,81 ± 0,21 ^a	46,79 ± 24,75 ^a	1,18 ± 0,52 ^a	1,86 ± 0,55 ^a
FT 100%	3,49 ± 0,76 ^a	5,18 ± 0,75 ^{bcef}	5,03 ± 0,69 ^{ab}	3,21 ± 2,58 ^a	1,31 ± 0,11 ^{ab}

Fonte: Elaborado pelo autor. FT = farelo de trigo (2 mm); FS = farelo de soja (2 mm). Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ($p \leq 0,05$).

A Tabela 15 sintetiza a comparação estatística das atividades enzimáticas obtidas nas diferentes combinações de substrato (FT e FS) testadas, sob um mesmo tempo de cultivo e, o efeito de diferentes tempos de cultivo para uma mesma combinação de substrato.

Observou-se uma tendência de maiores atividades enzimáticas a 48 h quando se considera uma mesma combinação de substratos. Quando se compara diferentes combinações de substrato num mesmo tempo de cultivo, nota-se uma tendência de maior atividade amilolítica e pectinolítica na combinação FT:FS (25%:75%), apesar dessa maior atividade não diferir estatisticamente, para o caso da pectinase, da combinação FT:FS (50%:50%). Dessa forma, o tempo de cultivo de 48 h, assim como a combinação de FT:FS (25%:75%) foram adotados como parâmetros para se desenvolver os testes do DCCR.

Tabela 15 – Atividades amilolíticas e pectinolíticas médias (U g^{-1}) de *Gongronela buteri* em diferentes combinações de farelo de trigo e farelo de soja, em cultivo em estado sólido a 35°C , ao longo de 120 h.

		Atividades enzimáticas (U g ⁻¹)														
Proporção das combinações		Tempo de cultivo														
		24 h			48 h			72 h			96 h			120 h		
Amilase	FS (100%)	2,6	bcde	A	5,0	bcef	A	5,1	bdef	A	3,1	bdef	A	3,2	a	A
	FT:FS (25%:75%)	5,2	ac	BDEF	16,0	a	A	9,6	ac	BC	6,7	ac	BCE	4,00	a	BDEF
	FT:FS (50%:50%)	6,6	a	BCE	10,4	bc	A	7,3	acef	AC	3,3	bcef	BDEF	3,4	a	BCEF
	FT:FS (75%:25%)	2,7	bcde	BDEF	8,3	bce	AC	9,8	a	A	4,9	ace	BCE	2,4	a	BDEF
	FT (100%)	3,2	acd	BDEF	4,6	bdef	BCEF	8,2	ace	A	7,9	a	AC	4,9	a	ACE
Pectinase	FS (100%)	44,1	a	A	28,8	bdfg	AC	17,6	bcde	ACD	8,7	a	BCDE	9,9	a	BCDE
	FT:FS (25%:75%)	33,3	a	BC	129,0	a	A	12,5	bcde	BCDE	9,0	a	BCDE	12,7	a	BCD
	FT:FS (50%:50%)	43,3	a	BC	123,0	ac	A	18,6	bcd	BCD	11,2	a	BCDE	10,4	a	BCDE
	FT:FS (75%:25%)	37,2	a	BCE	77,5	bde	A	62,4	a	AC	10,8	a	BDEF	11,4	a	BDEF
	FT (100%)	22,4	a	A	32,1	bdfg	A	36,7	ac	A	21,4	a	A	8,0	a	A

Fonte: Elaborado pelo autor. FT = farelo de trigo (2 mm); FS = farelo de soja (2 mm). Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, para a mesma coluna e grupo enzimático, diferem entre si ($p \leq 0,05$). Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, para colunas diferentes e na mesma combinação de substratos, diferem entre si ($p \leq 0,05$).

Quando comparada as atividades enzimáticas obtidas pela combinação de FT:FS (25%:75%) a 48 h (Tabela 15) com as atividades enzimáticas obtidas no mesmo tempo de cultivo com os substratos isolados (Figura 25), nota-se acréscimos consideráveis, atingindo valores até três vezes mais altos, como para produção de pectinases, por exemplo (aumentos de mais de 65% na atividade pectinolítica).

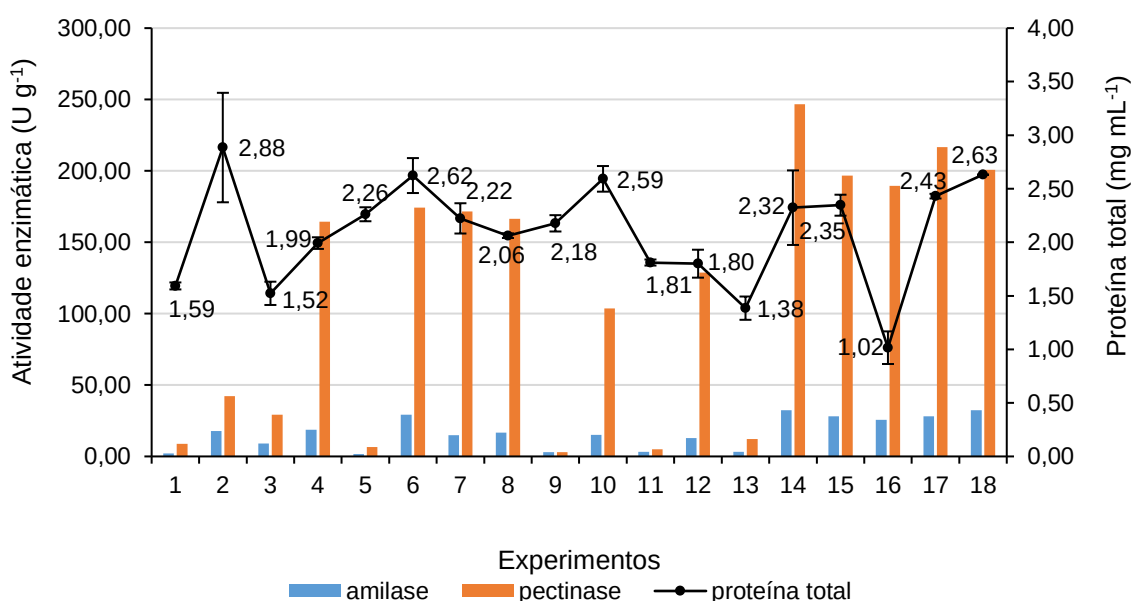
As condições experimentais empregadas no DCCR foram favoráveis à alta atividade pectinolítica quando comparada à atividade amilolítica (Figura 32). Observa-se que em 61% dos experimentos (4, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17 e 18), as atividades pectinolíticas foram superiores a $100,00 \text{ U g}^{-1}$, atingindo valores maiores que $189,0 \text{ U g}^{-1}$ nos pontos centrais (experimentos 15 a 18), cujo fatores avaliados apresentavam 61,37% de umidade inicial do meio de cultivo; a 30°C e em 48 h de fermentação.

A maior atividade pectinolítica ($246,62 \text{ U g}^{-1}$ ou $24,662 \text{ U mL}^{-1}$; e atividade específica $18,66 \text{ U mg}^{-1}$) foi observada na condição de 61,37% de umidade inicial do meio de cultivo, com tempo de incubação de 68 h, a 30°C (experimento 14) (Figura 32 e Tabela 16). Esse resultado foi 3,5 vezes superior a um estudo realizado por Carvalho (2016), com cultivo submerso estático de *S. cerevisiae* a 30°C por 24 h, empregando

farinha de resíduo de maracujá, onde após aplicação de dois DCCR sequenciais visando determinar o melhor teor percentual de substrato, temperatura de incubação, e teor de peptona no meio, foi obtida atividade pectinolítica máxima de 7,066 U mL⁻¹.

As menores atividades específicas (experimentos 5, 9 e 11), que atingiram valores inferiores a 0,30 U mg⁻¹; assim como as maiores atividades específicas (experimentos 14 a 18), que atingiram valores médios de 10,90 U mg⁻¹; estão associadas às mais baixas e altas atividades pectinolíticas, demonstrando que as condições experimentais respectivas não estimularam, ou foram favoráveis à produção da enzima de interesse (Tabela 16).

Figura 32 - Atividades enzimáticas (U g⁻¹) e teor de proteínas totais (mg mL⁻¹) de *Gongronella butleri* em cultivo em estado sólido sobre composição de substrato fixado em 25% de farelo de trigo e 75% de farelo de soja, após emprego de delineamento composto central rotacional (DCCR), com quatro repetições no ponto central.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As atividades amilolíticas para os 18 experimentos mantiveram-se na média de 16 U g⁻¹, sendo que os menores valores obtidos foram observados nos experimentos 1, 5, 9, 11 e 13 (média de 2,58 U g⁻¹). Nesses casos, os baixos teores de umidade inicial do meio de cultivo, associados ou não a baixa temperatura de incubação, foram os fatores que mais influenciaram a produção enzimática, bem como o curto período de cultivo (28 h, no caso do experimento 13) (Tabela 16).

Tabela 16 - Atividades enzimáticas totais (U g^{-1} ou U mL^{-1}) e atividades enzimáticas específicas (U mg^{-1}), de *Gongronella butleri* em cultivo em estado sólido, sobre composição de substrato fixado em 25% de farelo de trigo e 75% de farelo de soja, após emprego de delineamento composto central rotacional (DCCR), com quatro repetições no ponto central.

Experimento	Fatores decodificados			Atividade enzimática total				Atividade enzimática específica	
				Amilase		Pectinase		Amilase	Pectinase
	Umidade (%)	Temperatura (°C)	Tempo de cultivo (h)	U g^{-1}	U mL^{-1}	U g^{-1}	U mL^{-1}	U mg^{-1}	
1	53,15	25	36	2,07	0,21	8,72	0,87	0,13	0,55
2	53,15	25	60	17,84	1,78	42,26	4,23	0,62	1,46
3	53,15	35	36	9,09	0,91	29,32	2,93	0,60	1,92
4	53,15	35	60	18,70	1,87	164,41	16,44	0,94	8,25
5	66,76	25	36	1,72	0,17	6,60	0,66	0,08	0,29
6	66,76	25	60	29,24	2,92	174,31	17,43	1,11	6,65
7	66,76	35	36	14,79	1,48	171,67	17,17	0,67	7,72
8	66,76	35	60	16,57	1,66	166,39	16,64	0,80	8,07
9	45,21	30	48	2,87	0,29	2,97	0,30	0,13	0,14
10	70,94	30	48	15,14	1,51	103,66	10,37	0,58	4,00
11	61,37	22	48	3,16	0,32	5,02	0,50	0,17	0,28
12	61,37	38	48	12,95	1,29	128,76	12,88	0,72	7,15
13	61,37	30	28	3,10	0,31	12,28	1,23	0,22	0,89
14	61,37	30	68	32,35	3,23	246,62	24,66	1,39	10,62
15	61,37	30	48	28,20	2,82	196,76	19,68	1,20	8,39
16	61,37	30	48	25,56	2,56	189,50	18,95	2,52	18,66
17	61,37	30	48	28,20	2,82	216,57	21,66	1,16	8,91
18	61,37	30	48	32,41	3,24	200,73	20,07	1,23	7,63

Fonte: Elaborado pelo autor.

As mais altas atividades amilolíticas foram observadas nos pontos centrais experimentais (15 a 18), média de $28,59 \text{ U g}^{-1}$ (atividade específica média $1,53 \text{ U mg}^{-1}$) e nos experimentos 6 ($29,24 \text{ U g}^{-1}$) e 14 ($32,35 \text{ U g}^{-1}$) (Figura 32 e Tabela 16). Tais resultados foram aproximadamente duas vezes inferiores aos obtidos por Cavalheiro et al. (2017), cultivando o mesmo fungo a 25°C , por 96 h, sobre farelo de trigo com umidade inicial de 55%. Entretanto, é interessante ressaltar, que a condição experimental de mais alta atividade amilolítica aqui observada (experimento 14: umidade inicial = 61,37%; tempo de cultivo = 68 h), atingiu valor de atividade enzimática semelhante à obtida por Cavalheiro et al. (2017) a 30°C ($30,0 \text{ U g}^{-1}$), em um dos testes realizados pelos autores, só que em um percentual de umidade e tempo de cultivo inferior as condições por eles empregadas (65% de umidade inicial, num período de 120 h).

Coelho A. et al. (2020), obtiveram máxima atividade amilolítica ($1,14 \text{ U mL}^{-1}$), 2,8 vezes inferiores ao ponto máximo obtido no presente estudo (experimento 14), após emprego de DCCR em cultivo submerso, por 72 h, de levedura selvagem isolada de farinha de mandioca fermentada, visando determinar as melhores condições de pH, temperatura, percentual de inóculo e de amido adicionado ao meio de cultivo.

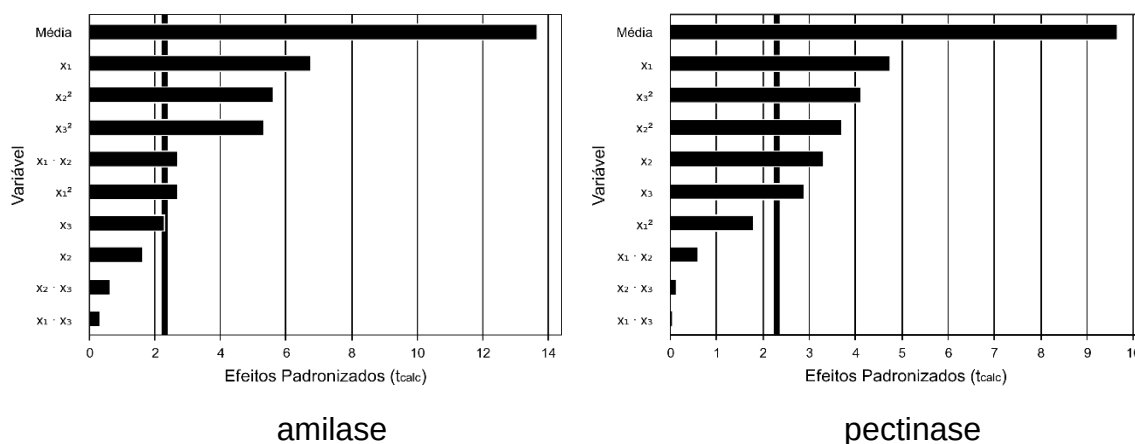
Em estudos com otimização de produção de α -amilases empregando *A. niger* (LIMA, 2019) e *A. oryzae* (BHANDARI, 2018), em cultivos em estado sólido a 30°C sobre bagaços de malte de cevada e maçã, respectivamente, os autores obtiveram máximas atividades amilolíticas de $622,25 \text{ U g}^{-1}$ (80% de umidade; 102,1 h de fermentação e 85,9% de substrato) e 6.475 U g^{-1} (30°C ; 70% de umidade; 96 h de fermentação; pH 3,0; 0,25 M de nitrato de sódio).

Assim como para as pectinases, as atividades amilolíticas específicas tiveram comportamento semelhantes, apresentando-se mais baixas nos experimentos com menores valores de atividade enzimática e mais altas nos experimentos com maiores valores de atividade amilolítica (Tabela 16).

Em termos estatísticos, pelo menos duas das variáveis independentes empregadas no DCCR, apresentaram efeito significativo sobre a produção enzimática, seja de amilases ou pectinases. O efeito de maior importância no processo foi o tempo de cultivo (x_1), apresentando coeficiente positivo para ambos os casos, sugerindo que maiores tempos de incubação são mais favoráveis a maior produção enzimática (Figura 33 e APÊNDICE F).

A temperatura (x_2) de forma isolada, assim como a combinação dessa variável independente com o volume de solução mineral nutritiva (x_3), e a combinação de x_1 (tempo de cultivo) com x_3 , não apresentaram efeitos significativos ($p > 0,05$) para as amilases. De forma similar, as combinações dos fatores estudados, assim como o efeito quadrático de x_1 , não influenciaram significativamente as atividades pectinolíticas, sendo retirados na construção dos modelos empíricos ajustados (Figura 33 e APÊNDICE F).

Figura 33 – Diagramas de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis independentes sobre a produção de amilases e pectinases, após cultivo em estado sólido de *Gongronella butleri*, empregando delineamento composto central rotacional (DCCR), com quatro repetições do ponto central.



Fonte: Elaborado pelo autor. Nível de significância de 5%. x_1 = tempo (h) de cultivo; x_2 = temperatura (°C) de incubação; x_3^* = volume (mL) da solução mineral nutritiva.

*Conforme cálculos matemáticos, o emprego da variável x_3 em unidades de volume, apresentou-se praticamente similar ao emprego da unidade em percentual de umidade (diferença menor que 5%). Assim, optou-se por utilizar a unidade expressa em volume, na construção dos gráficos de resposta.

A Tabela 17 apresenta os modelos matemáticos ajustados que relacionam a produção enzimática com os parâmetros independentes estudados, após emprego do DCCR. É bom lembrar que os modelos obtidos são empíricos sendo aplicáveis apenas em uma determinada região. Nota-se que os modelos quadráticos ajustados às atividades pectinolíticas e amilolíticas foram significativos (95% de confiança), e explicaram mais de 84 e 90% da variação observada, respectivamente.

O coeficiente de determinação ou explicação R^2 quantifica a qualidade do ajustamento, pois fornece uma medida da proporção da variação explicada pela

equação de regressão em relação à variação total das respostas (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

O teste F apresenta a razão entre o $F_{\text{calculado}}$ e o F_{tabelado} . Sempre que essa relação for maior que um, a regressão é estatisticamente significativa, informando que há relação entre as variáveis independentes e dependentes. Para que uma regressão seja não apenas estatisticamente significativa, mas também útil para fins preditivos, o valor da razão deve ser no mínimo maior que quatro (BARROS-NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). Nesse caso, além de serem significativos, os modelos empíricos obtidos também são preditivos, pois apresentaram uma relação entre $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ de 4,25 e 5,80, para a atividade pectinolítica e amilolítica, respectivamente (APÊNDICE G).

Os dados experimentais para a atividade amilolítica não apresentaram falta de ajuste ($p > 0,05$) ao modelo empírico adotado, diferentemente dos dados para a atividade pectinolítica (Tabela 17). A baixa falta de ajuste dos dados associados à atividade pectinolítica pode ser associada a variação aleatória (erro puro) dos dados em torno da reta de regressão. Entretanto, nota-se que os dados se encontram próximos à reta, e quando somados, os desvios tendem a zero, indicando que o modelo é válido (APÊNDICE H).

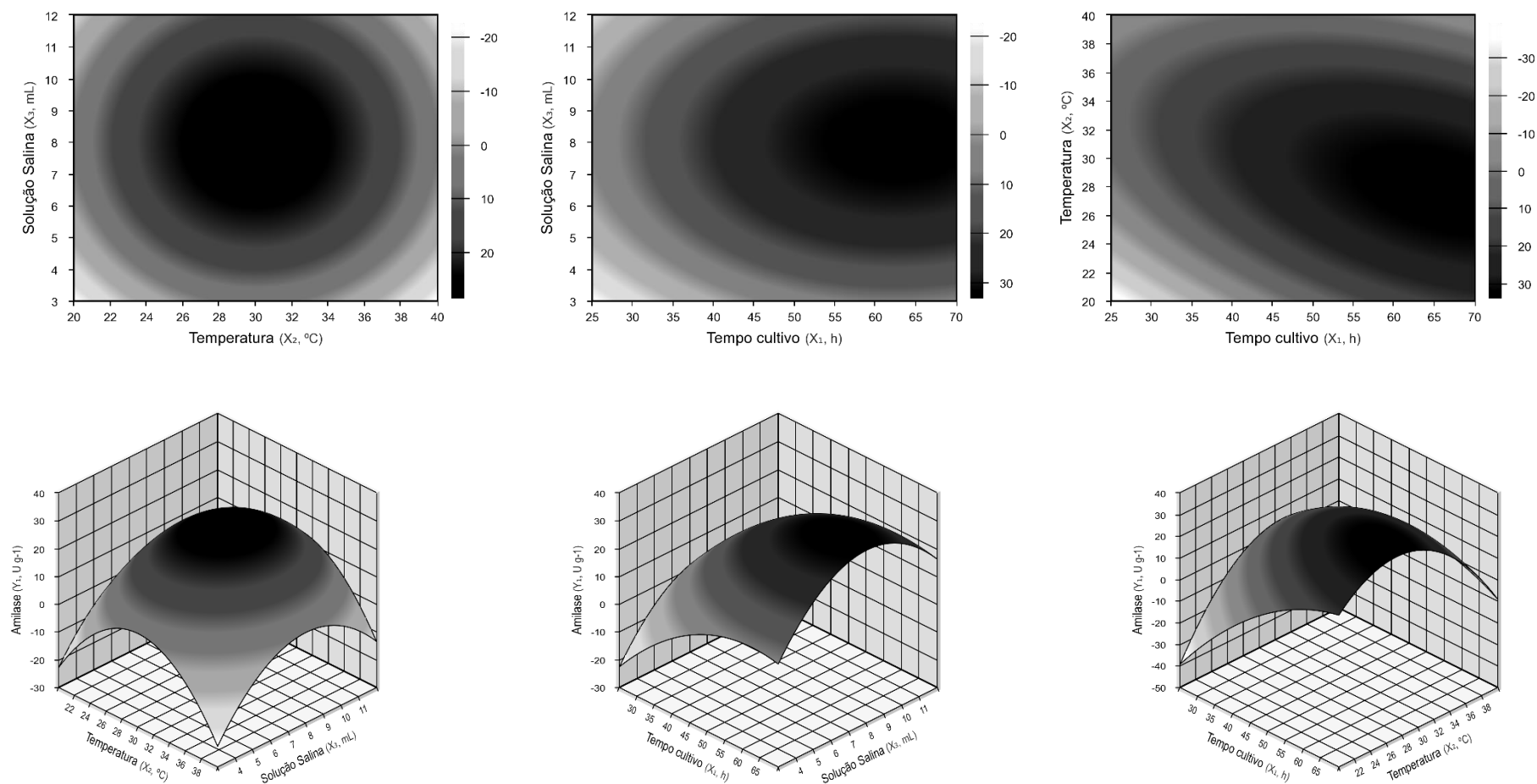
Tabela 17 – Modelos empíricos ajustados a produção de amilases e pectinases, após emprego de delinamento composto central rotacional (DCCR).

Atividade	Equação	R^2 (aj)*	p	Falta ajuste (p)
Amilase	$Y_1 = 28,44 + 7,61 x_1 - 3,15 x_1^2 - 6,57 x_2^2 + 2,58 x_3 - 6,23 x_3^2 - 3,99 x_1 x_2$	90,71%	0,000044	0,230886
Pectinase	$Y_2 = 177,28 + 53,10 x_1 + 37,20 x_2 - 38,77 x_2^2 + 32,48 x_3 - 43,57 x_3^2$	84,64%	0,000156	0,020473

Fonte: Elaborado pelo autor. *Coeficiente de determinação após ajustamento dos dados. Nível de significância $p \leq 0,05$. Y = atividade enzimática; x_1 = tempo de cultivo (h); x_2 = temperatura (°C); x_3 = volume de solução mineral nutritiva (mL) adicionada aos meios de fermentação.

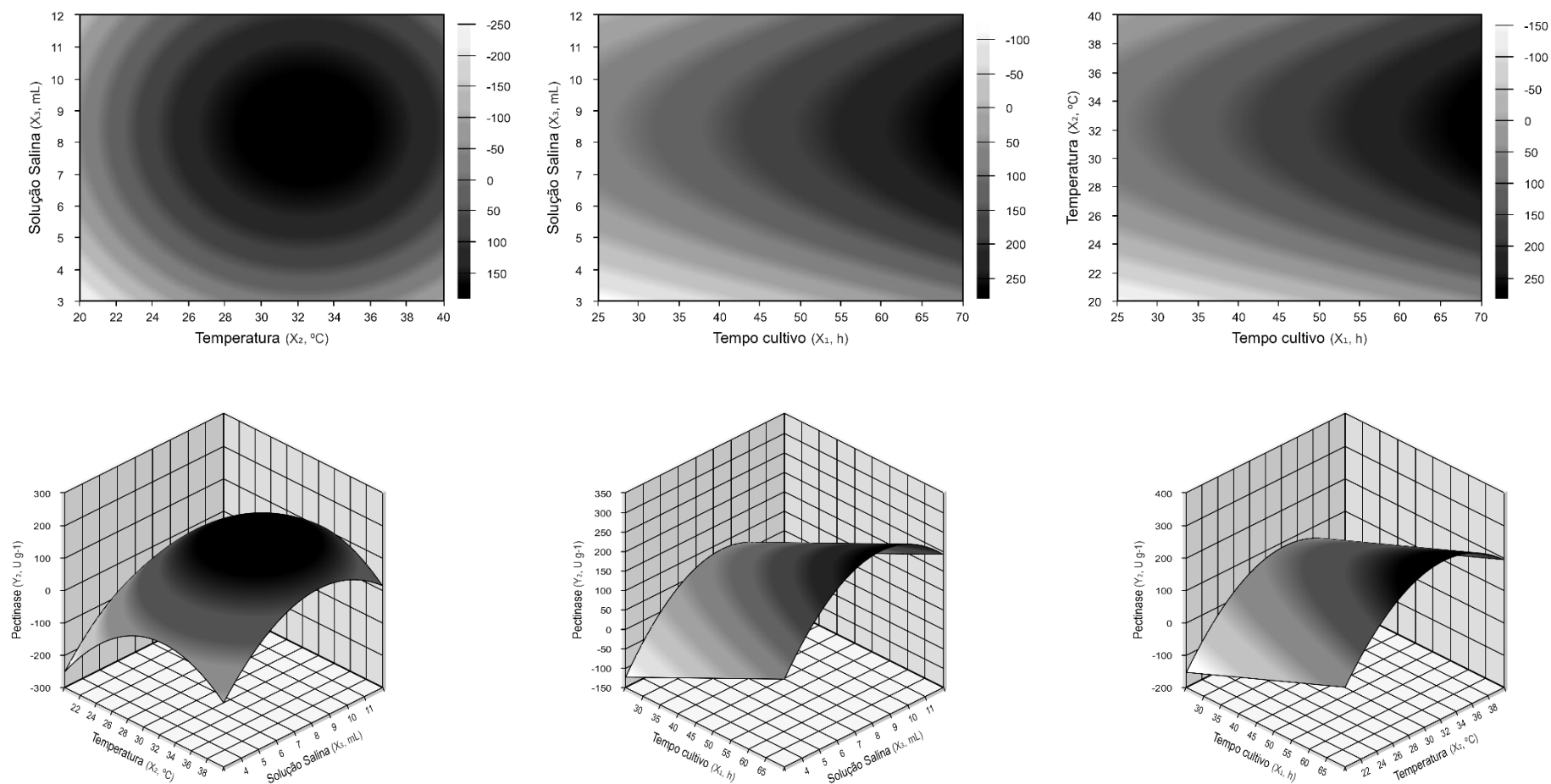
Os modelos ajustados aos dados experimentais foram usados para obtenção das respectivas curvas de contorno e gráficos de superfície de resposta (Figura 34 e 35), que são descrições gráficas do modelo, e simplificam a interpretação dos resultados.

Figura 34 – Curvas de contorno e gráficos de superfície de resposta, referentes aos efeitos das variáveis independentes sobre a atividade amilolítica (U g^{-1}) de *Gongronella butleri*, após cultivo em estado sólido sobre 25% de farelo de trigo e 75% de farelo de soja, empregando delineamento composto central rotacional (DCCR), com quatro repetições no ponto central.



Fonte: Elaborado pelo autor. Y = atividade enzimática (U g^{-1}); x_1 = tempo de cultivo (h); x_2 = temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$); x_3 = volume de solução mineral nutritiva (mL).

Figura 35 – Curvas de contorno e gráficos de superfície de resposta, referentes aos efeitos das variáveis independentes sobre a atividade pectinolítica (U g^{-1}) de *Gongronella butleri*, após cultivo em estado sólido sobre 25% de farelo de trigo e 75% de farelo de soja, empregando delineamento composto central rotacional (DCCR), com quatro repetições no ponto central.



Fonte: Elaborado pelo autor. Y = atividade enzimática (U g^{-1}); x_1 = tempo de cultivo (h); x_2 = temperatura de incubação (°C); x_3 = volume de solução mineral nutritiva (mL).

Pela análise da curva de contorno e superfície de resposta, quando se considera as variáveis temperatura de incubação (x_2) e volume de solução mineral nutritiva (x_3), observa-se que temperaturas abaixo de 28°C e acima de 34°C tendem a inibir a produção de amilases e pectinases. A faixa de ótima produção de amilases (acima de 20 U g⁻¹) encontra-se na condição entre 26-34°C, com umidificação inicial do meio de 6 a 10 mL, tendendo a máxima atividade a 30°C em 7,5 mL de solução mineral (61,37% de umidade inicial) (Figuras 34 e 35).

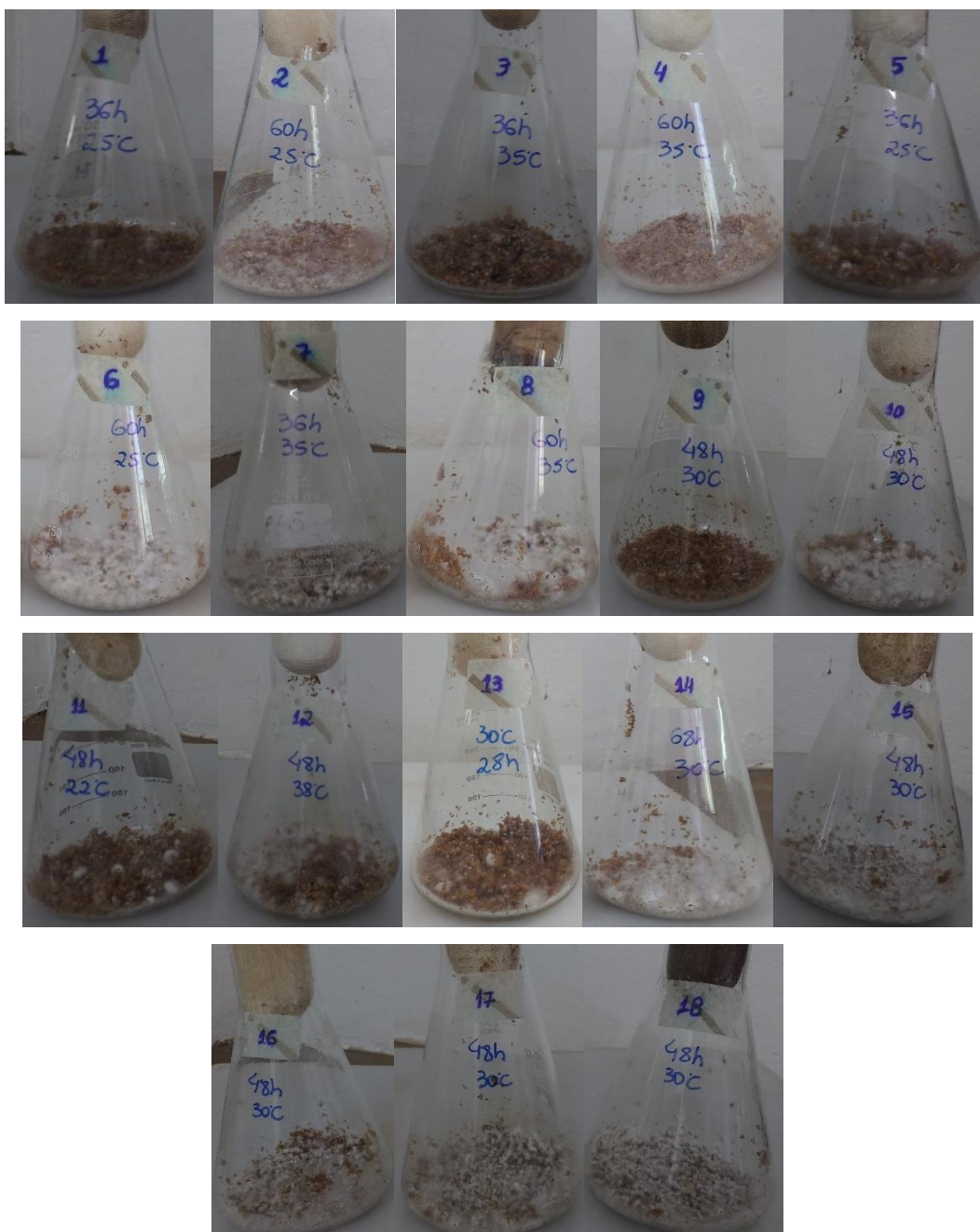
A faixa de ótima produção de amilases (acima de 30 U g⁻¹) e pectinases (acima de 250 U g⁻¹), quando da associação das variáveis tempo de cultivo (x_1) e volume de solução mineral nutritiva (x_3), está entre 52 e aproximadamente 71 h (para as amilases); e acima de 65 h de cultivo (para as pectinases), considerando-se uma umidificação entre 6,5 a 10 mL. Condição semelhante é observada quando da combinação das variáveis tempo de cultivo (x_1) e temperatura de incubação (x_2). Nessa condição, a faixa de ótima produção amilolítica também variou entre 52 a aproximadamente 72 h, com temperaturas variando entre 25-31°C (para amilases); e acima de 65 h de cultivo, com temperaturas entre 28-36°C (para as pectinases) (Figura 34 e 35).

Considerando tais observações sugere-se empregar as seguintes condições para uma máxima atividade tanto amilolítica, quanto pectinolítica: cultivo em farelo de trigo/soja na proporção (FT25%:FS75%); em temperatura de incubação de 30°C; com umidificação inicial de 7,5 mL de solução mineral nutritiva (atingindo umidade aproximada de 61%); por um tempo de 65 h de cultivo. Tal condição é bem similar a obtida empiricamente (experimento 14; Tabela 16), só que com a vantagem de ser realizada num tempo um pouco mais curto, reduzindo consequentemente gastos com energia, devido à incubação.

O crescimento micelial sobre as diferentes condições experimentais do DCCR, está apresentado na Figura 36. Nota-se que em condições de menor colonização micelial (experimentos 1, 3, 5, 9, 11, 12, 13), também foi observada menor atividade ao menos em uma das atividades enzimáticas analisadas. Nessas condições observou-se baixo teor de umidade inicial ($\leq 53,15\%$); curto período de cultivo (≤ 36 h); assim como baixa temperatura de incubação ($\leq 25^\circ\text{C}$). Os experimentos com maior colonização visível (6, 8 10, 14, 15, 16, 17 e 18) apresentaram maior teor inicial de umidade no meio ($\geq 61,37\%$), e neles foram observadas atividades amilolíticas e

pectinolíticas, maiores ou iguais a 15 U g^{-1} e $103,66 \text{ U g}^{-1}$, respectivamente. (Tabela 16).

Figura 36 - Colonização de *Gongronella butleri* sobre proporção de substrato fixado (25% de farelo de trigo e 75% de farelo de soja), em diferentes condições experimentais obtidas por delineamento composto central rotacional (DCCR), com quatro repetições no ponto central.



Fonte: Próprio autor.

6 CONCLUSÃO

Observou-se que a cepa fúngica de *Gongronella butleri*, isolada do solo do Cerrado, teve a capacidade de utilizar o amido e a pectina como principal fonte de carbono e energia para o seu desenvolvimento.

Foi notado potencial crescimento micelial e produção de amilases e pectinases sobre os diferentes substratos agroindustriais testados, sendo o farelo de soja e trigo os que promoveram maior capacidade de indução enzimática, especialmente para pectinases.

Os picos de maior produção amilolítica e pectinolítica se mantiveram dentro da faixa de 48 a 96 horas de cultivo, independentemente do substrato empregado, demonstrando eficiência da cepa para o emprego comercial, especialmente se testes mais aprofundados de otimização e de segurança biológica forem realizados.

O fator que mais teve influência na produção enzimática foi o teor de umidade inicial do meio de cultivo, sendo a combinação de substratos farelo de trigo e farelo de soja, também importante para as melhores respostas obtidas.

Foram observados aumentos consideráveis na atividade enzimática, especialmente pectinolítica, em comparação aos acréscimos na atividade amilolítica, quando da combinação de 25% de farelo de trigo e 75% de farelo de soja; associado ao cultivo a 30°C por 68 h, após emprego de delinamento composto central rotacional. Essas mesmas condições, só que num período de 65 h, seriam as mais satisfatórias para ambas enzimas, com produção de amilases iguais ou maiores a 30 U g⁻¹ e de pectinases, iguais ou maiores a 250 U g⁻¹; representando acréscimos respectivos em atividade de mais de 56% para amilases e 87% para pectinases, quando comparado ao uso isolado de tais substratos, num cultivo a 30°C, por 72 h.

Sugere-se, para estudos futuros, testar as características e o desempenho das atividades enzimáticas obtidas nas melhores condições aqui empregadas, em diferentes níveis de pH e temperatura; verificar o efeito residual das atividades enzimáticas dos extratos brutos após armazenamento ou manutenção sob diferentes condições; aplicar os extratos brutos enzimáticos, sobre misturas ou soluções (principalmente aquelas obtidas de vegetais que contem em sua composição pectina), visando observar os efeitos sobre a clarificação e turbidez das mesmas; e realizar experimentos utilizando condições que possam validar os modelos empíricos que foram aqui obtidos para a produção de amilases e pectinases.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, R.; JAFER, A.; NISAR, K.; KALEEN, A.; IQTEDAR, M.; IFTIKHAR, T.; SALEEN, F.; NAZ, S. Process optimization for pectinase production by locally isolated fungal strain using submerged fermentation. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 34, n. 4, p. 1025-1032, jul./aug. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.14393/Bj-v34n1a2018-39947>>. Acesso em: 23 fev. 2020.
- ABREU; J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Revista Uningá Review**, Maringá, v. 21, n. 1, p. 55-59, jan./mar. 2015. Disponível em: <<http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/1613>>. Acesso em: 31 jul. 2021.
- AHMAD, T.; DANISH, M.; KALE, P.; GEREMEW, B.; ADELOJU, S. B.; NIZAMI, M.; AYOUB, M. Optimization of process variables for biodiesel production by transesterification of flaxseed oil and produced biodiesel characterizations. **Renewable Energy**, Lemesos, v. 139, p. 1272-1280, aug. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.03.036>>. Acesso em: 09 maio 2020.
- AKILANDESWARI, P.; PRADEEP, B. V. Exploration of industrially important pigments from soil fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 100, n. 4, p. 1631-1643, feb. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-015-7231-8>>. Acesso em: 15 abr. 2019.
- ALMALKI, M. A. Solid state fermentation of agro-residues for the production of amylase from *Bacillus subtilis* for industrial applications. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Kancheepuram, v. 7, n. 3, p. 1341-1348, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.703.160>>. Acesso em: 28 jun. 2021.
- ALMEIDA, A. C. P. S.; SILVA, L. M. M.; BRITO NETO; J. S.; GUEDES-CELESTINO, E. L. F.; SILVA, J. M.; SILVA, C. S.; NASCIMENTO, M. S.; CRISTO, C. C. N.; SANTOS, T. M. C. Cultivo axênico de cogumelos comestíveis em resíduos agroindustriais. In: ENCONTRO REGIONAL DE ESTUDOS AGROAMBIENTAIS, 1., 2018, Rio Largo. **Revista Craibeiras de Agroecologia**, Rio Largo, v. 3, n. 1, p. e6651, dez. 2018. Disponível em: <<http://seer.ufal.br/index.php/era/article/view/6651>>. Acesso em: 10 jan. 2018.
- ALVARENGA, R. L. M.; NAVES, L. R. R.; XAVIER-SANTOS, S. The genus *Auricularia* Bull. Ex Juss. (*Basidiomycota*) in Cerrado (128 Brazilian savanna) areas of Goiás state and the Federal District, Brazil. **Mycosphere**, Guiyang, v. 6, n. 5, p. 532-541, sep. 2015. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.5943/mycosphere/6/5/3>>. Acesso em 05 abr. 2019.
- ALVARENGA, R. L. M.; XAVIER-SANTOS, S. A checklist of jelly fungi (*Agaricomycotina: Basidiomycota*) recorded in Brazil. **Mycotaxon**, Portland, v. 130, n. 3, p. 925-926(2), jul./sep. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.5248/130.925>>. Acesso em: 04 abr. 2019.

ALVARENGA, R. L. M.; XAVIER-SANTOS, S. New records of *Dacrymycetes* (Fungi: *Basidiomycota*) from the Cerrado biome (129razilian savanna) and Midwest region, Brazil. **Checklist**, Washington, v. 13, n. 4, p. 335-342, aug. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.15560/13.4.335>>. Acesso em: 05 abr. 2019.

ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 225-230, dez. 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1517-83822002000400009>>. Acesso em: 14 set. 2021.

ALVES-PRADO, H. F. **Purificação e caracterização de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3 e *Bacillus clausii* E16: caracterização das ciclodextrinas, clonagem e sequenciamento do gene da CGTase de *Bacillus clausii* E16**. 2005. 166 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, Campus de Rio Claro. 2005.

AMIN, F.; BHATTI, H. N.; BILAL, M. Recent advances in the production strategies of microbial pectinases – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, Tenbury Wells, v. 122, p.1017-1026, feb. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.048>>. Acesso em: 19 mar. 2019.

ANDRADE, A. S. A.; OLIVEIRA NETO, N. J.; DIAS, E. C.; GERVÁSIO, D. K. L.; LIMA, M. K. L.; SANTOS, S. F. M.; SOUSA, A. C. B.; ALMEIDA, A. F. Estudo da produção de enzimas pectinolíticas e celulotíticas por fermentação em estado sólido a partir do bagaço de cajá. **Revista Saúde & Ciência Online**, Campina Grande, v. 7, n. 2, p. 457-472, maio/ago. 2018. Disponível em: <<https://rsc.revistas.ufcg.edu.br/index.php/rsc/article/view/129>>. Acesso em: 06 maio 2021.

ANDRADE, M. V. R. F.; DEUSDARÁ, T. T.; SCHEIDT, G. N.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. Isolamento, caracterização fenotípica e perfil de crescimento de cepas do fungo *Cunninghamella* sp. de solo do Sul do Tocantins, Brasil. **Biota Amazônia**, Macapá, v. 5, n. 2, p. 58-68, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v5n2p58-64>>. Acesso em: 06 maio 2021.

ANDRADE-LINARES, D. R.; VERESOGLOU, S. D.; RILLIG, M. C. Temperature priming and memory in soil filamentous fungi. **Fungal Ecology**, London, v. 21, p. 10-15, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.02.002>>. Acesso em: 17 abr. 2020.

ANTONIÊTO, A. C. C.; CASTRO, L. S.; SILVA-ROCHA, R.; PERSINOTI, G. F.; SILVA, R. N. Defining the genome-wide role of CRE1 during carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* using RNA-Seq analysis. **Fungal Genetics and Biology**, Maryland Heights, v. 73, p. 93-103, dec. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.10.009>>. Acesso em: 24 jun. 2021.

AQUILANI, B.; SILVESTRE, C.; IOPPOLO, G.; RUGGIERI, A. The challenging transition to bio-economies: towards a new framework integrating corporate sustainability and value co-creation. **Journal of Cleaner Production**, Brno, v. 172, p. 4001-4009, jan. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.153>>. Acesso em: 06 jun. 2020.

ARAUJO, A. S. F.; BEZERRA, W. M.; SANTOS, V. M.; NUNES, L. A. P. L.; LYRA, M. C. C. P.; FIGUEIREDO, M. V. B.; MELO, V. M. M. Fungal diversity in soils across a gradient of preserved Brazilian Cerrado. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 55, n. 4, p. 273-279, apr. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12275-017-6350-6>>. Acesso em: 20 mar. 2019.

ARAÚJO, W. F.; ROCHA, L. M.; ARAÚJO, I. M. S.; PAULA, G. A.; SOUSA, L. S.; FOLHA, M. F.; ROCHA FILHO, L. B.; ARAÚJO, R. V. Sustentabilidade em agroindústrias: alternativas para evitar o desperdício de resíduos agroindustriais do pedúnculo de caju - uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 4, n. 7, ed. esp., p. 4546-4569, nov. 2018. Disponível em: <<http://www.brjd.com.br/index.php/BRJD/article/view/714/606>>. Acesso em: 11 mar. 2018.

ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. Cunninghamella—A microbial model for drug metabolism studies—A review. **Biotechnology advances**, Rehovot, v. 27, n. 1, p. 16-29, jan./fev. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.005>>. Acesso em: 25 mar. 2019.

ATMODJO, M. A.; HAO, Z.; MOHNEN, D. Evolving views of pectin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 64, p. 747-779, mar. 2013. Disponível em: <[10.1146/annurev-arplant-042811-105534](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105534)>. Acesso em: 15 ago. 2021.

AZUMA, K.; OSAKI, T.; KUROZUMI, S.; KYIOSE, M.; TSUKA, T.; MURAHATA, Y.; IMAGAWA, T.; ITOH, N.; MINAMI, S.; SATO, K. OKAMOTO, Y.; Anti-inflammatory effects of orally administered glucosamine oligomer in an experimental model of inflammatory bowel disease. **Carbohydrate Polymers**, Aveiro, v. 115, p. 448-456, jan. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.012>>. Acesso em: 18 abr. 2021.

BABU, A. G.; KIM, S. W.; ADHIKARI, M.; YADAV, D. R.; UM, Y. H.; KIM, C.; LEE, H. B.; LEE, Y. S. A New record of *Gongronella butleri* isolated in Korea. **Mycobiology**, Abingdon, v. 43, n. 2, p. 166-169, jun. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.2.166>>. Acesso em: 31 jan. 2021.

BAGHERI, A.; KHODARAHMI, R.; MOSTAFAIE, A. Purification and biochemical characterization of glucoamylase from a newly isolated *Aspergillus niger*: Relation to starch processing. **Food Chemistry**, Barking, v. 161, p. 270-278, oct. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.095>>. Acesso em: 27 jun. 2021.

BARBOSA, J. R.; RODRIGUES, I. C. S.; OLIVEIRA, M. E. C. Avaliação da produtividade e eficiência biológica de macrofungos comestíveis cultivados em resíduos agroindustriais da Amazônia. In: SIMPÓSIO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS NA AMAZÔNIA, 6., 2017, Belém. **Anais...** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, universidade do Estado do Pará, 2017. p. 605-611. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1085748/avaliacao-da-produtividade-e-eficiencia-biologica-de-macrofungos-comestiveis-cultivados-em-residuos-agroindustriais-da-amazonia>>. Acesso em 15 jun. 2020.

BARCELOS, M. C. S.; VESPERMANN, K. A. C.; PELISSARI, F. M.; MOLINA, G. Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Abingdon, v. 60, n. 9, p. 1475-1495, feb. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1575791>>. Acesso em: 09 abr. 2020.

BARRETO, A. G.; CABRAL, L. M. C.; MATTA, V. M.; FREITAS, S. P. Clarificação de polpa de camu-camu por microfiltração. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 207-215, set. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1981-67232013005000026>>. Acesso em: 13 jul. 2021.

BARROS, R. N.; SANTOS, M. S. M.; CARDOSO, C. A. L.; BATISTOTE, M. A utilização de resíduos agroindustriais para a produção de bioetanol. **Revista Gestão e Sustentabilidade Ambiental**, Florianópolis, v. 8, n. 1, p. 31-43, jan./mar. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.19177/rgsa.v8e1201931-43>>. Acesso em: 04 jun. 2020.

BARROS-NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 414p.

BARROZO, V. P.; SOUSA, H. A.; SANTOS, M. A. O.; ALMEIDA, L. C. P.; WEISS, C. Desperdício de alimentos: o peso das perdas para os recursos naturais. **Agroecossistemas**, Belém, v. 11, n. 1, p. 75-96, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.18542/ragros.v11i1.6551>>. Acesso em: 11 mar. 2020.

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, nov. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2010001100008>>. Acesso em 04 abr. 2019.

BCC RESEARCH: Market Research Reports & Industry Analysis. **Global Industrial Enzymes Market**. 2018. Disponível em: <<https://www.bccresearch.com/partners/verified-market-research/global-industrial-enzymes-market.html>>. Acesso em: 30 out. 2019.

BECHARA, R.; GOMEZ, A.; SAINT-ANTONIN, V.; SCHWEITZER, J. M.; MARÉCHAL, F. Methodology for the optimal design of integrated first and second generation ethanol production plant combined with power cogeneration. **Bioresource Technology**, New York, v. 214, p. 441-449, aug. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.130>>. Acesso em: 21 mar. 2019.

BENASSI, V. M.; ALMEIDA, A. Prospecção de fungos filamentosos termotolerantes e termofílicos de distintos materiais coletados no estado de Minas Gerais e análise de potenciais produtores de amilases. **Revista Unimontes Científica**, Montes Claros, v. 20, n. 1, p. 150-169, jan./jun. 2018. Disponível em: <<https://www.periodicos.unimontes.br/index.php/unicientifica/article/view/834>>. Acesso em: 03 maio 2021.

BERTOLDO, C.; ANTRANIKIAN, G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. **Current Opinion in Chemical Biology**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 151-160, apr. 2002. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s1367-5931\(02\)00311-3](https://doi.org/10.1016/s1367-5931(02)00311-3)>. Acesso em: 15 ago. 2021.

BERUDE, M. C.; ALMEIDA, D. S.; RIVA, M. M.; CABANÊZ, P. A.; AMARAL, A. A. Microrrizas e sua importância agroecológica. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 11, n. 22, p. 132-146, 2015. Disponível em: <<https://conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/1368>>. Acesso em: 31 jul. 2021.

BESSA, D. H. R. F. **Prospecção de enzimas lipolíticas em fungos para a produção de biodiesel**. 2019. 51f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)-Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde, 2019. Disponível em: <<https://repositorio.ifgoiano.edu.br/handle/prefix/828>>. Acesso em: 20 jan. 2020.

BEZERRA, S. S. N.; LIMOEIRO, A. Produção de enzimas por fungos isolados das folhas, frutos e árvores do Licuri. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS, 23., 2019, Feira de Santana. **Anais...** Feira de Santana: UEFS, Coordenação de Iniciação Científica, 2019. p. 1-5. Disponível em: <<https://doi.org/10.13102/semic.v0i23.6595>>. Acesso em: 29 jul. 2021.

BHANDARI, A. **Production of α -amylase by solid state fermentation of apple pomace**. 2018. 52 f. Dissertation (Bachelors of Technology in Biotechnology)-Department of Biotechnology and Bioinformatics, Jaypee University of Information Technology, Waknaghat, 2018.

BIBER-FREUDENBERGER, L.; BASUKALA, A. K.; BRUCKNER, M.; BÖRNER, J. Sustainability performance of national bio-economies. **Sustainability**, Basel, v. 10, n. 8, 2705, aug. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/su10082705>>. Acesso em: 06 jun. 2020.

BONOMINI, F. M.; WISBECK, E.; GERN, R. M. M. Produção de enzimas por *Pleurotus Sajor-caju* e *Pleurotus djamor*. **Revista NBC**, Belo Horizonte, v. 7, n. 14, p. 109-126, nov. 2017. Disponível em: <<https://www.metodista.br/revistas/revistas-izabela/index.php/bio/article/view/1369>>. Acesso em: 04 jul. 2021.

BONONI, V. L. R.; OLIVEIRA, A. K. M.; GUGLIOTTA, A. M.; QUEVEDO, J. R. Agaricomycetes (Basidiomycota, Fungi) diversity in a protected area in the Maracaju Mountains, in the brazilian central region. **Hoehnea**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 361-377, sep. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/2236-8906-70/2016>>. Acesso em: 09 mar. 2019.

BRASIL. Departamento Nacional de Produção Mineral. **Sumário Mineral 2016**. v. 36. Coord.: LIMA, T. M.; NEVES, C. A. R. Brasília: DNPM, 2018. Disponível em: <<http://www.anm.gov.br/dnpm/publicacoes/serie-estatisticas-e-economia-mineral/sumario-mineral/sumario-mineral-brasileiro-2016>>. Acesso em: 19 jul. 2018.

CABRAL, B. V.; CARMO, T. S.; FALLEIROS, L. N. S. S.; RESENDE, M. M.; RIBEIRO, E. J.; CARDOSO, V. L. Recycling influence in phosphorus biosolubilization from rock phosphate concentrate in air-lift bioreactor. **Chemical Engineering Transactions**, Milano, v. 57, p. 673-678, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3303/CET1757113>>. Acesso em: 22 mar. 2019.

CALAÇA, F. J. S.; MAGNAGO, A. C.; ALVARENGA, R. L. M.; XAVIER-SANTOS, S. *Phlebopus beniensis* (Boletiniaceae, Boletales) in the brazilian Cerrado biome. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 69, n. 2, p. 939-944, abr./jun. 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/2175-786020186924x6>>. Acesso em: 05 abr. 2019.

CÂMARA INTERMINISTERIAL DE SEGURANÇA ALIMENTAR E NUTRICIONAL - CAISAN. **Estratégia intersetorial para a redução de perdas e desperdício de alimentos no Brasil**. Brasília: MDS, 2018. 42 p. Disponível em: <https://www.mds.gov.br/webarquivos/arquivo/seguranca_alimentar/caisan/Publicacao/Caisan_Nacional/PDA.pdf>. Acesso em: 11 mar. 2019.

CANO, E. F. R.; NIMET, M. S.; BATISTELLA, M. A.; MAIORKI, F. M. GIBBERT, F. J.; MASCARO, M. H. N. Crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. em diferentes meios de cultura. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, Curitiba, v. 3, n. 4, p. 3119-3126, out./dez. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.34188/bjaerv3n4-032>>. Acesso em: 06 maio 2021.

CANTERI, M. H. G.; MORENO, L.; WOSIACKI, G.; SCHEER, A. P. Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 22, n. 2, p. 149-157, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0104-14282012005000024>>. Acesso em: 16 ago. 2021.

CARNEIRO, J. S. S.; SANTOS, A. C. M.; FIDELIS, R. R.; SILVA NETO, S. P.; SANTOS, A. C.; SILVA, R. R. Diagnóstico e manejo da variabilidade espacial da fertilidade do solo no cerrado do Piauí. **Revista de Ciências Agroambientais**, Alta Floresta, v. 14, n. 2, p. 11-21, 2016. Disponível em: <<https://periodicos.unemat.br/index.php/rcaa/article/view/1469>>. Acesso em: 31 jul. 2017.

CAROCHO, M.; BENTO, A.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Utilização de plantas como ingredientes bioativos e aditivos naturais em queijo de ovelha. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 40, n. esp., p. 321-328, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.19084/RCA16213>>. Acesso em: 15 abr. 2019.

CAROTA, E.; CROGNALE, S.; D' ANNIBALE, A.; PETRUCCIOLI, M. Bioconversion of agro-industrial waste into microbial oils by filamentous fungi. **Process Safety and Environmental Protection**, Manchester, v. 117, p.143-151, jul. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.04.022>>. Acesso em: 11 mar. 2020.

CARRILLO-SANCEN, G.; CARRASCO-NAVARRO, U.; TOMASINI-CAMPOCOSIO, A.; CORZO, G.; PEDRAZA-ESCALONA, M. M.; FAVELA-TORRES, E. Effect of glucose as a carbon repressor on the extracellular proteome of *Aspergillus niger* during the production of amylases by solid state cultivation. **Process Biochemistry**, London, v. 51, n. 12, p. 2001-2010, dec. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.09.001>>. Acesso em: 24 jun. 2021.

CARSTENS, E.; LINDE, C. C.; SLABBERT, R.; MILES, A. K.; DONOVAN, N. J.; LI, H.; ZHANG, K.; DEWDNEY, M. M.; ROLLINS, J. A.; GLIENKE, C.; SCHUTTE, G. C.; FOURIE, P. H.; McLEOD, A. A global perspective on the population structure and reproductive system of *Phyllosticta citricarpa*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 107, n. 6, p. 758-768, jun. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-16-0292-R>>. Acesso em: 10 mar. 2019.

CARVALHO, M. C. **Bioprodução de pectinase a partir de resíduo agroindustrial para a aplicação em produtos em produtos vegetais**. 2016. 108 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição)-Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <http://www.repositorio-bc.unirio.br:8080/xmlui/bitstream/handle/unirio/10899/Disserta%C3%A7%C3%A3o_Marcia%20Correa%20de%20Carvalho.pdf?sequence=1>. Acesso em: 28 jul. 2021.

CARVALHO, S.; PIRES, C. C.; WOMMER, T. P.; LOPES, J. F.; MÔNEGO, C. O.; PILECCO, V. M. Economicidade e desempenho produtivo de cordeiros confinados submetidos a dietas com resíduos agroindustriais. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1089-6891v17i119806>>. Acesso em: 04 jun. 2020.

CASTILLO, L. A.; FARENZENA, S.; PINTOS, E.; RODRÍGUEZ, M. S.; VILLAR, M. A.; GARCÍA, M. A.; LÓPEZ, O. V. Active films based on thermoplastic corn starch and chitosan oligomer for food packaging applications. **Food Packaging and Shelf Life**, Pulwama, v. 14, part B, p. 128-136, dec. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.10.004>>. Acesso em: 18 abr. 2021.

CASTRO, M. T. Micodiversidade associada a árvores de *Copaifera langsdorffii* Desf. em Brasília, Distrito Federal. **Flor@m Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 22, n. 2, p. 256-261, abr./jun. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/2179-8087.094914>>. Acesso em: 04 abr. 2019.

CAVALCANTI, R. B.; MARINHO FILHO, J.; MARINI, M. A.; MACHADO, R. B.; AGUIAR, L. M. S. Cerrado e Pantanal, reservas de vida. **Scientific American Brasil**, São Paulo, ed. esp., v. 39, 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/259000387_Cerrado_e_Pantanal_reservas_de_vida>. Acesso em: 31 jul. 2021.

CAVALHEIRO, G. F.; SANGUINE, I. S.; SANTOS, F. R. S.; COSTA, A. C.; FERNANDES, F.; PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Catalytic properties of amylolytic enzymes produced by *Gongronella butleri* using agroindustrial residues on solid-state fermentation. **BioMed Research International**, London, v. 2017, art. ID 7507523, p. 1-8, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2017/7507523>>. Acesso em: 19 jun. 2020.

CENTRO BRASILEIRO DE ANÁLISE E PLANEJAMENTO – CEBRAP. **Brazil Biotech Map 2011**. São Paulo, CEBRAP, 2011. 40p. Disponível em: <<https://cebrap.org.br/wp-content/uploads/2017/05/Brazil-Biotec-Map-2011.pdf>>. Acesso em: 05 jun. 2020.

COELHO, A. L. S.; SCARIOT, F. O.; ABREU-LIMA, T. L.; CARREIRO, S. C. C. Produção de amilases por levedura selvagem em resposta à diferentes condições de cultivo. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 8, n. 3, p. 179-186, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.20873/jbb.uft.cemaf.v8n3.coelho>>. Acesso em: 30 jul. 2021.

COELHO E.; REIS, T. A.; COTRIM, M.; MULLAN, T. K.; CORRÊA, B. Resistant fungi isolated from contaminated uranium mine in Brazil shows a high capacity to uptake uranium from water. **Chemosphere**, Amsterdã, v. 248, 1 9/126068, In Press, jun. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128845>>. Acesso em: 01 fev. 2021.

COELHO, M.A.Z.; LEITE, S.G.F.; ROSA, M.F.; FURTADO, A.A.L. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.19, n. 1, p.33-42, jan./jun. 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5380/cep.v19i1.1220>>. Acesso em: 19 jun. 2020.

CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA – CNI. **Bioeconomia: uma agenda para o Brasil**. Brasília: CNI, 2013. 40p. Disponível em: <https://bucket-gw-cni-static-cms-si.s3.amazonaws.com/media/filer_public/78/86/7886aeb1-57a8-4be2-9ad9-f8f31b176a8f/bioeconomia_uma_agenda_para_brasil.pdf>. Acesso em: 07 jun. 2020.

CONSERVATION INTERNATIONAL. **Biodiversity hotspots map**. 2014. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Biodiversity_Hotspots_Map.jpg>. Acesso em: 04 mar. 2019.

COSTA, R. Parede celular vegetal. **Revista de Ciência Elementar**, Porto, v. 7, n. 1, p. 1-6, mar. 2019. Disponível em: <<http://doi.org/10.24927/rce2019.006>>. Acesso em: 16 ago. 2021.

CRUZ, A. C.; PEREIRA, F. S.; FIGUEIREDO, V. S. **Fertilizantes organominerais de resíduos do agronegócio: avaliação do potencial econômico brasileiro**. v. 45. p. 137-187. Rio de Janeiro: BNDES Setorial, mar. 2017. Disponível em: <<http://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/11814>>. Acesso em: 04 jun. 2020.

DABAJA, M. Z.; VARANO, A.; SILVEIRA, G.; IKEGAKI, M.; PEREIRA, E. B. Avaliação da atividade enzimática de fungo endofítico isolado de *Annona crassiflora* (Marolo) com interesse biotecnológico. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Betim, v. 17, n. 1, p. 1-10, jan./jul. 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5892/ruvrd.v17i1.5051>>. Acesso em: 09 maio 2020.

DAVIS, R.; TAO, L.; SCARLATA, C.; TAN, E. C. D.; ROSS, J.; LUKAS, J.; SEXTON, D. **Process design and economics for the conversion of lignocellulosic biomass to hydrocarbons: dilute-acid and enzymatic deconstruction of biomass to sugars and catalytic conversion of sugars to hydrocarbons**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2015. 133 p. Disponível em: <<https://www.nrel.gov/docs/fy15osti/62498.pdf>>. Acesso em: 09 maio 2020.

DE TONISSI E BUSCHINELLI DE GOES, R. H.; YOSHIRAHARA CARNEIRO, M. M.; SILVA BRABES, K. C.; PAULA LANA, R. Coprodutos de crambe (*Crambe abyssinica* Hoechst) na alimentação de ruminantes. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 65, n. 249, p. 7-16, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.21071/az.v65i249.450>>. Acesso em: 23 fev. 2020.

DELLA LUCIA, T. M. C.; GANDRA, L. C.; GUEDES, R. N. C. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. **Pest Management Science**, New York, v. 70, n. 1, p. 14-23, jan. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/ps.3660>>. Acesso em: 15 mar. 2019.

DELIBERADOR, L. R.; BATALHA, M. O.; FREIRE, C. D.; FONTENELLE, A. M.; SABADINI, F. C. Perdas e desperdícios de alimentos ao longo da cadeia de suprimentos: uma análise de regiões desenvolvidas e em desenvolvimento. **South American Development Society Journal**, São Paulo, v. 4, n. esp. 01, p. 11-27, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.24325/issn.2446-5763.vespi1p11-27>>. Acesso em: 11 mar. 2020.

DIAS, H. C.; REIS, A. B. Estudo da viabilidade e desenvolvimento de filmes ativos a partir de resíduos da indústria vinícola. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, Viçosa, v. 5, n. 5, p. 444-451, dez. 2019. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.18540/jcecvl5iss5pp0444-0451>>. Acesso em: 04 jun. 2020.

DIAS, R. F.; CARVALHO, C. A. A. Bioeconomia no Brasil e no mundo: panorama atual e perspectivas. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 9, n. 1, p. 410-430, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20170023>>. Acesso em: 05 jun. 2020.

DINIZ, M. C.; MARTINS, M. G.; XAVIER, K. V. M.; SILVA, M. A. A.; SANTOS, E. A. Crise global coronavírus: monitoramento e impactos. **Cadernos de Prospecção**, Salvador, v. 13, n. 2, ed. esp., p. 359-377, abr. 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.9771/cp.v13i2.COVID-19.35937>>. Acesso em: 03 jun. 2020.

DORNELAS, A. S. P.; SARMENTO, R. A.; SANTOS, G. R.; NASCIMENTO, A. O.; SOUZA, D. J. Fungos filamentosos associados às espécies *Atta sexdens* (Linnaeus) e *Atta laevigata* (F. Smith) (Hymenoptera: Formicidae). **EntomoBrasilis**, Vassouras, v. 9, n. 1, p. 26-30, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.12741/ebrasilis.v9i1.528>>. Acesso em: 15 mar. 2019.

EL-CHICHAKLI, B.; VON BRAUN, J.; LANG, C.; BARBEN, D.; PHILP, J. Policy: five cornerstones of a global bioeconomy. **Nature**, Berlin, v. 535, n. 7611, p. 221-223, jul. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/535221a>>. Acesso em: 06 jun. 2020.

ELIZEI, V. G.; CHALFOUN, S. M.; BOTELHO, D. M. S.; REBELLES, P. P. R. Imobilização de fungos filamentosos com potencial para uso agroindustrial. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 81, n. 2, p. 165-172, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1808-1657001032012>>. Acesso em: 15 ago. 2021.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Biossolubilização de potássio *in vitro* a partir da rocha fonolito por microrganismos do solo**. Org.: SILVA, U. C.; MARRIEL, I. E.; PAIVA, C. A. O.; GOMES, E. A.; RESENDE, A. V.; LANA, U. G. P. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2015. (Documentos/Embrapa Milho e Sorgo 177). Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/130216/1/doc-177.pdf>>. Acesso em: 16 jun. 2020.

ENVIRONMENTAL PERFORMANCE INDEX – EPI. New Haven: Yale University, 2018. 4p. Disponível em: <<https://epi.yale.edu/downloads/epi2018policymakerssummaryv01.pdf>>. Acesso em: 03 jun. 2020.

ESTADO DE MINAS. Economia. **Agronegócio e comércio devem puxar o PIB em 2020**. Belo Horizonte, 09 jan. 2020. Disponível em: <https://www.em.com.br/app/noticia/economia/2020/01/09/internas_economia,1113093/agronegocio-e-comercio-devem-puxar-pib-em-2020.shtml>. Acesso em: 09 fev. 2020.

EUROPEAN COMMISSION. **Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions**. Strategy for “Innovating for sustainable grow: a bioeconomy for Europe”. Bruxelas: European Commission, 2012. 9p. Disponível em: <http://ec.europa.eu/research/bioeconomy/pdf/official-strategy_en.pdf>. Acesso em: 07 jun. 2020.

FARINHA, M. J. U. S.; BERNARDO, L. V. M.; SOARES FILHO, A.; BEREZUK, A. G.; SILVA, L. F.; RUVIARO, C. F. Opportunity cost of a private reserve of natural heritage, Cerrado biome – Brazil. **Land Use Policy**, Enschede, v. 81, p. 49-57, fev. 2019.

FERRAREZE, R. R.; BRAGA JÚNIOR, S. S.; BAPTISTA, R. D. Modelo de gestão de resíduos: desafios e perspectivas do setor de frigoríficos. **DRd – Desenvolvimento Regional em debate**, Santa Catarina, v. 8, n. 2, p. 68-88, jul./dez. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.24302/drd.v8i2.1721>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

FERREIRA, F. S.; BATISTA, I. H.; FERREIRA, A. S.; ALBUQUERQUE, C. C.; SILVA, A. C. Otimização das condições de crescimento de fungos degradadores de madeira. **Marupiara – Revista Científica do Centro de Estudos Superiores de Parintins**, Parintins, ano 1, n. 1, p. 1-24, jan. 2016. Disponível em: <<http://periodicos.uea.edu.br/index.php/marupiara/article/view/430>> Acesso em: 06 maio 2021.

FERREIRA, V. H. S. Sustentabilidade global e desenvolvimento local. **Revista Maiêutica - Urbanidades**, Indaial, v. 1, n. 01, p. 21-27, 2017.

FINKLER, A. T. J. **Estudo da agitação intermitente na produção de pectinases por fermentação em estado sólido em escala piloto**. 2016. 72 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016. Disponível em: <<https://www.acervodigital.ufpr.br/handle/1884/46224>>. Acesso em: 27 jun. 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS – ONU. 2016. **Desperdício global de alimentos gera prejuízo de 750 bilhões de dólares por ano, calcula FAO**. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/desperdicio-global-de-alimentos-gera-prejuizo-de-750-bilhoes-de-dolares-por-ano-calcula-fao/>>. Acesso em: 11 mar. 2020.

FRANÇA. **Une stratégie bioéconomie pour la France**: enjeux et vision. 2017. 36p. Disponível em: <http://www.iar-pole.com/wp-content/uploads/2017/01/170119_planstrategique_bioeconomie.pdf>. Acesso em: 07 jun. 2020.

FRANÇA, I. B.; SILVA, C. A. A. Utilização de resíduos agroindustriais na produção de amilase por *Aspergillus niger* UCP 1095 através de fermentação submersa. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 5, p. 51331-51345, maio 2021. Disponível em: <<https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/30169>>. Acesso em: 09 jul. 2021.

FREITAS, F.; TORRES, C. A. V.; REIS, M. A. M. Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. **Bioresource Technology**, Londres, v. 245, part B, p. 1674-1683, dec. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.092>>. Acesso em: 06 maio 2020.

FREITAS, L. W. S.; OLIVEIRA, R. J. V.; LEITE, T. R. C.; NGUYEN, T. T. T.; LIM, H. J.; LEE, H. B.; SANTIAGO, A. L. C. M. A. *Gongronella pedratalhadensis*, a new species of Mucorales (Mucoromycota) isolated from the Brazilian Atlantic Forest, with na identification key for the genus. **Sydowia**, Horn, v. 73, p. 61-68, oct. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.12905/0380.sydowia72-2020-0061>>. Acesso em: 31 jan. 2021.

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **The Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 41, n. 5, p. 583-603, sep. 1954. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a126476>>. Acesso em: 03 mar. 2020.

GAARDER, J. **O mundo de Sofia**: romance da história da filosofia. Tradução do norueguês Leonardo Pinto Silva. 1. ed. 11. reimp. São Paulo: Companhia das Letras, 2002. 566 p.

GEISSDOERFER, M.; SAVAGET, P.; BOCKEN, N. M. P.; HULTINK, E. J. The circular economy – a new sustainability paradigm? **Journal of Cleaner Production**, Brno, v. 143, p. 757-768, feb. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.12.048>>. Acesso em: 03 jun. 2020.

GOMES, B. C. C.; PERAL FILHO, P. P.; CARMO, T. S.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Avaliação da bio-solubilização de fósforo proveniente de concentrado de rocha fosfática por fermentação sólida e líquida utilizando *Trichoderma reesei*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12., 2017, São Carlos. **Anais...** São Paulo: Blucher Chemical Engineering Proceedings, v. 1, n. 4, jul. 2017. Disponível em: <<http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeqic2017/269.pdf>>. Acesso em: 22 mar. 2019.

GONÇALVES, L. A. **Produção e caracterização de amilase secretada por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA**. 2019. 51 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Ilha Solteira, 2019. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/181158>>. Acesso em: 28 jun. 2021.

GHORMADE, V.; PATHAN, E. K.; DESHPANDE, M. V. Can fungi compete with marine sources for chitosan production? **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdã, v.104, part B, p. 1415-1421, nov. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.112>>. Acesso em: 01 fev. 2021.

GRISKEVICIENE, A. **Rhizopus (bread mold)**. 2021. Disponível em: <<https://www.shutterstock.com/pt/image-illustration/rhizopus-bread-mold-1059190730>>. Acesso em: 31 jan. 2021.

GUARNACCIA, V.; GROENEWALD, J. Z.; POLIZZI, G.; CROUS, P. W. High species diversity in *Colletotrichum* associated with citrus diseases in Europe. **Persoonia – Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, Leiden, v. 39, p. 32-50, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3767/persoonia.2017.39.02>>. Acesso em: 10 mar. 2019.

GUIMARÃES, L. H. S. Amido: biossíntese, estrutura e aplicação. In.: POLIZELI, M. L. T. M.; SILVA, T. M. (Org.) **Amilases microbianas**. São Paulo: EDUSP, 2016. Cap. 1, p. 11-19.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The Use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, Filadélfia, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975. Disponível em: <<https://doi.org/10.2307/3758395>>. Acesso em: 14 set. 2021.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 48, n. 2, p. 422-427, aug. 1972. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90094-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90094-2)>. Acesso em: 04 jul. 2021.

HARTUNG, P. A hora da bioeconomia. **Estadão**. São Paulo, 07 jan. 2020. Disponível em: <<https://opinioao.estadao.com.br/noticias/espaco-aberto,a-hora-da-bioeconomia,70003146696>>. Acesso em: 23 fev. 2020.

HASSAN, S. S.; WILLIAMS, G. A.; JAISWAL, A. K. Moving towards the second generation of lignocellulosic biorefineries in the EU: drivers, challenges, and opportunities. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, Belfast, v.101, p. 590-599, mar. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.11.041>>. Acesso em: 07 jun. 2020.

HATFIELD-DODDS, S.; SCHANDL, H.; NEWTH, D.; OBERSTEINER, M.; CAI, Y.; BAYNES, T.; WEST, J.; HAVLIK, P. Assessing global resource use and greenhouse emissions to 2050, with ambitious resource efficiency and climate mitigation policies. **Journal of Cleaner Production**, Brno, v. 144, p. 403-414, feb. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.12.170>>. Acesso em: 06 jun. 2020.

HEGAZY, M. F.; MOHAMED, T. A.; ELSHAMY, A. I.; MOHAMED, A. H.; MAHALEL, U. A.; REDA, E. H.; SHAHEEN, A. M.; TAWFIK, W. A. Microbial biotransformation as a tool for drug development based on natural products from mevalonic acid pathway: A review. **Journal of Advanced Research**, Cairo, v. 6, n. 1, p. 17-33, jan. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jare.2014.11.009>>. Acesso em: 25 mar. 2019.

HSU, A.; ESTY, D. C.; LEVY, M. A.; SHERBININ, A. **2016 Environmental Performance Index (EPI)**. New Haven: Yale University, 2016. 124p. Disponível em: <<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.19868.90249>>. Acesso em: 03 jun. 2020.

HU, J.; ZHANG, Y.; XU, Y.; SUN, Q.; LIU, J.; FANG, W.; XIAO, Y.; KÜES, U.; FANG, Z. *Gongronella* sp. w5 elevates *Coprinopsis cinerea* laccase production by carbon source syntrophism and secondary metabolite induction. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 103, n. 1, p. 411-425, jan. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9469-4>>. Acesso em: 19 jun. 2020.

HÜNTTL, R. F.; BÜCHTING, A. J.; MÜLLER-RÖBER, B.; VON BRAUN, J.; BACHEM, A.; BORN, H.; DANIEL, H.; FELCHT, U.-H.; HIRTH, T.; ISERMAYER, F.; MARCINOWSKI, S.; METTENLEITER, T. C.; PÜHLER, A.; SCHWERIN, M.; TREFFENFELDT, W.; VAHRENHOLT, F.; ZINKE, H.; PATERMANN, C.; ZEHNDER, A. **Bio-economy Council Report 2010: bio-economy innovation**. Berlim: BÖR, 2011. 60p. Disponível em: <https://biooekonomierat.de/fileadmin/Publikationen/Englisch/bioeconomy_council_report_2010.pdf>. Acesso em: 07 jun. 2020.

IDRIS, A. S. O.; PANDEY, A.; RAO, S. S.; SUKUMARAN, R. K. Cellulase production through solid-state tray fermentation, and its use for bioethanol from sorghum stover. **Bioresource Technology**, New York, v. 242, p. 265-271, oct. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.092>>. Acesso em: 20 dez. 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. 2017. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA – IPEA. **Brasil 2035**: cenários para o desenvolvimento. Brasília: IPEA/ASSECOR, 2017. 320p. Disponível em: <https://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/livros/livros/170606_brasil_2035_cenarios_para_desenvolvimento.PDF>. Acesso em: 06 jun. 2020.

JACINTO, H. R.; MOURA, J. B.; UTO, F. N. Avaliação da influência antrópica sobre a microbiota edáfica de cerrado no município de Anápolis, Goiás. **Ipê Agronomic Journal**, Goianésia, v. 2, n. 2, p. 4-17, 2018. Disponível em: <<http://anais.unievangelica.edu.br/index.php/ipeagronomicjournal/article/view/2617>>. Acesso em: 31 jul. 2021.

JOBIM, K.; OLIVEIRA, B. I. S.; GOTO, B. T. Checklist of the Glomeromycota in the brazilian savana. **Mycotaxon**, Portland, v. 131, n. 1, p. 255-256(2), jan./mar. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.5248/131.255>>. Acesso em: 04 abr. 2019.

JOHNSON, E. Integrated enzymes production lowers the cost of cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, Hoboken, v. 10, n. 2, p. 164-174, mar./apr. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/bbb.1634>>. Acesso em: 09 maio 2020.

JOLY, C. A.; SCARANO, F. R.; BUSTAMANTE, M.; GADDA, M. C.; METZGER, J. P. W.; SEIXAS, C. S.; OMETTO, J. P. H. B.; PIRES, A. P. F.; BOESING, A. L.; SOUSA, F. D. R.; QUINTÃO, J. M. B.; GONÇALVES, L. R.; PADGURSCHI, M. C. G.; AQUINO, M. F. S.; CASTRO, P. F. D.; SANTOS, I. L. Diagnóstico brasileiro sobre biodiversidade e serviços ecossistêmicos: sumário para tomadores de decisão. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 19, n. 4, e20190865, out. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2019-0865>>. Acesso em: 23 fev. 2020.

JONKER, J. G. G.; JUNGINGER, H. M.; VERSTEGEN, J. A.; LIN, T.; RODRÍGUZ, L. F.; TING, L. F.; FAAIJ, A. P. C.; VAN DER HILST, F. Supply chain optimization of sugarcane first generation and eucalyptus second generation ethanol production in Brazil. **Applied Energy**, New York, v. 173, p. 494-510, jul. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.04.069>>. Acesso em: 21 mar. 2019.

JUMA, C.; KONDE, V. **The new bioeconomy**: industrial and environmental biotechnology in developing countries. Genebra: United Nations Conference on Trade and Development, 15-16 nov. 2001. 31p. Disponível em: <<https://www.innovations.harvard.edu/sites/default/files/newbioeconomy.pdf>>. Acesso em: 06 jun. 2020.

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de alimentos: teoria e aplicações práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 242p.

KOLLEROV, V. V.; FOKINA, V. V.; SUKHODOLSKAYA, G. V.; SHUTOV, A. A.; DONOVA, M. V. 11 β -Hydroxylation of 6 α -fluoro-16 α -methyl-deoxycorticosterone 21-acetate by filamentous fungi. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscow, v. 51, n. 2, p. 169-179, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1134/S0003683815020106>>. Acesso em: 17 abr. 2021.

KOLLEROV, V. V.; SHUTOV, A. A.; KAZANTSEV, A. V.; DONOVA, M. V. Biocatalytic modifications of pregnenolone by selected filamentous fungi. **Biocatalysis and Biotransformation**, Madrid, v. 37, n. 5, p. 319-330, jan. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10242422.2018.1549237>>. Acesso em: 17 abr. 2021.

KUMAR, Y.; YADAV, D. N.; AHMAD, T.; NARSAIAH, K. Recent trends in use of natural antioxidants for meat and meat products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 14, n. 6, p. 796-812, nov. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12156>>. Acesso em: 15 abr. 2019.

LAMPKOWSKI, J. C. R.; LAMPKOWSKI, M. Considerações sobre a bioeconomia e sua relação com os produtos bio-based. **Caderno Meio Ambiente e Sustentabilidade**, Curitiba, v. 9, n. 5, p. 54-62, 2016. Disponível em: <<https://www.cadernosuninter.com/index.php/meioAmbiente/article/view/384>>. Acesso em: 20 fev. 2020.

LAOKULDILOK, T.; POTIVAS, T.; KANHA, N.; SURAWANG, S.; SEESURIYACHAN, P.; WUANGTUEAI, S.; PHIMOLSIRIPOL, Y.; REGENSTEIN, J. M. Physicochemical, antioxidant, and antimicrobial properties of chitooligosaccharides produced using three different enzyme treatments. **Food Bioscience**, Wuxi, v. 18, n. p. 28-33, jun. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.03.004>>. Acesso em: 18 abr. 2021.

LI G. J.; HYDE, K. D.; ZHAO, R. L.; HONGSANAN, S.; ABDEL-AZIZ, F. A.; ABDEL-WAHAB, M. A.; ALVARADO, P.; ALVES-SILVA, G.; AMMIRATI, J. F.; ARIYAWANSA, H. A.; BAGHELA, A.; BAHKALI, A. H.; BEUG, M.; BHAT, D. J.; BOJANTCHEV, D.; BOONPRATUANG, T.; BULGAKOV, T. S.; CAMPORESI, E.; BORO, M. C.; CESKA, O.; CHAKRABORTY, D.; CHEN, J. J.; CHETHANA, K. W. T.; CHOMNUNTI, P.; CONSIGLIO, G.; CUI, B. K.; DAI, D. Q.; DAI, Y. C.; DARANAGAMA, D. A.; DAS, K.; DAYARATHNE, M. C.; DE CROP, E.; OLIVEIRA, R. J. V.; SOUZA, C. A. F.; SOUZA, J. I.; DENTINGER, B. T. M.; DISSANAYAKE, A. J.; DOILOM, M.; DRECHSLER-SANTOS, E. R.; GHOBAD-NEJHAD, M.; GILMORE, S. P.; GÓES-NETO, A.; GORCZAK, M.; HAITJEMA, C. H.; HAPUARACHCHI, K. K.; HASHIMOTO, A.; HE, M. Q.; HENSKE, J. K.; HIRAYAMA, K.; IRIBARREN, M. J.; JAYASIRI, S. C.; JAYAWARDENA, R. S.; JEON, S. J.; JERÔNIMO, G. H.; JESUS, A. L.; JONES, E. B. G.; KANG, J. C.; KARUNARATHNA, S. C.; KIRK, P. M.; KONTA, S.; KUHNERT, E.; LANGER, E.; LEE, H. S.; LEE, H. B.; LI, W. J.; LI, X. H.; LIIMATAINEN, K.; LIMA, D. X.; LIN, C. G.; LIU, J. K.; LIU, X. Z.; LIU, Z. Y.; LUANGSA-ARD, J. J.; LÜCKING, R.; LUMBSCH, H. T.; LUMYONG, S.; LEAÑO, E. M.; MARANO, A. V.; MATSUMURA, M.; MCKENZIE, E. H. C.; MONGKOLSAMRIT, S.; MORTIMER, P. E.; NGUYEN, T. T. T.; NISKANEN, T.; NORPHANPHOUN, C.; O'MALLEY, M. A.; PARNMEN, S.; PAWŁOWSKA, J.; PERERA, R. H.; PHOOKAMSAK, R.; PHUKHAMSADDA, C.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A.; RASPÉ, O.; RECK, M. A.; ROCHA, S. C. O.; SANTIAGO, A. L. C. M. A.; SENANAYAKE, I. C.; SETTI, L.; SHANG, Q. J.; SINGH, S. K.; SIR, E. B.; SOLOMON, K. V.; SONG J.; SRIKITIKULCHAI, P.; STADLER, M.; SUETRONG, S.; TAKAHASHI, H.; TAKAHASHI, T.; TANAKA, K.; TANG, L. P.; THAMBUGALA, K. M.; THANAKITPIPATTANA, D.; THEODOROU, M. K.; THONGBAI, B.; THUMMARUKCHAROEN, T.; TIAN, Q.; TIBPROMMA, S.; VERBEKEN, A.; VIZZINI, A.; VLASÁK, J.; VOIGT, K.; WANASINGHE, D. N.; WANG, Y.; WEERAKOON, G.; WEN, H. A.; WEN, T. C.; WIJAYAWARDENE, N. N.; WONGKANOUN, S.; WRZOSEK, M.; XIAO, Y. P.; XU, J. C.; YAN, J. Y.; YANG, J.; YANG, S. D.; HU Y.; ZHANG, J. F.; ZHAO, J.; ZHOU, L. W.; PERŠOH, D.; PHILLIPS, A. J. L.; MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N. Fungal diversity notes 253–366: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa. **Fungal Diversity - An International Journal of Mycology**, Pequim, v. 78, n. 1, p. 1-237, may 2016a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13225-016-0366-9>>. Acesso em: 31 jan. 2021.

LI, K.; XING, R.; LIU, S.; LI, P. Advances in preparation, analysis and biological activities of single chitooligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, Aveiro, v. 139, p. 178-190, mar. 2016b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.12.016>>. Acesso em: 17 abr. 2021.

LI, Y.; ZHANG, G.; DU, C.; MOU, H.; CUI, J.; GUAN, H.; HWANG, H.; WANG, P. Characterization of high yield exopolysaccharide produced by *Phyllobacterium* sp. 921F exhibiting moisture preserving properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amesterdã, v. 101, p. 562-568, ago. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.089>>. Acesso em: 06 maio 2020.

LIMA, C. J. B. **Produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* empregando óleo de soja residual**. 2007. 168f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)–Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

LIMA JÚNIOR, D. S. **Amilases do fungo endofítico *Paecilomyces* sp SF 021: Estudos de produção, caracterização e aplicação na hidrólise do amido**. 2020. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2020. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/193164?locale-attribute=en>>. Acesso em: 09 jul. 2021.

LIMA, K. B.; RITTER NETTO, A. F. R.; MARTINS, M. A.; FREITAS, M. S. M. Crescimento, acúmulo de nutrientes e fenóis totais de mudas de cedro australiano (*Toona ciliata*) inoculadas com fungos micorrízicos. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 25, n. 4, p. 853-862, out./dez. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5902/1980509820583>>. Acesso em: 14 mar. 2019.

LIMA, R. C. F. **Produção da enzima α -amilase por *Aspergillus niger* em fermentação no estado sólido utilizando bagaço de malte de cevada**. 2019. 98f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, 2019. Disponível em: <http://200.137.65.30/bitstream/10/11029/1/tese_12802_Disserta%c3%a7%c3%a3o%20CD-%20Renan%20FINAL%2010-04-201920190412-142008.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2020.

LIU, J.; WILLFÖR, S.; XU, C. A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, Amsterdã, v. 5, n. 1, p. 31–61, jan. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.12.001>>. Acesso em: 06 abr. 2020.

LIZARDI-JIMENÉZ, M. A.; RICARDO-DÍAZ, J.; QUIÑONES-MUÑOZ, T. A.; HERNÁNDEZ-ROSAS, F.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R. Fungal strain selection for protease production by solid-state fermentation using agro-industrial waste as substrates. **Chemical Papers**, Bratislava, v. 73, p. 2603-2610, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11696-019-00814-w>>. Acesso em: 11 mar. 2018.

LOPES, A. M.; VITORINO, L. C.; CASTRO, C. F. S.; NASCIMENTO, J. P. L.; SOUCHIE, E. L. Primeiro relato da ocorrência de *Paecilomyces formosus* e *Paecilomyces parvisporus* no Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 14, n. 4, p. 215-224, out./dez. 2016.

MACEDO, L. L.; VIMERCATI, W. C.; ARAÚJO, C. S. Fruto-oligossacarídeos: aspectos nutricionais, tecnológicos e sensoriais. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 23, e2019080, mar. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1981-6723.08019>>. Acesso em: 06 maio 2020.

MACHADO, W. R. C. **Bioprospecção de leveduras para a produção de carotenoides microbianos**. 2018. 123f. Tese(Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos)–Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, 2018. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/153980>>. Acesso em: 05 maio 2018.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14 ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 1032p.

MAHMOOD, S.; SHAHID, M. G.; IRFAN, M.; NADEEM, M.; SYED, Q. Partial characterization of α -amylase produced from *Aspergillus niger* using potato peel as substrate. **Punjab University Journal of Zoology**, Lahore, v. 33, n. 1, p. 22-27, jun. 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.17582/pujz/2018.33.1.22.27>>. Acesso em: 28 jun. 2021.

MAIA, L. C.; CARVALHO JÚNIOR, A. A.; CAVALCANTI, L. H.; GUGLIOTTA, A. M.; DRECHSLER-SANTOS, E. R.; SANTIAGO, A. L. M. A.; CÁCERES, M. E. S.; GIBERTONI, T. B.; APTROOT, A.; GIACHINI, A. J.; SOARES, A. M. S.; SILVA, A. C. G.; MAGNAGO, A. C.; GOTO, B. T.; LIRA, C. R. S.; MONTOYA, C. A. S.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A.; SILVA, D. K. A.; SOARES, D. J.; REZENDE, D. H. C.; LUZ, E. D. M. N.; GUMBOSKI, E. L.; WARTCHOW, F.; KARSTEDT, F.; FREIRE, F. M.; COUTINHO, F. P.; MELO, G. S. N.; SOTÃO, H. M. P.; BASEIA, I. G.; PEREIRA, J.; OLIVEIRA, J. J. S.; SOUZA, J. F.; BEZERRA, J. L.; ARAUJO NETA, L. S.; PFENNING, L. H.; GUSMÃO, L. F. P.; NEVES, M. A.; CAPELARI, M.; JAEGER, M. C. W.; PULGARÍN, M. P.; MENOLLI JUNIOR, N.; MEDEIROS, P. S.; FRIEDRICH, C. S.; CHIKOWSKI, R. S.; PIRES, R. M.; MELO, R. F.; SILVEIRA, R. M. B.; URREA-VALENCIA, S.; CORTEZ, V. G.; SILVA, V. F. Diversity of brazilian fungi. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 4, p. 1033-1045, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201566407>>. Acesso em: 03 abr. 2019.

MALAYIL, S.; CHANAKYA, H. N. Fungal enzyme cocktail treatment of biomass for higher biogas production from leaf litter. **Procedia Environmental Sciences**, Netherlands, v. 35, p. 826-832, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.proenv.2016.07.099>>. Acesso em: 04 jul. 2021.

MAMEDE, S.; BENITES, M.; SABINO, J.; ALHO, J. R. Ecoturismo na região turística Caminho do Ipês: conexões entre identidade biofílica e usufruto dos serviços ecossistêmicos. **Revista Brasileira de Ecoturismo**, São Paulo, v. 10, n. 4, p. 938-957, nov. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.34024/rbecotur.2017.v10.6662>>. Acesso em: 31 jul. 2021.

MARRA, I. F.; SILVA, T. B.; SCHEUFELE, F. B.; GEBERT, D. G. C.; LANGARO, C.; FIORESE, M. L.; HASAN, S. D. M. Efeito do pH, umidade e indutores sobre a produção de celulases por *Trichoderma* sp. em fermentação em estado sólido de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 17, n. 2, p. 125-131, 2015. Disponível em: <<http://www.deag.ufcg.edu.br/rbpa/rev172.html>>. Acesso em: 20 jun. 2021.

MARTÍNEZ-RUANO, J. A.; RESTREPO-SERNA, D. L.; CARMONA-GARCIA, E.; GIRALDO, J. A. P.; AROCA, G.; CARDONA, C. A. Effect of co-digestion of milk-whey and potato stem on heat and power generation using biogas as an energy vector: techno-economic assessment. **Applied Energy**, New York, v. 241, p. 504-518, may 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2019.03.005>>. Acesso em: 21 mar. 2019.

MARTINHO, V.; LIMA, L. M. S.; BARROS, C. A.; FERRARI, V. B.; PASSARINI, M. R. Z.; SANTOS, L. A.; SEBASTIANES, F. L. S.; LACAVA, P. T.; VASCONCELLOS, S. P. Enzymatic potential and biosurfactant production by endophytic fungi from mangrove forest in Southeastern Brazil. **AMB Express**, Münster, v. 9, p. 130-138, aug. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13568-019-0850-1>>. Acesso em: 23 fev. 2020.

MARTINS, M. R.; DANTAS, V.; SOARES, C.; SANTOS, C. R.; LIMA, N. Identificação polifásica de *Gongronella* sp. e *Rhizopus* sp. degradadores do fungicida sistêmica metalaxil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 8., 2016, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SBMy, 2016. p. 489. Disponível em: <https://micolab.paginas.ufsc.br/files/2017/05/anais_2016_cbmy.pdf>. Acesso em: 31 jan. 2021.

MARTINS, M. R.; SANTOS, C.; PEREIRA, P.; CRUZ-MORAIS, J.; LIMA, N. Metalaxyl degradation by mucorales strains *Gongronella* sp. and *Rhizopus oryzae*. **Molecules**, Basel, v. 22, n. 12, e2225, p. 1-12, dec. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules22122225>>. Acesso em: 19 jun. 2020.

MCCARTHY, B.; LIU, H. B. Food waste and the 'green' consumer. **Australasian Marketing Journal**, Sydney, v. 25, n. 2, p. 126-132, may 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ausmj.2017.04.007>>. Acesso em 10 mar. 2018.

MEDEIROS, M. S. **Produção de pectinases em fermentação semissólida usando substrato residual de laranja**. 2016. 58 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola)-Centro de Tecnologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2016. Disponível em: <<http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/handle/riufcg/611>>. Acesso em: 13 jul. 2021.

MELO, M.; ARAUJO, A. C. V.; CHOGI, M. A. N.; DUARTE, I. C. S. Cellulolytic and lipolytic fungi isolated from soil and leaf litter samples from the Cerrado (Brazilian Savanna). **Revista de Biología – International Journal of Tropical Biology and Conservation**, San José, v. 66, n. 1, p. 237-245, mar. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.15517/rbt.v66i1.27768>>. Acesso em: 16 jun. 2020.

MELO, N. E. T. **Desenvolvimento e aplicações de pectinases como “ferramentas biotecnológicas”**. 2021. 32 f. Monografia (Graduação em Biotecnologia)-Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2021. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/32098>>. Acesso em: 16 ago 2021.

MELO, V. F.; SILVA, D. T.; EVALD, A.; ROCHA, P. R. R. Qualidade química e biológica do solo em diferentes sistemas de uso em ambiente de savana. **Agro@mbiente On-line – Revista Brasileira de Agroambiente**, Boa Vista, v. 11, n. 2, p. 101-110, abr./jun. 2017. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v11i2.3850>>. Acesso em: 16 jun. 2020.

MICHELIN, M.; SILVA, T. M.; BENASSI, V. M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; MORAES, L. A. B.; LEÃO, J. M.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification and characterization of a thermostable α -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotti*. **Carbohydrate Research**, Bristol, v. 345, n. 16, p. 2348-2353, nov. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.08.013>>. Acesso em: 27 jun. 2021.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, mar. 1959. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ac60147a030>>. Acesso em: 01 mar. 2020.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES – MCTIC. **17ª Semana Nacional de Ciência e Tecnologia**. Bioeconomia: diversidade e riqueza para o desenvolvimento sustentável. 2019. Disponível em: <<https://snct.mctic.gov.br/bioeconomia-diversidade-e-riqueza-para-o-desenvolvimento-sustentavel/>>. Acesso em: 07 jun. 2020.

MOHAMMED, H. S.; AL-ZUBAIDY, M. M. I.; AL-ASWAD, M. B. Inhibitory effect of tannic acid extracted from grape seeds and pomegranate peels on some microorganisms. **Mesopotamia Journal of Agriculture**, Salah Ad-Din, v. 36, n. 1, p. 12-18, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.33899/magrj.2008.26578>>. Acesso em: 03 jul. 2021.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the fungi**. 4 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996. 574p.

MORAES, S. L.; MASSOLA, C. P.; SACCOCCIO, E. M.; SILVA, D. P.; GUIMARÃES, Y. B. T. Cenário brasileiro de geração e uso da biomassa adensada. **Revista IPT: Tecnologia e Inovação**, São Paulo, v. 1, n. 4, abr. 2017. Disponível em: <<http://revista.ipt.br/index.php/revistaIPT/article/view/37>>. Acesso em: 04 jun. 2020.

MORALES, E. D. J. C.; CASANOVA, E. E. S. **Efecto del soporte de inmovilización en los parámetros cinéticos de la reducción de acetofenona empleando *Gongronella butleri* como biocatalizador**. 2015. 116f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Facultad del Ingeniería Química, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, 2015. Disponível em: <<http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/8994>>. Acesso em: 31 jan. 2021.

MOREIRA, A. C. **Utilização dos resíduos agroindustriais baseado nos princípios da produção mais limpa**. 2019. 19f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Produção)-Centro de Ciências Exatas, Tecnológicas e Agrárias, UNICESUMAR – Centro Universitário de Maringá, Maringá, 2019. Disponível em: <<http://rdu.unicesumar.edu.br/bitstream/handle/123456789/4845/ARLAN%20CL%c3%81UDIO%20MOREIRA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 10 jan. 2020.

MOREIRA, A. M. Bioeconomia: plataforma mundial de inovação e sustentabilidade nas cadeias agroindustriais. **Revista Processos Químicos**, Goiânia, v. 10, n. 20, p. 351-353, jul./dez. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.19142/rpq.v10i20.384>>. Acesso em: 22 fev. 2020.

MORRISON, B.; GOLDEN, J. S. An empirical analysis of the industrial bioeconomy: implications for renewable resources and the environment. **BioResources**, Raleigh, v. 10, n. 3, p. 4411-4440, aug. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.15376/biores.10.3.4411-4440>>. Acesso em: 06 jun. 2020.

MUKESH KUMAR, D. J.; ANDAL PRIYADHARSHINI, D.; SURESH, K.; SARANYA, G. M.; RAJENDRAN, K.; KALAICHELVAN, P. T. Production, purification and characterization of α -amylase and alkaline protease by *Bacillus* sp. HPE 10 in a concomitant production medium. **Asian Journal of Plant Science & Research**, Kafr el-Sheikh, v. 2, n. 3, p. 376-382, 2012. Disponível em: <<https://www.imedpub.com/asian-journal-of-plant-science-research/archive/ajpsky-volume-2-issue-3-year-2012.html>>. Acesso em: 04 nov. 2017.

MUNESUE, Y.; MASUI, T.; FUSHIMA, T. The effects of reducing food losses and food waste on global food insecurity, natural resources, and greenhouse gas emissions. **Environmental Economics and Policy Studies**, Tóquio, v. 17, n. 1, p. 43-77, jan./oct. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10018-014-0083-0>>. Acesso em: 11 mar. 2020.

NASCIMENTO, J. C. S.; SOARES, V. M.; PEREIRA, L. B. S. B.; BIONI FILHO, L.; ALBUQUERQUE, P. V.; ANDRADE, G. P.; COSTA, H. N.; ALCANTARA, S. F.; PORTO, A. L. F.; PORTO, T. S. Produção de fitase por *Aspergillus niger* var. phoenicis URM 4924 utilizando planejamentos fatoriais. **Pubvet**, Maringá, v. 13, n. 3, a291, p. 1-10, mar. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.31533/pubvet.v.13n3a291.1-10>>. Acesso em: 26 jul. 2021.

NASCIMENTO, J. M. L.; MENEZES, K. M. S.; QUEIROZ, M. A. A.; MELO, A. M. Y. Crescimento inicial e composição bromatológica de plantas de pornuncia adubadas com fósforo e inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 17, n. 4, p.561-571, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s1519-99402016000400001>>. Acesso em: 25 jul. 2018.

NASCIMENTO FILHO, W. B.; FRANCO, C. R. Avaliação do potencial dos resíduos produzidos através do processamento agroindustrial no Brasil. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 7, n. 6, p. 1968-1987, jul. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20150116>>. Acesso em: 04 jun. 2020.

NEVES, F. O.; SALGADO, E. G.; SANTOS, B. R. Ação da sustentabilidade sobre a produção agroindustrial brasileira. In: ENCONTRO DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO AGROINDUSTRIAL, 11., 2017, Campo Mourão. **Anais...** Campo Mourão: UNESPAR, set. 2017. Disponível em: <http://anais.unespar.edu.br/xi_eepa/data/uploads/artigos/9/9-02.pdf>. Acesso em: 03 jun. 2020.

NGUYEN, Q.; BOWYER, J.; HOWE, J.; BRATKOVICH, S.; GROOT, H.; PEPKE, E.; FERNHOLZ, K. **Global production of second generation biofuels: trends and influences**. Minneapolis: Dovetail Partners, Inc., 2017. 16p. Disponível em: <<https://dovetailinc.org/upload/tmp/1579558792.pdf>>. Acesso em: 07 jun. 2020.

NORILER, S. A.; SAVI, D. C.; ALUIZIO, R.; PALÁCIO-CORTES, A. M.; POSSIEDE, Y. M.; GLIENKE, C. Bioprospecting and structure of fungal endophyte communities found in the Brazilian biomes, Pantanal, and Cerrado. **Frontiers in Microbiology**, Bethesda, v. 9, e1526, jul. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01526>>. Acesso em: 09 mar. 2019.

NOVAK, E.; CARVALHO, L. A.; SANTIAGO, E. F.; BRUMATTI, A. V.; SANTOS, L. L.; SALES, L. C. Variação temporal dos atributos microbiológicos do solo sob diferentes usos. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 41, n. 3, p. 603-611, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.19084/RCA_vol41_n3>. Acesso em: 09 mar. 2019.

NWACHUKWU, I.; EKWENYE, U. N.; AGOMUO, N. G.; OGBONNA, C. Bioconversion of Agricultural and Food Processing Wastes to Value-Added Products Using Solid State Fermentation Technology. A Review. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, Ghaziabad, v. 11, n. 5, ver. 3, p. 68-71, sep./oct. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.9790/3008-1105036871>>. Acesso em: 04 jun. 2020.

OLIVEIRA, A. P. A.; SILVESTRE, M. A.; ALVES-PRADO, H. F.; RODRIGUES, A.; PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Bioprospecting of yeasts for amylase production in solid state fermentation and evaluation of the catalytic properties of enzymatic extracts. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 14, n. 14, p. 1215-1223, apr. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.5897/AJB2014.14062>>. Acesso em: 01 dez. 2017.

OLIVEIRA, A. P. A.; SILVESTRE, M. A.; GARCIA, N. F. L.; ALVES-PRADO, H. F.; RODRIGUES, A.; PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Production and catalytic properties of amylases from *Lichteimia ramosa* and *Thermoascus aurantiacus* by solid-state fermentation. **The Scientific World Journal**, London, v. 2016, n. 7323875, p. 1-10, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2016/7323875>>. Acesso em: 24 jun. 2021.

OLIVEIRA JÚNIOR, S. D. **Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju como substrato**. 2014. 103 f. Dissertação (Mestrado Engenharia Química)-Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande de Norte, Natal, Rio Grande de Norte, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/15852/1/SergioDOJ_DISSERT.pdf>. Acesso em: 27 jun. 2021.

ONGARATTO, R. S.; VIOTTO, L. A. Enzyme optimization to reduce the viscosity of pitanga (*Eugenia uniflora* L.) juice. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 19, e2015041, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1981-6723.4115>>. Acesso em: 13 jul. 2021.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. **The Bioeconomy to 2030: designing a policy agenda**. 2009. Disponível em: <<https://www.oecd.org/futures/long-termtechnologicalsocietalchallenges/42837897.pdf>>. Acesso em: 06 jun. 2020.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS – ONU. **United Nations Summit to adopt the post-2015 development agenda**. New York, 25-27 sep. 2015. Disponível em: <<https://sustainabledevelopment.un.org/post2015/summit>>. Acesso em: 22 fev. 2020.

ORTIZ, G. E.; PONCE-MORA, M. C.; NOSEDA, D. G.; CAZABAT, G.; SARAVALLI, C.; LÓPEZ, M. C.; GIL, G. P.; BLASCO, M.; ALBERTÓ, E. O. Pectinase production by *Aspergillus giganteus* in solid-state fermentation: optimization, scale-up, biochemical characterization and its application in olive-oil extraction. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Berlim, v. 44, n. 2, p. 197-211, feb. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10295-016-1873-0>>. Acesso em: 17 dez. 2017.

PANDA, S. K.; MISHRA, S. S.; KAYITESI, E.; RAY, R. C. Microbial-processing of fruit and vegetable wastes for production of vital enzymes and organic acids: biotechnology and scopes. **Environmental Research**, Reus, v. 146, p. 161-172, apr. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.12.035>>. Acesso em: 23 fev. 2020.

PARISI, C.; RONZON, T. **A global view of bio-based industries**: benchmarking and monitoring their economic importance and future developments. Seville: European Commission, 18-19 feb. 2016. 84 p. Disponível em: <<https://doi.org/10.2788/153649>>. Acesso em: 07 jun. 2020.

PARON, L. M.; TURETTA, A. P. D.; FIDALGO, E. C. C.; BRAGA, A. R. S.; PRADO, R. B.; LIMA, I. B. T.; CAMPANHA, M. M.; FRITZSON, E.; PEDREIRA, B. C. C. G.; SOSINSKI JUNIOR, E. E.; SANTOS, S. A.; ANDRADE, A. G.; VOLK, L. B. S.; MARTINS, C. R.; DRUCKER, D. P.; FERRAZ, R. P. D. Serviços ecossistêmicos: pesquisa, desenvolvimento e inovação. In: FERRAZ, R. P. D.; PRADO, R. B.; PARRON, L. M.; CAMPANHA, M. M. (Ed.). **Marco referencial em serviços ecossistêmicos**. Brasília: Embrapa, 2019, p. 109-121. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1115242>>. Acesso em: 23 fev. 2020.

PASIN, T. M.; BENASSI, V. M.; MOREIRA, E. A.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. Prospecting filamentous fungi for amylase production: standardization of *Aspergillus japonicus* culture conditions. **British Biotechnology Journal**, London, v. 4, n. 4, p. 482-498, apr. 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/263090241_Prospecting_Filamentous_Fungi_for_Amylase_Production_Standardization_of_Aspgillus_japonicus_Culture_Conditions>. Acesso em: 15 ago. 2021.

PASIN, T. M.; MOREIRA, E. A.; LUCAS, R. C.; BENASSI, V. M.; ZIOTTI, L. S.; CEREIA, M.; POLIZELI, M. L. T. M. Novel amylase-producing fungus hydrolyzing wheat and brewing residues, *Aspergillus carbonarius*, discovered in tropical forest remnant. **Folia Microbiologica**, Prague, v. 65, n. 1, p. 173-184, feb. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12223-019-00720-4>>. Acesso em: 15 ago. 2021.

PASSONE, J. M.; FERNANDES, N. M. S.; CARDOSO, V. L.; VIEIRA, P. A. Avaliação da produção de biossurfactante empregando fungos e glicerol como substrato. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 11., 2015, Campinas. **Anais...** São Paulo: Blucher Chemical Engineering Proceedings, v. 1, n. 3, jun. 2015. Disponível em: <<https://www.proceedings.blucher.com.br/article-list/cobeqic2015-251/list#articles>>. Acesso em: 12 mar. 2019.

PEIXOTO, M.; PINTO, H. S. Desperdício de alimentos: questões socioambientais, econômicas e regulatórias. **Boletim do Legislativo**, Brasília, n. 41, fev. 2016. 14 p. Disponível em: <<http://www2.senado.leg.br/bdsf/handle/id/517763>>. Acesso em: 11 mar. 2018.

PENHA, E. M.; VIANA, L. A. N.; GOTTSCHALKI, L. M. F.; TERZI, S. C.; SOUZA, E. F.; FREITAS, S. C.; SANTOS, J. O.; CHAN-SALUM, T. F. Aproveitamento de resíduos da agroindústria do óleo de dendê para a produção de lipase por *Aspergillus niger*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 4, p. 755-761, abr. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20131673>>. Acesso em: 04 jun. 2020.

PEREIRA, C. R.; RESENDE, J. T. V.; GUERRA, E. P.; LIMA, V. A.; MARTINS, M. D.; KNOB, A. Enzymatic conversion of sweet potato granular starch into fermentable sugars: feasibility of sweet potato peel as alternative substrate for α -amylase production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Amsterdã, v. 11, p. 231-238, jul. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.07.011>>. Acesso em: 01 dez. 2017.

PETERSON, D.; MURRAY, H.; EPPSTEIN, S.; REINEKE, L.; WEINTRAUB, A.; MEISTER, P.; LEIGH, H. Microbiological transformations of steroids. 1. Introduction of oxygen at carbon-11 of progesterone. **Journal of the american chemical society**, Washington, v. 74, n. 23, p. 5933-5936, 1952. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ja01143a033>>. Acesso em: 16 jun. 2020.

PEYRONEL, B.; DAL VESCO, G. Ricerche sulla microflora di um terreno agrário presso Torino. **Allionia**, Turim, v. 2, p. 357-417, 1955.

PITOL, L. O.; BIZ, A.; MALLMANN, E.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A. Production of pectinases by solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor. **Chemical Engineering Journal**, Amsterdã, v. 283, p. 1009-1018, jan. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.08.046>>. Acesso em: 01 mar. 2020.

PIZA, A. C. M. T.; HOKKA, C. O.; SOUSA, C. P. Endophytic actinomycetes from *Miconia albicans* (Sw.) Triana (*Melastomataceae*) and evaluation of its antimicrobial activity. **Journal of Scientific Research and Reports**, London, v. 4, n. 4, p. 281-291, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.9734/JSRR/2015/13237>>. Acesso em: 18 jul. 2018.

POLIZELI, M. L. T. M.; SILVA, T. M. **Amilases microbianas**. São Paulo: EDUSP, 2016. 268p.

PONGSAWASDI, P.; YAGISAWA, M. Screening and identification of a cyclomaltoextrin glucanotransferase-producing bacteria. **Journal of Fermentation Technology**, Osaka, v. 65, n. 4, p. 463-467, 1987. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0385-6380\(87\)90144-0](https://doi.org/10.1016/0385-6380(87)90144-0)>. Acesso em: 20 mar. 2018.

RAO, M. P. N.; XIAO, M.; LI, J-W. Fungal and bacterial pigments: secondary metabolites with wide applications. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, 1113, jun. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01113>>. Acesso em 15 abr. 2019.

RAJKUMARI, J.; BUSI, S. **Advances in biomedical application of chitosan and its functionalized nano-derivatives**. In: PRASAD, R.; KUMAR, V.; KUMAR, M.; WANG, S. Fungal nanobionics: principles and applications. Singapore: Springer, jul. 2018. p. 145-163. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-981-10-8666-3_6>. Acesso em: 17 abr. 2021.

RAVINDRAN, R.; HASSAN, S. S.; WILLIAMS, G. A.; JAISWAL, A. K. A review on bioconversion of agro-industrial wastes to industrially important enzymes. **Bioengineering**, Basel, v. 5, n. 4, p. 93, oct. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/bioengineering5040093>>. Acesso em: 11 nov. 2018.

RAYMOND, P.; MSHANDETE, A. M.; KIVAIISI, A. K. Enzyme profiles of *Pleurotus* HK-37 during mycelia vegetative growth and fruiting on solid sisal waste fractions 81 supplemented with cow manure. **Advances in Biochemistry**, New York, v. 3, n. 5, p. 57-65, oct. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.11648/j.ab.20150305.12>>. Acesso em: 04 jul. 2021.

RAZAK, M. A.; PINJARI, A. B.; BEGUM, P. S.; VISWANATH, B. Biotechnological production of fungal biopolymers chitin and chitosan: their potential biomedical and industrial applications. **Current Biotechnology**, Sharjah, v. 7, n. 3, p. 214-230, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.2174/2211550105666160527112507>>. Acesso em 17 abr. 2021.

RIBALDI, M. S. Sopra un interessante Zigomicete terri-cola: *Gongronella urceolifera* n. gen. et n. sp. **Rivista di Biologia**, Perúgia, v. 44, p. 157-166, 1952.

RIBEIRO, H.; JAIME, P. C.; VENTURA, D. Alimentação e sustentabilidade. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 31, n. 89, p. 185-198, jan./abr. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s0103-40142017.31890016>>. Acesso em: 11 mar. 2018.

RIBEIRO, J. F. **Mapa demonstrativo dos tipos de vegetação do bioma Cerrado**. In: RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Tipos de vegetação do bioma Cerrado. Brasília: EMBRAPA/MAPA, 2007. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia16/AG01/arvore/AG01_23_911200585232.html>. Acesso em: 20 mar. 2019.

RIBEIRO, M. I. B.; FERNANDES, A. J.; CABO, P. S. A.; MATOS, A. M. V. Qualidade nutricional e tecnológica dos alimentos na ótica dos consumidores da cidade de Bragança, Portugal. **Revista Mundi Meio Ambiente e Agrárias**, Curitiba, v. 2, n. 2, 16, jul./dez. 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.21575/25254790rmmaa2017vol2n2293>>. Acesso em 15 abr. 2019.

RIVAS, A. F.; NIVEIRO, N. Checklist of the agaricoid fungi from Paraguay.

Mycotaxon, Portland, v. 133, n. 4, p. 729-729(1), oct./dec. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.5248/133.729>>. Acesso em: 04 abr. 2019.

ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido**. 2010. 161f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010. Disponível em:

<<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/15133/1/crhris.pdf>>. Acesso em: 31 jul. 2021.

ROCHA, R. K. **Solubilização in vitro de fosfato por *Torulaspora globosa***. 2017. 59f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados)–Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2017.

Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/9149?show=full>>. Acesso em: 31 jul. 2021.

RODRIGUES, E. M. G. Utilização de subproduto da indústria cervejeira como substrato para a produção de amilase por fermentação em estado sólido.

Bioenergia em Revista: Diálogos, Piracicaba, v. 11, n. 1, p. 46-57, jan./jun. 2021. Disponível em:

<<http://www.fatecpiracicaba.edu.br/revista/index.php/bioenergiaemrevista/article/view/411>>. Acesso em: 09 jul. 2021.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 3. ed. São Paulo: Casa do Pão Editora, 2014. 325p.

RODRIGUES, P. O.; SANTOS, B. V.; COSTA, L.; HENRIQUE, M. A.; PASQUINI, D.; BAFFI, M. A. Xylanase and beta-glucosidase production by *Aspergillus fumigatus* using commercial and lignocellulosic substrates submitted to chemical pre-treatments.

Industrial Crops and Products, Amsterdã, v. 95, p. 453-459, jan. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.055>>. Acesso em: 10 dez. 2017.

ROMANO, L. H. **Bioprospecção de microrganismos endofíticos isolados de *Tabebuia* spp. e *Hymenaea courbaril* e identificação da produção de metabólitos de interesse biotecnológico**. 2015. 134f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)–Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

RONZON, T.; M'BAREK, R. Socioeconomic indicators to monitor the EU's bioeconomy in transition. **Sustainability**, Basel, v. 10, n. 6, 1745, may 2018.

Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/su10061745>>. Acesso em: 06 jun. 2020.

SAAD, A. L. M.; VIANA, R. F.; SIQUEIRA, O. A. P. A. SALES-CAMPOS, C.; ANDRADE, M. C. N. Aproveitamento de resíduos agrícolas no cultivo do cogumelo medicinal *Ganoderma lucidum* utilizando a tecnologia chinesa “Jun-Cao”.

Ambiência, Guarapuava, v. 13, n. 3, p. 271-283, set./dez. 2017. Disponível em: <<https://revistas.unicentro.br/index.php/ambiencia/article/view/3643>>. Acesso em: 23 fev. 2020.

SALGADO, F. H. M.; MOREIRA, F. M. S.; PAULINO, H. B.; SIQUEIRA, J. O.; CARNEIRO, M. A. C. Arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhizal stimulant affect dry matter and nutrient accumulation in bean and soybean plants. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 46, n. 4, p. 367-373, oct./dec. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632016v46a40282>>. Acesso em: 16 jul. 2020.

SALGADO, F. H. M.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BARBOSA, R. H.; PAULINO, H. B.; CARNEIRO, M. A. C. Arbuscular mycorrhizal fungi and colonization stimulant in cotton and maize. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 6, e20151535, maio 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20151535>>. Acesso em: 14 mar. 2019.

SAMPAIO, P. R.; HADDAD, S.; WIENDL, V. B. Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para a produção de enzima tanase. **Sinergia**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 152-156, jul./dez. 2018. Disponível em: <<https://ojs.ifsp.edu.br/index.php/sinergia/article/view/334>>. Acesso em: 02 maio 2021.

SANTI, L.; BERGER, M.; SILVA, W. O. B. Pectinases e pectina: aplicação comercial e potencial biotecnológico. **Caderno Pedagógico**, Lajeado, v. 11, n. 1, p. 130-139, 2014. Disponível em: <www.univates.br/revista/index.php/cadped/article/view/904>. Acesso em: 23 fev. 2020.

SANTOS, A. A.; AGUSTINI, J. A.; MALTONI, K. L.; CASSIOLATO, A. M. R. Addition of waste and introduction of microorganisms after 45 years of soil degradation. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 49, n. 3, p. 363-370, ju./set. 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20180041>>. Acesso em: 15 mar. 2019.

SANTOS, A. M. M.; SOUZA, L. M.; SILVA, J. F.; COSTA, C. S. R.; COUTINHO, F. P.; COSTA, K. D. S.; ARAÚJO, B. G. P. Parasitismo *in vitro* de *Meloidogyne javanica* por fungos nematófagos. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 12, p. 100602-100616, dez. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.34117/bjdv6n12-523>>. Acesso em: 01 fev. 2021.

SANTOS, C. C.; BARBOSA, R. C. S.; LEÃO, L. L.; ARCANJO, M. C. N.; SOARES, L. J. F.; NASCIMENTO, A. L.; PIMENTA, A. S.; JESUS, S. C.; SOUZA, S. A.; SOARES, P. D. F.; SILVA, M. S.; SILVA, N.; MATIAS, A. D.; BARBOSA, R. P.; FARIAS, P. K. S. Aceitabilidade sensorial de barras de cereais formuladas a partir de resíduos agroindustriais. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, Campinas, v. 10, n. 4, p. 1864-1870, 2018. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.25248/REAS285_2018>. Acesso em: 04 jun. 2020.

SANTOS, F. R. S.; GARCIA, N. F. L.; PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Production and characterization of β -glucosidase from *Gongronella butleri* by solid-state fermentation. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 15, n. 16, p. 633-641, apr. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.5897/AJB2015.15025>>. Acesso em: 16 jun. 2020.

SANTOS, I. A. **Economia ecológica e políticas públicas: um olhar sobre o Cerrado brasileiro**. 2018. 99f. Dissertação (Mestrado em Economia)–Instituto de Economia e Relações Internacionais, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

SANTOS, L. M.; ORLANDELLI, R. C. Xilanases fúngicas: aproveitamento do farelo de trigo em processos fermentativos e panificação. **Evidência – Ciência e Biotecnologia**, Joaçaba, v. 19, n. 2, p. 243-258, jul./dez. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.18593/eba.v19i2.21819>>. Acesso em: 20 jun. 2020.

SANTOS, P. S.; SOLIDADE, L. S.; SOUZA, J. G. B.; LIMA, G. S.; BRAGA JR, A. C. R.; ASSIS, F. G. V.; LEAL, P. L. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, Viçosa, v. 4, n. 2, p. 0181-0188, jul. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.18540/jcecvl4iss2pp0181-0188>>. Acesso em: 27 fev. 2020.

SANTOS-ROCHA, M. S. R.; SOUZA, R. B. A.; SILVA, G. A.; CRUZ, A. J. G.; ALMEIDA, R. M. R. G. Pré-tratamento hidrotérmico de resíduos do milho visando à produção de etanol de segunda geração. **Scientia Plena**, Aracaju, v. 13, n. 3, e034202, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.14808/sci.plena.2017.034202>>. Acesso em: 24 fev. 2020.

SANTOS, S. F. M.; SOUZA, R. L. A.; ALCÂNTARA, S. R.; PINTO, G. A. S.; SILVA, F. L. H.; MACEDO, G. R. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção de pectinase por fermentação em estado sólido do pedúnculo de caju. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 10, n. 2, p. 101-109, 2008. Disponível em: <<http://deag.ufcg.edu.br/rbpa/rev102/Art1021.pdf>>. Acesso em: 11 mar. 2018.

SARAIVA, B. R.; VITAL, A. C. P.; ANJO, F. A.; CESARO, E.; MATUMOTO-PINTRO, P. T. Varolização de resíduos agroindustriais: fontes de nutrientes e compostos bioativos para a alimentação humana. **Revista PubSaúde**, Maringá, v. 1, a007, nov. 2018. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.31533/pubsaude1.a007>>. Acesso em: 04 jun. 2020.

SAVI, D. C.; SHAABAN, K. A.; GOS, F. M. W. R.; PONOMAREVA, L. V.; THORSON, J. S.; GLIENKE, C., *Phaeophleospora vochysiae* Savi & Glienke sp. nov. isolated from *Vochysia divergens* found in the Pantanal, Brazil, produces bioactive secondary metabolites. **Scientific Reports**, New York, v. 8, n. 3122, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-018-21400-2>>. Acesso em: 10 mar. 2019.

SAWYER, D.; MESQUITA, B.; COUTINHO, B.; ALMEIDA, F. V.; FIGUEIREDO, I.; LAMAS, I.; PEREIRA, L. E.; PINTO, L. P.; PIRES, M. O.; KASECKER, T. **Perfil do ecossistema hotspot de biodiversidade do Cerrado**. Critical Ecosystem Partnership Fund, 2016. 520p. Disponível em: <http://cepfcerrado.iieb.org.br/wp-content/uploads/2017/09/PR_Cerrado-Perfil-do-Ecossistema_TEXTOAPENDICES_port_revisada-20170804.compressed.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2018.

SCARLAT, N.; DALLEMAND, J-F.; MONFORTI-FERRARIO, F.; NITA, V. The role of biomass and bioenergy in a future bioeconomy: policies and facts. **Environmental Development**, Beijing, v. 15, p. 3-34, jul. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envdev.2015.03.006>>. Acesso em: 11 jun. 2020.

SEKI, K.; NISHIYAMA, Y.; MITSUTOMI, M. Characterization of a novel exo-chitosanase, an exo-chitobiohydrolase, from *Gongronella butleri*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Fukuoka, v. 127, n. 4, p. 425-429, apr. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.09.009>>. Acesso em: 19 jun. 2020.

SENNA, S. N. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de xilanases e celulases utilizando resíduos agroindustriais**. 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia)-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2014. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/110636>>. Acesso em: 11 set. 2021.

SENNA, S. N. **Produção, purificação parcial e caracterização de xilanase produzida por fungo filamentoso**. 2018. 122 f. Tese (Doutorado em Microbiologia)-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2018. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/157096>>. Acesso em: 31 jan. 2021.

SENNA, S. N.; LOUZADA, L. F.; CASTROAGUDIN, V. L.; PRADO, H. F. A. Selection of fungi for xylanase production. In: Revista Ciência, Tecnologia & Ambiente, Araras, v. 6, n. 1, p. 1-545, 2017. SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA APLICADA, 8, Rio Claro. **Anais...**, Rio Claro: Unesp, 2017. p. 540.

SENNA, S. N.; MASSARENTE, V. S.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O.; ALVES-PRADO, H.F. Efeitos da temperatura e do pH sobre a atividade da xilanase produzida por fungo mesofílico. In: RIBEIRO, C. S.; BATISTA, V. E. G. ENCONTRO DE CIÊNCIAS DA VIDA, 12, 2018, Ilha Solteira. **Anais...** Ilha Solteira: Unesp/FEIS, 2018. p. 105-106.

SILVA, D. B. Sustentabilidade no agronegócio: dimensões econômica, social e ambiental. **Comunicação & Mercado/UNIGRAN**, Dourados, v. 1, n. 3, p. 23-34, jul./dez. 2012. Disponível em: <<https://www.unigran.br/dourados/mercado/paginas/arquivos/edicoes/3/3.pdf>>. Acesso em: 06 jun. 2020.

SILVA, D. B.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; PINHEIRO, A. R. B. N.; CHAGAS, L. F.; GIONGO, M. Bioprospecção de linhagens de *Trichoderma* sp. na degradação de resíduos lignocelulósicos de sabugo de milho. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 10, n. 1, p. 252-258, jan./mar. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.18378/rvads.v10i1.2775>>. Acesso em: 16 jun. 2020.

SILVA, C. L.; VASCONCELLOS, S. P. **Avaliação da atividade lignolítica de actinomicetos e fungos de diferentes biomas brasileiros**. 2018. 63 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Ambientais)-Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, 2018. Disponível em: <www.repositorio.unifesp.br/handle/11600/49837>. Acesso em: 23 fev. 2020.

SILVA, F. M.; PEDROZA, M. M.; OLIVEIRA, L. R. A.; COLEN, A. G. N.; AMARAL, P. H. B. Rotas tecnológicas empregadas no aproveitamento de resíduos da indústria da soja. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 326-363, 2019. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/rber/article/view/57694>>. Acesso em: 23 fev. 2020.

SILVA, G. F.; MEGALE, M. H. D. S. O direito ao futuro como mandamento ético: a sustentabilidade e o modelo de produção alimentar no Brasil. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, Florianópolis, v. 9, n. esp. II, p. 811-822, maio 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.19177/rgsa.v9e02020811-822>>. Acesso em: 06 jun. 2020.

SILVA, G. M. H.; FERREIRA, G. F.; BEZERRA, N. S.; TAVARES, L. M.; ALMEIDA, A. F.; SOUSA, A. C. B. Produção de amilase e protease obtidas por *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* através da fermentação em estado sólido. **Revista Saúde & Ciência Online**, Campina Grande, v. 7, n. 2, p. 486-502, maio/ago. 2018. Disponível em: <<https://rsc.revistas.ufcg.edu.br/index.php/rsc/article/view/131>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

SILVA, J. S.; MALTA, V. R. S.; SANTOS-ROCHA, M. S. R.; ALMEIDA, R. M. R. G.; GOMES, M. A.; VICENTE, C. D.; BARBOSA, K. L. Hidrólise enzimática, fermentação e produção de biocombustíveis através da coroa de *Ananas comosus*. **Química Nova**, São Paulo, v. 41, n. 10, p. 1127-1131, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170281>>. Acesso em: 03 ago. 2018.

SILVA, L. S. **Biotransformação dos ácidos gálico e elágico por microorganismo do Cerrado brasileiro**. 2015. 157 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015. Disponível em: <<https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/5626>>. Acesso em: 16 jun. 2020.

SILVA, M. F. O.; PEREIRA, F. S.; MARTINS, J. V. B. **A bioeconomia brasileira em números**. Rio de Janeiro: BNDES Setorial, 2018. p. 277-332. Disponível em: <https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/15383/1/BS47__Bioeconomia__F ECHADO.pdf>. Acesso em: 07 jun. 2020.

SILVEIRA, B. M. P. **Seleção de biocatalisador com potencial para a produção de exopolissacarídeos**. 2018. 136f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)–Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2018. Disponível em: <<http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/handle/1/1925>>. Acesso em: 19 jul. 2019.

SOOCH, B. S; KAULDHAR, B. S. Influence of multiple bioprocess parameters on production of lipase from *Pseudomonas sp.* BWS-5. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 56, n. 5, p. 711-721, sep./oct. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000500002>>. Acesso em: 27 jun. 2021.

SOUSA, K. S. T.; GUDIÑA, E.; RODRIGUES, L.; SCHWAN, R. F.; DIAS, D. R.; TEIXEIRA, J. A. Avaliação da produção de biossurfactantes por espécies de leveduras. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, AGRÍCOLA E AMBIENTAL, 1., 2016, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Ciência e Tecnologia Fatec-JB, v. 8, n. esp., 2016.

SOUZA, J. V. B.; SOUSA, D. R. T.; CELESTINO, J. R.; SEGUNDO, W. O. P. F.; SOUZA, É. S. Bioprospecting with brazilian fungi. In: PATERSON, R.; LIMA, N. (Ed.). **Bioprospecting**: success, potential and constraints. 1 ed. v. 16. Cham: Springer, 2017. p. 197-211.

SOUZA, R. L. A.; OLIVEIRA, L. S. C.; SILVA, F. L. H.; AMORIM, B. C. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.14, n.9, p. 987-992, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1415-43662010000900011>>. Acesso em: 21 jun. 2020.

STOFFEL, S. C. G.; ARMAS, R. D.; GIACHINI, A. J.; ROSSI, M. J.; GONZALEZ, D.; MEYER, E.; NICOLEITE, C. H.; ROCHA-NICOLEITE, E.; SOARES, C. R. F. S. Micorrizas arbusculares no crescimento de leguminosas arbóreas em substrato contendo rejeito de mineração de carvão. **Cerne**, Lavras, v. 22, n. 2, p. 181-188, abr./jun. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/01047760201622021969>>. Acesso em: 14 mar. 2019.

SUHAIMI, N.; RAMLI, S.; ABD MALEK, R.; AZIZ, R.; OTHMAN, N. Z.; LENG, O. M.; ESAWY, M.; GAMAL, A.; EL-ENSHASY, H. Optimization of pectinase production by *Aspergillus niger* using orange pectin based medium. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, Jaipur, v. 8, n. 2, p. 259-268, 2016. Disponível em: <<http://www.jocpr.com/archive/jocpr-volume-8-issue-2-year-2016.html>>. Acesso em: 12 dez. 2017.

TEDERSOO, L.; SÁNCHEZ-RAMÍREZ, S.; KÖLJALG, U.; BAHRAM, M.; DÖRING, M.; SCHIGEL, D.; MAY, T.; RYBERG, M.; ABARENKOV, K. High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. **Fungal Diversity - An International Journal of Mycology**, Pequim, v. 90, n. 1, p. 135-159, may 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13225-018-0401-0>>. Acesso em: 31 jan. 2021.

THORSTENSEN, V. H.; MOTA, C. R. **A governança mundial da sustentabilidade: o papel da OCDE**. Working Paper 486, CCGI n. 10. São Paulo: Escola de Economia de São Paulo da Fundação Getúlio Vargas, 2018. 50p. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10438/24781>>. Acesso em: 03 jun. 2020.

TORRES, D. A. P.; CAMPOS, S. K.; PONCHIO, A. P. S.; BARROS, G. S. C.; FIGUEIREDO, E. V. C.; VIEIRA JÚNIOR, P. A. Viabilidade econômica da produção agropecuária no Brasil: aspectos gerais, metodologia e principais resultados. In: SANTOS, M. M.; CAMPOS, S. K.; TORRES, D. A. P.; PONCHIO, A. P. S.; BARROS, G. S. C.; GUEDES, A. C. **Sustentabilidade e sustentação da produção de alimentos no Brasil: o desafio da rentabilidade na produção**. Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2014. v. 2. cap. 1. p. 11-47. Disponível em: <https://www.cgee.org.br/documents/10182/734063/Des_Rentabilidade_Vol_II_LIVRO_Web_13052015_10169.pdf>. Acesso em: 06 jun. 2020.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200028>>. Acesso em: 15 ago. 2021.

UNITED NATIONS. **World population prospects**. 2017. Disponível em: <<https://esa.un.org/unpd/wpp/DataQuery/>>. Acesso em: 12 jan. 2018.

UNITED STATES DEPARTMENT OF ENERGY (DOE). UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). UNITED STATES DEPARTMENT OF THE INTERIOR. NATIONAL SCIENCE FOUNDATION (NSF). UNITED STATES DEPARTMENT OF DEFENSE (USDOD). UNITED STATES DEPARTMENT OF TRANSPORTATION. UNITED STATES EXECUTIVE OFFICE OF THE PRESIDENT. **Federal Activities Report on the Bioeconomy**. 2016. 56p. Disponível em: <https://biomassboard.gov/pdfs/farb_2_18_16.pdf>. Acesso em: 07 jun. 2016.

VALADARES-PEREIRA, A. A.; OLIVEIRA, E. C. A. M.; NAVARRETE, A. A.; OLIVEIRA JUNIOR, W. P.; TSAI, S. M.; PELUZIO, J. M.; MORAIS, P. B. Fungal community structure as na indicator of soil agricultural management effects in the Cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 41, e0160489, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/18069657rbcs20160489>>. Acesso em: 09 mar. 2019.

VAN DER MAAREL, M. J. E. C.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J. C. M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 94, n. 2, p. 137-155, mar. 2002 Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(01\)00407-2](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(01)00407-2)>. Acesso em: 15 ago. 2021.

VARELA-BENAVIDES, I.; DURÁN-MORA, J.; GUZMÁN-HERNÁNDEZ, T. Evaluación in vitro de diez cepas de hongos nematófagos para el control de *Meloidogyne exigua*, *Meloidogyne incognita* y *Radopholus similis*. **Revista Tecnología En Marcha**, Cartago, v. 30, n. 1, p. 27-37, ene./mar. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.18845/tm.v30i1.3062>>. Acesso em: 01 fev. 2021.

VASCONCELLOS, R. C.; BELTRÃO, N. E. S. Avaliação de prestação de serviços ecossistêmicos em sistemas agroflorestais através de indicadores ambientais. **Interações**, Campo Grande, v. 19, n. 1, p. 209-220, jan./mar. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.20435/inter.v19i1.1494>>. Acesso em: 23 fev. 2020.

VELA GUROVIC, M. S.; STAFFOLO, M. D.; MONTERO, M.; DEBBAUDT, A.; ALBERTENGO, L.; RODRÍGUEZ, M. S. Chitooligosaccharides as novel ingredients of fermented foods. **Food & Function**, London, v. 6, n. 11, p. 3437-3443, aug. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/C5FO00546A>>. Acesso em: 18 abr. 2021.

VERDE, G. M. V.; COUTO, E. A. P.; CUNHA, M. G.; FERREIRA, H. D.; FERRI, P. H.; AQUINO, G. L. B.; PAULA, J. R. Perfil químico do óleo volátil das folhas de *Erythroxylum deciduum* A. St.-Hil. (Erythroxylaceae), coletadas em Goiânia, Goiás. **Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science**, Anápolis, v. 5, n. 1, p. 213-225, jan./jun. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.21664/2238-8869.2016v5i1.p213-225>>. Acesso em 04 mar. 2019.

VOLOVA, T. G.; BOYANDIN, A. N.; PRUDNIKOVA, S. V. Biodegradation of polyhydroxyalkanoates in natural soils. **Journal of Siberian Federal University. Biology**, Krasnoyarsk, v. 8, n. 2, p. 152-167, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.17516/1997-1389-2015-8-2-152-167>>. Acesso em: 01 fev. 2021.

VORAGEN, A. G. J.; GERD-JAN, C.; VERHOEF, R. P.; SCHOLS, H. A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, Budapest, v. 20, n. 2, p. 263-275, mar. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11224-009-9442-z>>. Acesso em: 16 ago. 2021.

YAMASHITA, S.; ANDO, K.; HOSHINA, H.; ITO, N.; KATAYAMA, Y.; KAWANABE, M.; MARUYAMA, M.; ITIOKA, T. Food web structure of the fungivorous insect community on bracket fungi in a Bornean tropical rain forest. **Ecological Entomology**, Saint Albans, v. 40, n. 4, p. 390-400, aug. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/een.12200>>. Acesso em 05 abr. 2019.

YANG, F.; LUAN, B.; SUN, Z.; YANG, C.; YU, Z.; LI X. Application of chitooligosaccharides as antioxidants in beer to improve the flavour stability by protecting against beer staling during storage. **Biotechnology Letters**, California, v. 39, n. 2, p. 305-310, feb. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10529-016-2248-3>>. Acesso em: 18 abr. 2021.

WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer as starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 17, p. 97-104, jun. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.10.008>>. Acesso em: 15 ago. 2021.

ZANARDO, A. B. R. **Abundância de fungos entomopatogênicos da ordem Hypocreales e diversidade genética de *Metarhizium* spp. isolados de amostras de solo de áreas representativas de cinco biomas brasileiros**. 2015. 153f. Tese (Doutorado em Ciências. Área de concentração: Entomologia)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

ZANELLA, T. P.; LAGO, S. M. S. A produção científica brasileira sobre a sustentabilidade no agronegócio: um recorte temporal entre 2005 e 2015. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, Lavras, v. 18, n. 4, p. 356-370, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.21714/2238-68902016v18n4p356>>. Acesso em: 05 jun. 2020.

ZANINETTE, F.; ROCHA, G. A. L. M.; BOM PESSONI, R. A.; BRAGA, M. R.; SIMÕES, K.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L.; FIALHO, M. B. Production of inulin and neolevan-type fructooligosaccharides by *Penicillium janczewskii* Zaleski CCIBt 3352. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Malden, v. 66, n. 3, p. 419-425, may/jun. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/bab.1738>>. Acesso em: 06 maio 2020.

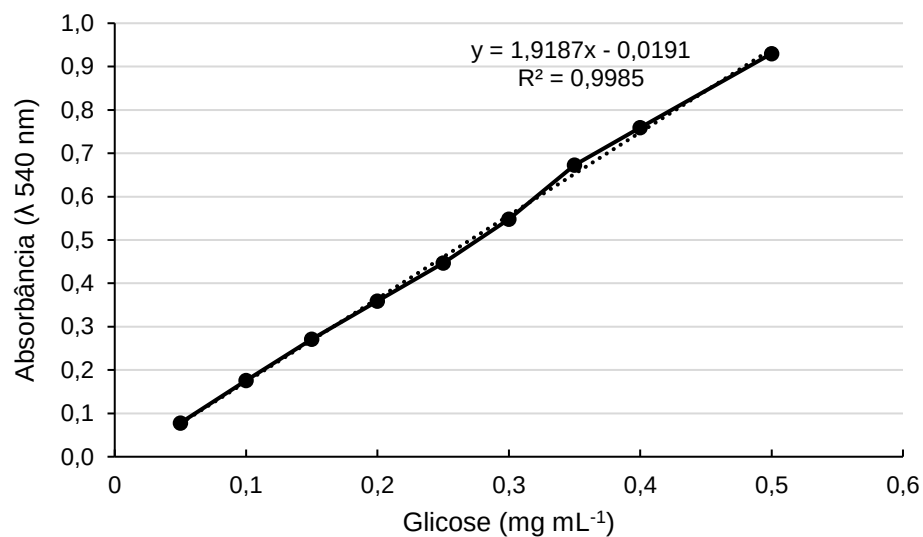
ZANONI, P. R. S.; SCHROEDER, B. G.; HEINZ, K. G. H.; HANSEL, F. A.; TAVARES, L. B.; MAGALHÃES, W. L. E. **Produção de etanol: uma opção para aproveitamento de resíduos gerados nas indústrias de reciclagem de papel**. Colombo: Embrapa Florestas, 2015. 25p. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1039743/producao-de-etanol-uma-opcao-para-aproveitamento-de-residuos-gerados-nas-industrias-de-reciclagem-de-papel>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

ZOU, P.; YUAN, S.; YANG, X.; GUO, Y.; LI, L.; XU, C.; ZHAI, X.; WANG, J. Structural characterization and antitumor effects of chitosan oligosaccharides against orthotopic liver tumor via NF- κ B signaling pathway. **Journal of Functional Foods**, Wageningen, v. 57, p. 157-165, oct. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.002>>. Acesso em: 18 abr. 2021.

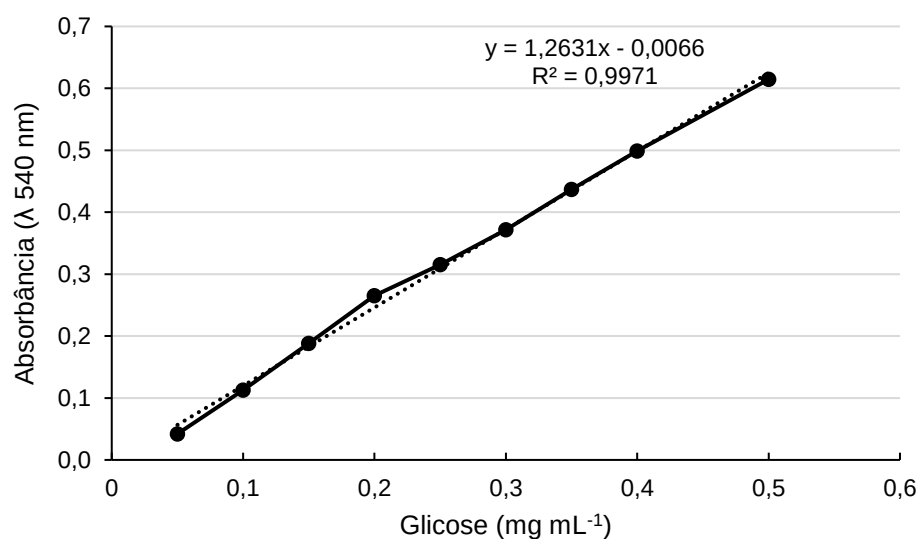
ZYGOLIFE RESEARCH CONSORTIUM. ***Gongronella butleri* 1**. 2016. Disponível em: <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:%27Gongronella_butleri%27_1_\(28249666881\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:%27Gongronella_butleri%27_1_(28249666881).jpg)>. Acesso em: 16 set. 2021.

APÊNDICE A – Curvas de calibração padronizadas para a determinação de açúcares redutores totais (ART)

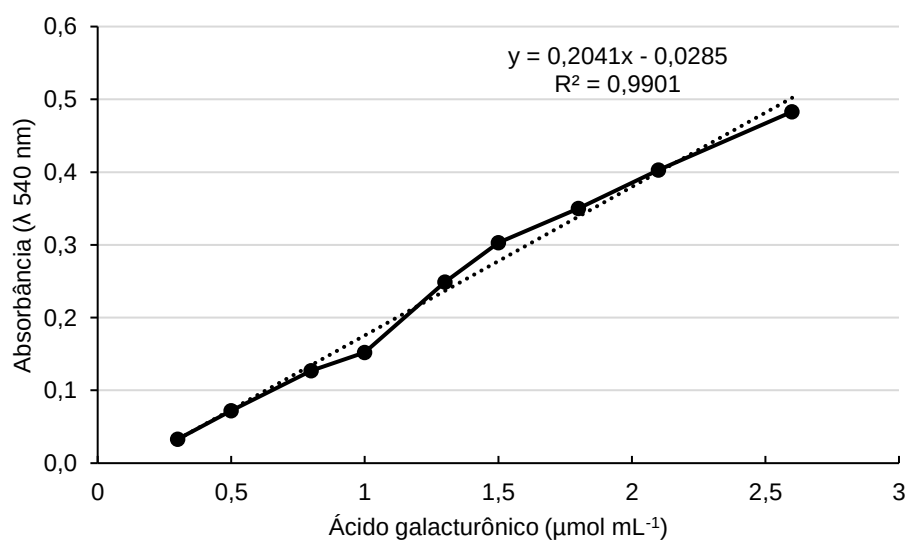
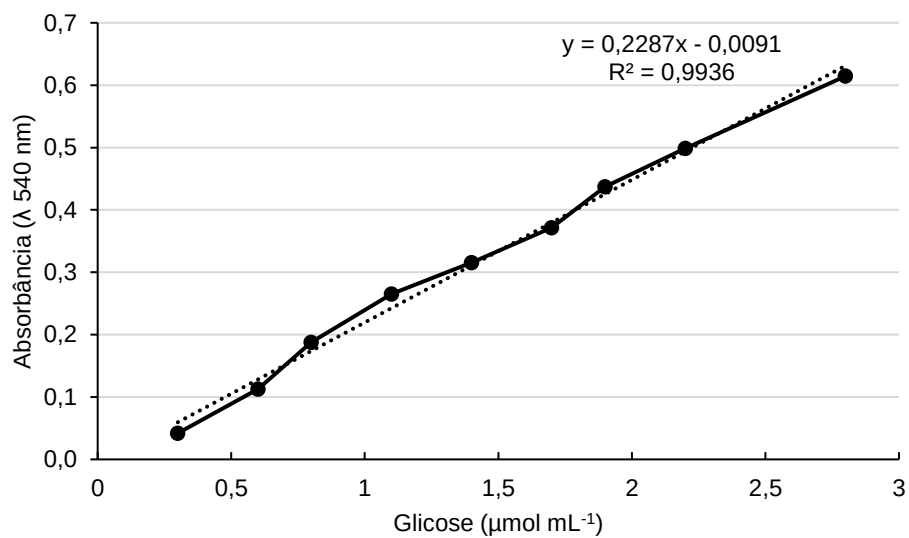
Para o substrato sem adição de solução mineral nutritiva

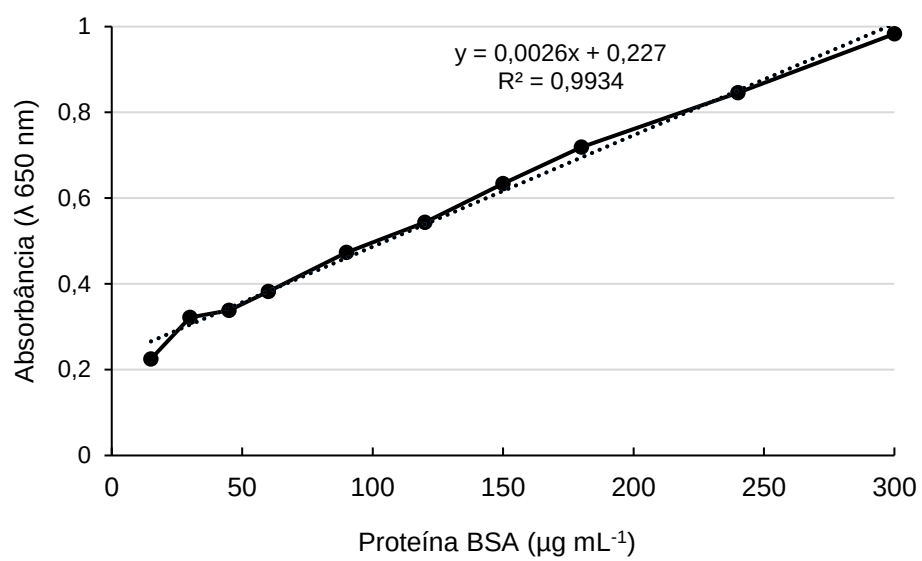


Para o substrato adicionado de solução mineral nutritiva



APÊNDICE B – Curvas de calibração padronizadas da solução do ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS)



APÊNDICE C – Curva de calibração de soro albumina bovina (BSA)

APÊNDICE D – Quadro de análise de variância (ANOVA) para o crescimento micelial de *Gongronella butleri* IPS 8.2

Anova: fator duplo com repetição															
RESUMO	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h	240 h	264 h	288 h	312 h	336 h	Total
25°C															
Contagem	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	42
Soma	2,4	4,6	6,5	8	10,1	12,6	12,7	14,7	15,6	18,4	20,8	22,9	23,9	24	197,2
Média	0,8	1,53333	2,166667	2,66667	3,36667	4,2	4,23333	4,9	5,2	6,13333	6,93333	7,63333	7,96667	8	4,69524
Variância	0,04	0,17333	0,083333	0,08333	0,10333	0,13	0,06333	0,21	0,07	0,01333	0,01333	0,00333	0,00333	0	5,5751
30°C															
Contagem	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	42
Soma	2,7	6	8,6	11,5	14,5	17,1	20,5	22,5	23,8	24,7	25,2	25,2	25,2	25,2	252,7
Média	0,9	2	2,866667	3,83333	4,83333	5,7	6,83333	7,5	7,93333	8,23333	8,4	8,4	8,4	8,4	6,01667
Variância	0,03	0,75	0,103333	0,08333	0,08333	0,07	0,08333	0	0,04333	0,00333	0,01	0,01	0,01	0,01	6,84435
35°C															
Contagem	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	42
Soma	2,9	6	7,7	9,5	12	14,4	16,4	20,9	22,2	22,9	23,7	24,6	24,9	25,1	233,2
Média	0,96667	2	2,566667	3,16667	4	4,8	5,46667	6,96667	7,4	7,63333	7,9	8,2	8,3	8,36667	5,55238
Variância	0,20333	0,25	0,163333	0,08333	0,25	0,13	0,21333	0,70333	0,52	0,36333	0,21	0,21	0,19	0,22333	6,69134
Total															
Contagem	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	
Soma	8	16,6	22,8	29	36,6	44,1	49,6	58,1	61,6	66	69,7	72,7	74	74,3	
Média	0,88889	1,84444	2,533333	3,22222	4,06667	4,9	5,51111	6,45556	6,84444	7,33333	7,74444	8,07778	8,22222	8,25556	
Variância	0,07361	0,34778	0,18	0,31944	0,515	0,51	1,35861	1,64278	1,73278	0,9725	0,47528	0,17444	0,08944	0,09528	

APÊNDICE E – Tabelas de coeficientes e significância estatística das variáveis independentes sobre as atividades enzimáticas e redução percentual da viscosidade de uma solução de pectina, após emprego de planejamento fatorial 2³.

Atividade amilolítica

	Coeficiente	Erro padrão	<i>t</i> calculado	p-valor
Média	54,4	2,171876	25,04747	0,000015
X ₁	4,225	2,54675	1,658977	0,172459
X ₂	-19,65	2,54675	-7,71571	0,001519
X ₃	1,2	2,54675	0,471189	0,662055
X ₁ · X ₂	3,6	2,54675	1,413566	0,230376
X ₁ · X ₃	0,5	2,54675	0,196329	0,853924
X ₂ · X ₃	0,375	2,54675	0,147246	0,890061

X₁ = proporção de substratos (g); X₂ = volume (mL) de solução mineral nutritiva; X₃ = teor (%) de CaCl₂.

Atividade pectinolítica

	Coeficiente	Erro padrão	<i>t</i> calculado	p-valor
Média	36,69091	1,809266	20,27944	0,000039
X ₁	1,7625	2,121553	0,830759	0,45282
X ₂	-4,1625	2,121553	-1,96201	0,121275
X ₃	1,9375	2,121553	0,913246	0,412779
X ₁ · X ₂	2,1125	2,121553	0,995733	0,375737
X ₁ · X ₃	-0,6875	2,121553	-0,32406	0,762133
X ₂ · X ₃	1,9875	2,121553	0,936814	0,401892

X₁ = proporção de substratos (g); X₂ = volume (mL) de solução mineral nutritiva; X₃ = teor (%) de CaCl₂.

Redução percentual da viscosidade

	Coeficiente	Erro padrão	<i>t</i> calculado	p-valor
Média	4,972727	1,21367	4,097263	0,0149
X ₁	0,5	1,423155	0,351332	0,743064
X ₂	-0,85	1,423155	-0,59726	0,582497
X ₃	0,475	1,423155	0,333766	0,75532
X ₁ · X ₂	0,675	1,423155	0,474298	0,660019
X ₁ · X ₃	-0,2	1,423155	-0,14053	0,895032
X ₂ · X ₃	0,4	1,423155	0,281066	0,7926

X₁ = proporção de substratos (g); X₂ = volume (mL) de solução mineral nutritiva; X₃ = teor (%) de CaCl₂.

APÊNDICE F – Tabelas de coeficientes e significância estatística das variáveis independentes sobre as atividades enzimáticas (amilase e pectinase), após emprego de delineamento composto central rotacional (DCCR).

Atividade amilolítica

	Coeficiente	Erro padrão	t calculado	p-valor
Média	28,43822	2,077763	13,68694	0,000000782
X_1	7,605883	1,126131	6,753994	0,000144
X_1^2	-3,15185	1,170128	-2,6936	0,027344
X_2	1,811893	1,126131	1,608953	0,146293
X_2^2	-6,57071	1,170128	-5,61538	0,000501
X_3	2,581531	1,126131	2,29239	0,051074
X_3^2	-6,23484	1,170128	-5,32834	0,000704
$X_1 \cdot X_2$	-3,9875	1,471361	-2,71008	0,026655
$X_1 \cdot X_3$	0,49	1,471361	0,333025	0,747675
$X_2 \cdot X_3$	-0,935	1,471361	-0,63547	0,54287

X_1 = tempo de cultivo (h); X_2 = temperatura de incubação (°C); X_3 = volume de solução mineral nutritiva (mL).

Atividade pectinolítica

	Coeficiente	Erro padrão	t calculado	p-valor
Média	199,9523	20,68209	9,667895	0,0000109
X_1	53,09944	11,20953	4,73699	0,00147
X_1^2	-21,0618	11,64748	-1,80827	0,108177
X_2	37,19781	11,20953	3,318409	0,010565
X_2^2	-43,1801	11,64748	-3,70725	0,00598
X_3	32,48184	11,20953	2,897698	0,019962
X_3^2	-47,9796	11,64748	-4,11931	0,003347
$X_1 \cdot X_2$	-8,93	14,64596	-0,60972	0,55896
$X_1 \cdot X_3$	-0,775	14,64596	-0,05292	0,959097
$X_2 \cdot X_3$	1,8	14,64596	0,122901	0,905217

X_1 = tempo de cultivo (h); X_2 = temperatura de incubação (°C); X_3 = volume de solução mineral nutritiva (mL).

APÊNDICE G – Tabelas de análise de variância (ANOVA) para os modelos ajustados as atividades enzimáticas (amilase e pectinase), após emprego de delineamento composto central rotacional (DCCR).

Atividade amilolítica

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F _{calc}	F _{tab}	p-valor
Regressão	1878,596	6	313,0993	17,90969	3,09	0,0000436
Resíduos	192,3033	11	17,48212			
Falta de ajuste	168,2258	8	21,02823	2,620071	8,85	0,230886
Erro puro	24,07747	3	8,025825			
Total	2070,899	17				

$$R^2 (\%) = 90,71$$

$$F_{cal}/F_{tab} (5\%) = 5,80$$

SQ = Soma quadrática; gl = graus de liberdade; QM = Quadrado médio; F_{cal} = F calculado; F_{tab} = F tabelado; p-valor = significância estatística; R² = coeficiente de determinação.

Atividade pectinolítica

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F _{calc}	F _{tab}	p-valor
Regressão	110221,4	5	22044,28	13,22121	3,11	0,000156
Resíduos	20008,09	12	1667,341			
Falta de ajuste	19615,42	9	2179,491	16,65102	8,81	0,020473
Erro puro	392,677	3	130,8923			
Total	130229,5	17				

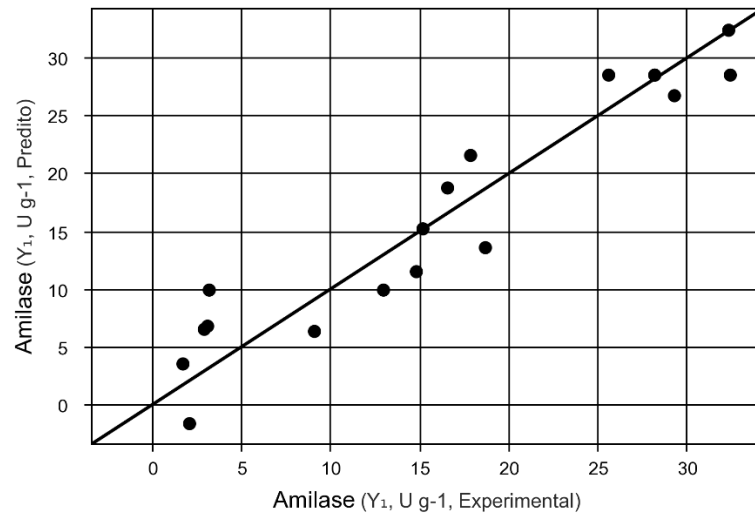
$$R^2 (\%) = 84,64$$

$$F_{cal}/F_{tab} (5\%) = 4,25$$

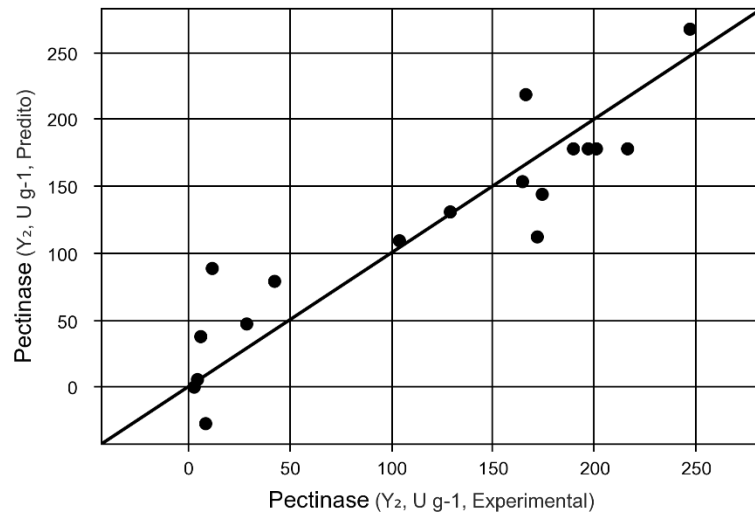
SQ = Soma quadrática; gl = graus de liberdade; QM = Quadrado médio; F_{cal} = F calculado; F_{tab} = F tabelado; p-valor = significância estatística; R² = coeficiente de determinação.

APÊNDICE H – Gráficos das respostas reais *versus* previstas pelo modelo linear de regressão aplicado às atividades enzimáticas (amilase e pectinase), após emprego de delineamento composto central rotacional (DCCR).

Atividade amilolítica



Atividade pectinolítica



TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 02/09/2021

Heibely Fernandes Braga

Assinatura do autor