
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DAIANE RAQUEL POLEZEL

**ANÁLISE DO POTENCIAL DE MICRO-ORGANISMOS DOS
GÊNEROS *LECYTHOPHORA* E *CRYPTOCOCCUS* PARA A
PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS**

DAIANE RAQUEL POLEZEL

ANÁLISE DO POTENCIAL DE MICRO-ORGANISMOS DOS GÊNEROS
LECYTHOPHORA E *CRYPTOCOCCUS* PARA A PRODUÇÃO DE
BIOCOMBUSTÍVEIS

Orientador: Fernando Carlos Pagnocca

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro,
para obtenção do grau de Bacharela em
Ciências Biológicas

Rio Claro

2015

604.6 Polezel, Daiane Raquel
P765a Análise do potencial de micro-organismos dos gêneros
Lecythophora e Cryptococcus para a produção de
biocombustíveis / Daiane Raquel Polezel. - Rio Claro, 2015
37 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Rio Claro

Orientador: Fernando Carlos Pagnocca

1. Resíduos. 2. Resíduos lignocelulósicos. 3. Enzimas
lignocelulolíticas. 4. Monossacarídeos fermentescíveis. I.
Título.

*Aos meus pais, José Augusto e Zélia, e ao meu
irmão, Danilo, grandes exemplos de caráter,
companheirismo e amor.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me guiado e dado forças para cumprir esta etapa em minha vida, colocando pessoas importantíssimas ao longo do caminho e também, por ter colocado desafios ao longo dessa jornada, para que assim, eu me torna-se mais forte.

Agradeço incondicionalmente, aos meus pais, José Augusto e Zélia. Sem eles nada seria concretizado. Muito obrigada por me suportarem em momentos de desespero, estresse e cansaço, espero em breve poder retribuir de alguma forma todo o apoio que vocês sempre me deram. Amo vocês!

Muitíssimo obrigada ao meu irmão, Danilo. Que sempre teve paciência comigo, me levando, me buscando, me ouvindo, sendo o irmão mais velho que todos queriam ter. Indubitavelmente, não há irmão melhor que você! Serei eternamente grata por tudo.

Agradeço imensamente à minha avó Raquel, por ser tão importante em minha vida e por sempre rezar por mim. E sem me esquecer dos meus amados avós Arcanjo, Alvira, Antônio (in memoriam), pelo grande exemplo de caráter que foram em minha vida. Queria muito que vocês estivessem aqui.

Agradeço também, ao meu orientador Fernando Carlos Pagnocca, pela orientação, pelas conversas, por ter aberto as portas de seu laboratório e depositado em mim a sua confiança e, principalmente, por ter se tornado um grande amigo, meu e de minha família.

À Maria Carolina Canali. Minha amiga de todas as horas, minha dupla de todos os trabalhos, de laboratório. Inseparáveis, desde o princípio. Muito obrigada pela amizade, pelas gargalhadas, pelos choros, momentos de desespero, de alegria, de fuga, de disfarce. Muito obrigada mesmo! Levarei sua amizade para sempre.

À Paixão (Doutora Weilan), por ter sido amiga, conselheira, psicóloga. Agradeço a sua ilustre presença em minha vida, e escreverei “bem aqui” o meu agradecimento por tudo, tudo mesmo!

Dani Tura, obrigada pelas gargalhas, conversas jogadas fora e principalmente pela grandiosa amizade que você me proporcionou.

Agradeço também aos meus amigos, do CBI 2011, em especial ao Granola (Marco Aurélio), a pessoa mais calma deste mundo, Eric, o senhor dos peixes, ao Blue (Pedro Álvaro), o fissurado por insetos, à Gabi, que mesmo quietinha, sempre esteve junto. Meu obrigado por terem contribuído com a amizade, risadas, conversas, idas ao cinema, produção do X-AVC. Agradeço também à Mariana Barcoto, que sempre esteve em meu eterno grupo de trabalho, pela amizade construída ao longo dessa jornada.

Agradeço às minhas eternas e queridíssimas amigas de longa data, que, mesmo milhas e milhas longe de mim, sempre estiveram presentes em minha vida: Cássia Emilio, Luana Ruiz, e Haline Ceccato.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia, aos que estavam quando entrei e já não estão mais presentes: Silvinho, Ifê, Noemi, Samuel. Aos que ainda persistem, Paixão, Virgínia, Dani, Maria Carolina, Ana Paula, Caio, muito obrigada por contribuírem de alguma forma com a realização do meu trabalho e por tornarem meus dias no laboratório mais felizes. Agradeço também ao pessoal do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, por terem contribuído de alguma forma para a realização deste trabalho.

Ao PRH-05 (Programa de Formação em Recursos Humanos no Setor de Petróleo, Gás e Biocombustíveis) e à coordenação do programa, por me concederem a bolsa de iniciação científica e confiando em meu trabalho.

*“No man is an island, entire of itself, every man is a piece of the continent,
a part of the main”. - John Donne*

RESUMO

A busca de novas fontes de energia tem sido estimulada pela demanda crescente do mercado e o bioetanol é uma alternativa promissora para esta questão. A produção de etanol a partir de resíduos agroindustriais lignocelulósicos está sendo pesquisada em vários laboratórios do Brasil e do exterior. Os resíduos da agroindústria são formados, em grande parte, por fibra vegetal lignocelulósica, a qual é altamente resistente à degradação, dificultando a conversão dos componentes a monossacarídeos fermentescíveis. Desta forma, a prospecção de micro-organismos que viabilizem a conversão de material lignocelulósico em etanol tem aumentado consideravelmente. Sendo assim, o estudo de micro-organismos associados às formigas cortadeiras, os quais são adaptados ao uso da biomassa lignocelulolítica, pode ser promissor para a descoberta de enzimas adequadas à degradação eficiente da fibra vegetal, podendo significar um passo adiante na produção do etanol de segunda geração. Neste trabalho analisamos a ação hidrolítica e a liberação de açúcares fermentescíveis por fungos dimórficos do gênero *Lecythophora* e de leveduras do gênero *Cryptococcus* sobre o material lignocelulósico. A metodologia empregada consistiu na inoculação das linhagens em diferentes resíduos da agroindústria, como bagaço de cana-de-açúcar, casca de café, casca de arroz e sabugo de milho triturado, seguida da quantificação dos açúcares redutores liberados, bem como da produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, como endoamilase, exoamilase, pectinase, endoglucanase, exoglucanase e xilanase. O gênero *Lecythophora* mostrou-se melhor produtor enzimático quando comparado com o gênero *Cryptococcus*, ambos em meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar. Ainda, foi realizado o inóculo de culturas mistas das melhores linhagens pertencentes ao gênero *Lecythophora*. A produção enzimática constatada indicou o potencial das linhagens do gênero *Lecythophora* em degradarem resíduos lignocelulósicos da agro-indústria. Os isolados W7 e W3a2, ambos do gênero *Lecythophora*, foram os que apresentaram melhores resultados em Unidades de enzima. mL⁻¹ em relação às atividades amilolítica e pectinolítica, evidenciando o uso potencial dessas linhagens em processos biotecnológicos.

Palavras-chave: Resíduos lignocelulósicos, enzimas lignocelulolíticas, monossacarídeos fermentescíveis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	08
2 OBJETIVO	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Micro-organismos utilizados nos ensaios	10
3.2 Preparo do meio, inoculação e obtenção de extrato enzimático	10
3.3 Determinação do crescimento e da viabilidade celular	11
3.4 Quantificação de açúcares redutores	11
3.5 Ensaio enzimático	12
3.5.1 Endoamilase e exoamilase	12
3.5.2 Pectinase	13
3.5.3 Exoglucanase (CMCase) e endoglucanase (CMase)	13
3.5.4 Xilanase	13
3.6 Concentração de sólidos solúveis totais (Grau BRIX)	14
3.7 Consórcio das linhagens	14
3.8 Hidrólise ácida e enzimática do bagaço de cana-de-açúcar	14
3.9 Análise estatística	15
4 RESULTADOS	15
4.1 Gênero <i>Cryptococcus</i>	15
4.1.1 Meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar	15
4.2 Gênero <i>Lecythophora</i>	16
4.2.1 Meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar	18
4.2.2 Meio suplementado com sabugo de milho triturado	18
4.2.3 Meio suplementado com casca de arroz	20
4.2.4 Meio suplementado com casca de café	22
4.3 Consórcio das linhagens	24
4.3.1 Consórcio em meio suplementado com bagaço de cana	25
4.3.2 Consórcio em meio suplementado com sabugo de milho triturado	26
4.3.3 Consórcio em meio suplementado com casca de arroz	27
4.3.4 Consórcio em meio suplementado com casca de café	28
4.4 Hidrólise ácida e enzimática do bagaço de cana-de-açúcar	29
5 DISCUSSÃO	30
6 CONCLUSÃO	32
7 REFERÊNCIAS	33

1. Introdução

O aumento da demanda por energia tem estimulado a busca por processos de produção mais eficientes e a diversificação das fontes para suprir tal demanda. O desenvolvimento econômico e industrial requer a busca de fontes renováveis de energia que possam substituir ao petróleo; nesse sentido, o bioetanol e o biodiesel vêm despertando interesse mundial (SILVA et al, 2009).

Dentre as maiores fontes de carbono e energia renovável encontram-se os materiais lignocelulósicos, os quais incluem resíduos como palhas, bagaços e cascas, originados a partir de atividades da agroindústria (DIAS et al., 2009).

De acordo com Laufenberg, et al. (2003), os resíduos lignocelulósicos, tais como palha de arroz, espiga de milho, palha de café e bagaço de cana, podem conter substâncias de alto valor energético (açúcares fermentescíveis) e nutricional (vitaminas, ácidos orgânicos).

Devido à moagem de milhões de toneladas de cana de açúcar para obtenção do caldo a ser fermentado, grande quantidade de resíduo/bagaço é produzida, sendo que uma parte é vendida para a produção de energia, enquanto que a outra parte, mesmo podendo ser aproveitada para obtenção de mais biocombustível, é queimada para geração de energia elétrica. A geração simultânea de energia elétrica decorrente da queima do bagaço de cana deve apresentar um aumento significativo na matriz energética nacional (BRASIL, 2007).

Na cultura do arroz, a produção de resíduos está relacionada à casca, a qual corresponde a aproximadamente 22% do peso do grão de arroz bruto (WALTER & ROSSATO, 2010). A casca de arroz, rica em sílica, gera problemas de ordem ambiental, de saúde pública e econômica. Esses problemas se devem à difícil degradação, geração de produtos nocivos ao homem quando queimada e ao desperdício de um material que poderia gerar recursos adicionais ao produtor (SOUZA, 2012).

A produção de biocombustível à base de resíduos de casca do arroz pode resultar também em derivados como o óleo diesel e a parafina (ABIFINA, 2008).

A produção anual de café no Brasil é de aproximadamente dois milhões de toneladas (VALE et al., 2007). Durante a industrialização dos grãos de café, cerca de 50% da massa destes tornam-se resíduos de fabricação, os quais podem ser utilizados em processos para a obtenção de novos produtos a partir deles, visando sua valorização (TONACO et al., 2010).

Outro importante resíduo da agroindústria é o sabugo de milho, do qual são produzidos cerca de 10 milhões de toneladas/ano (CASTRO & PEREIRA Jr., 2009).

A biomassa lignocelulósica existente nos resíduos agroindustriais é formada, principalmente, por celulose, lignina e hemicelulose, as quais formam uma rede complexa e resistente. Esta composição resulta em materiais flexíveis, porém altamente resistentes o que dificulta a conversão dos componentes a monossacarídeos fermentescíveis. (CASTRO & PEREIRA Jr., 2009). Os resíduos lignocelulósicos, em sua grande maioria, possuem a seguinte composição: celulose (33-51%), hemicelulose (19-34%) e lignina (21-32%), sendo o restante constituído por cinzas (0-2%) e extrativos (1-5%) (ALMEIDA, 2007)

A prospecção e utilização de novas enzimas celulolíticas pode melhorar o quadro, tornando a utilização desse substrato economicamente viável, principal problema na produção de etanol lignocelulósico (MACEDO, 2008). Com a finalidade de viabilizar o pré- tratamento enzimático, a prospecção de micro-organismos que realizem a hidrólise do material vegetal desperta interesse. Os micro-organismos que compõem o jardim de fungos das formigas cortadeiras atuam sobre substrato vegetal fresco. Eles produzem compostos assimiláveis para as formigas e para eles próprios a partir da hidrólise do material vegetal cortado pelas operárias (PAGNOCCA et al., 2011a ; PAGNOCCA et al., 2011b; MENDES et al., 2011).

Melhorar o acesso aos açúcares presentes nas fibras vegetais existentes nos resíduos agroindustriais (substratos) para a produção industrial de etanol de segunda geração é a principal dificuldade encontrada para viabilizar economicamente a produção de etanol de segunda geração uma vez que essas fibras são de difícil degradação pela metodologia disponível atualmente. Se forem encontradas enzimas lignocelulolíticas mais eficientes,

provavelmente, teremos um avanço na etapa de preparação do material (RUBIN, 2008).

Pela natureza do substrato em que são encontrados, os micro-organismos associados às formigas cortadeiras são fortes candidatos à prospecção, quanto à produção de enzimas lignocelulolíticas.

2 Objetivos

Analisar a capacidade metabólica de micro-organismos pertencentes aos gêneros *Lecythophora* e *Cryptococcus*, depositados na Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP), Rio Claro, em degradar a biomassa de resíduos lignocelulósicos e que possam ser empregados futuramente como fonte de enzimas para a produção de biocombustíveis.

3 Material e Métodos

3.1 Micro-organismos utilizados nos ensaios

Os micro-organismos utilizados, sendo 11 isolados do gênero *Lecythophora* e 30 do gênero *Cryptococcus*, são provenientes da Central de Recursos Microbianos da UNESP, Rio Claro (CRM-UNESP). Tais linhagens foram previamente selecionadas como produtores de enzimas lignocelulolíticas (MELO et al., 2012; ARCURI et al., 2012).

As linhagens estão criopreservadas na CRM-UNESP a - 80 °C, em glicerol 15%. A reativação foi realizada em meio Ágar Sabouraud (Acumedia). As placas foram incubadas a 25 °C durante cinco dias, no escuro. Após o período de incubação, as linhagens foram transferidas para uma segunda placa contendo Agar Sabouraud (Acumedia) para checar a pureza. Tal checagem foi procedida examinando-se as características morfológicas das colônias e das células.

3.2. Preparo do meio, inoculação e obtenção de extrato enzimático.

Como substratos indutores da produção de enzimas lignocelulolíticas foram utilizados: bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz, casca de café e sabugo de milho, todos *in natura*, previamente lavados e triturados (GARCIA, 2011).

Frascos de polipropileno de 150 mL de capacidade contendo 2,5g bagaço de cana-de-açúcar e 10 mL de água destilada foram esterilizados a 120°C/15 minutos. O meio mineral contendo cada 500 mL: 0,4g de cloreto de cálcio dihidratado; 1,25mL de solução traço de sais (0,1 g de sulfato ferroso; 0,1 de cloreto manganoso; 0,1 g de sulfato de zinco em 100 mL de água destilada); 0,25 g de sulfato de magnésio. 1,0 g de peptona; 1,0 mL de Tween 80, foi esterilizado separadamente nas mesmas condições (HOU-RUI, 2009). Após o resfriamento, alíquotas de 25 mL do meio mineral foram adicionadas aos frascos contendo as 2,5 g de bagaço de cana-de-açúcar. Em seguida, os frascos suspensões celulares contendo, ao final, 10^6 células/mL, (SANHUEZA et al., 2007). Os frascos foram semeados em quintuplicata e incubados estaticamente, no escuro, a 25 °C, por 96 horas. Em seguida foram retiradas as alíquotas de 1,5 mL, as quais foram centrifugadas a 10000 rpm/15 minutos, obtendo-se o extrato enzimático. Os ensaios com o sobrenadante foram realizados em quintuplicata tendo meio mineral mais resíduo lignocelulósico sem inóculo como controle para verificar a produção das enzimas. Tal processo será posteriormente detalhado no item 3.5.

O mesmo procedimento foi adotado para os demais resíduos: casca de arroz, sabugo de milho e casca de café.

3.3 Determinação do crescimento e da viabilidade celular

O controle da viabilidade celular foi realizado pela coloração das células com azul de metileno (0,01g de azul de metileno, 2,00 g de citrato de sódio e água deionizada q.s.p. 100 mL), segundo Antonini (2004), e contagem em câmara de Neubauer (Bright-Line, Precicolor, HBG, Germany).

3.4 Quantificação de açúcares redutores

A quantificação de açúcares redutores foi determinada pelo método ADNS (ácido 3,5-dinitro-salicílico) (MILLER, 1959). Foram adicionados, em tubos de ensaio, 100 µL de extrato enzimático e 100 µL de ADNS. A solução resultante permaneceu sob banho fervente durante 10 minutos e ao término, adicionou-se 1,0 mL de água deionizada gelada. A leitura foi efetuada em espectrofotômetro modelo BEL – SP 1105 (SF 325NM) a 575 nm. A quantificação foi realizada através de uma curva de calibração, construída com intervalos de 0,0 – 2,5 mg/mL (com incremento de 0,625) de açúcar redutor a partir de uma solução padrão de 1 g/L de glicose.

3.5. Ensaios enzimáticos

Para determinação das enzimas produzidas foram realizados testes de hidrólise dos polissacarídeos de interesse (amido, carboximetilcelulose, celulose fibrosa, xilana e pectina) os quais foram usados como substratos. Os ensaios foram conduzidos de acordo com a metodologia adaptada de Ghose, (1987). Foram prospectadas as seguintes enzimas: endoamilase, exoamilase, pectinase, endoglucanase (CMase), exoglucanase (CMCase) e xilanase. Os ensaios foram realizados em quintuplicata e a partir dos resultados encontrados foi calculado a média e o desvio padrão.

3.5.1 Endoamilase e exoamilase

A atividade das amilases foi determinada utilizando como substrato uma solução de amido (Sigma-Aldrich) em tampão acetato, pH 5,0, na concentração de 0,5% para endoamilase e 1,0% para exoamilase. A solução de amido (80 µL), foi adicionada ao extrato enzimático (20 µL). Tal reação foi mantida a 25 °C, no escuro, durante 30 minutos. Após esse período, adicionou-se 100 µL do reagente ADNS (ácido 3,5-dinitro-salicílico) (MILLER, 1959). Em seguida, a reação permaneceu por 10 minutos em banho fervente. Após o banho-fervente, a reação foi interrompida adicionando-se 1,0 mL de água deionizada gelada, homogeneizando os ensaios. A absorbância foi medida em espectrofotômetro BEL – SP 1105 (SF 325NM) a 575 nm, utilizando-se 80 µL da solução de amido (0,5% ou 1,0%) e 20 µL do extrato enzimático em tempo reacional zero, como branco.

O cálculo da atividade enzimática foi efetuado por meio de uma curva de calibração, construída com intervalos de 0,0 – 5,0 $\mu\text{mol/mL}$ (com incremento de 0,625) de açúcar redutor a partir de uma solução padrão de 1,0 g/L de glicose. Nesse trabalho, uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de glicose por minuto de reação e por mL de extrato bruto.

3.5.2 Pectinase

A atividade de pectinase foi determinada utilizando como substrato o ácido poligalacturônico (Sigma-Aldrich, P-3889) (2,0 mg/mL de substrato em tampão acetato; pH 5,0). Uma unidade dessa enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de ácido D-galacturônico por minuto de reação e por mL de extrato bruto. O processo reacional, bem como leitura dos resultados foram realizados de acordo com o método descrito no item 3.5.1.

3.5.3 Exoglucanase (CMCase) e endoglucanase (CMase)

A quantificação da atividade de exoglucanase e endoglucanase foi determinada a partir da reação de 20 μL do extrato enzimático e 80 μL da solução de carboximetilcelulose (para exoglucanase) ou celulose microcristalina (para endoglucanase), ambos os substratos em concentração de 0,625 % (m/v) em tampão citrato, pH 6. O processo reacional ocorreu à 25 °C, durante 30 minutos, e após esse período, adicionou-se 100 μL de ADNS (MILLER, 1959). Após 10 minutos em banho fervente, adicionou-se 1,0 mL de água deionizada gelada para interromper a reação. A leitura dos resultados bem como a definição e quantificação da unidade de enzima, foi realizado de acordo com o método descrito no item 3.5.1.

3.5.4 Xilanase

Para a determinação da atividade de xilanase, foram adicionados 20 μL do extrato enzimático a 80 μL de solução de xilana *Sigma-X0502, from birch*

wood (2,0 mg/mL de xilana diluída em tampão fosfato 0,1M; pH 6,0). A reação foi realizada a 25 °C, durante 120 minutos e após esse período adicionou-se 100 µL do reagente ADNS (ácido 3,5-dinitro-salicílico) (MILLER, 1959). Após 10 minutos em banho fervente, para interromper a reação, adicionou-se 1,0 mL de água deionizada gelada. Foi efetuada a leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro BEL – SP 1105 (SF 325NM) a 575 nm. O branco utilizado para zerar a leitura do espectrofotômetro foi 20 µL do extrato enzimático a 80 µL de solução de xilana *Sigma-X0502, from birch wood*, em tempo reacional zero. Para essa enzima, o cálculo da atividade enzimática foi realizado através de uma curva de calibração, estabelecida com intervalos de 0,0 – 5,0 µmol/mL (com incremento de 0,625) a partir de uma solução padrão de 1,0 g/L de xilose. Nesse caso, uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol de xilose por minuto de reação e por mL de extrato bruto.

3.6 Concentração de sólidos solúveis totais (Grau BRIX)

Para avaliar a concentração de sólidos solúveis totais liberados após a inoculação das linhagens nos resíduos da agro-indústria, foi utilizado refratômetro manual portátil (BBL-614), adicionando cerca de 100 µL da amostra para leitura.

3.7 Consórcio das linhagens

As melhores linhagens produtoras de enzimas lignocelulolíticas (TO 375, TO 356, W7, W3A2 e LB 302.1) segundo a metodologia descrita em 3.5 foram selecionadas e inoculadas sob a forma de consórcio nos quatro resíduos da agroindústria (bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz, casca de café e sabugo de milho). Os procedimentos de inoculação e obtenção de extrato enzimático, bem como quantificação de açúcares redutores e ensaio enzimático, também foram realizados conforme descritos em 3.2, 3.4 e 3.5, respectivamente).

3.8. Hidrólise ácida e enzimática do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar foi tratado por processo de hidrólise ácida, a qual foi realizada em reator de hidrólise de 40L, em que o bagaço foi percolado com ácido sulfúrico (H_2SO_4) em uma razão de 100 mg de H_2SO_4 /g de matéria seca (bagaço de cana-de-açúcar) durante 20 minutos. Após este processo, o hidrolisado foi concentrado em concentrador a vácuo. A celulignina remanescente foi lavada e colocada para secar ao ar livre.

Após esse processo, foram utilizados 2,5g do resíduo remanescente (celulignina) da hidrólise ácida, e as etapas subsequentes, (preparo do meio, inoculação e obtenção de extrato enzimático), ocorreram conforme descrito no item 3.2. Foram inoculadas cinco linhagens, sendo elas: TO 375, TO 356, W7, W3A2 e LB 302.1, as quais foram previamente selecionadas, a partir dos resultados encontrados nos resíduos não tratados.

3.9 Análises estatísticas

O software PAST (HAMMER, 2001) foi utilizado como ferramenta para a análise estatística. Em todas as análises foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, após verificar a normalidade e a variância dos dados. Tal análise baseia-se em variância não paramétrica, não assumindo distribuição normal, porém, assume distribuição de forma igualitária para todos os grupos. Os dados foram avaliados separadamente, entretanto sempre entre dois grupos, sendo um deles a amostra (alíquota contendo inóculo após incubação) e um sendo o controle (alíquota sem inóculo).

4. Resultados

4.1 Gênero *Cryptococcus*

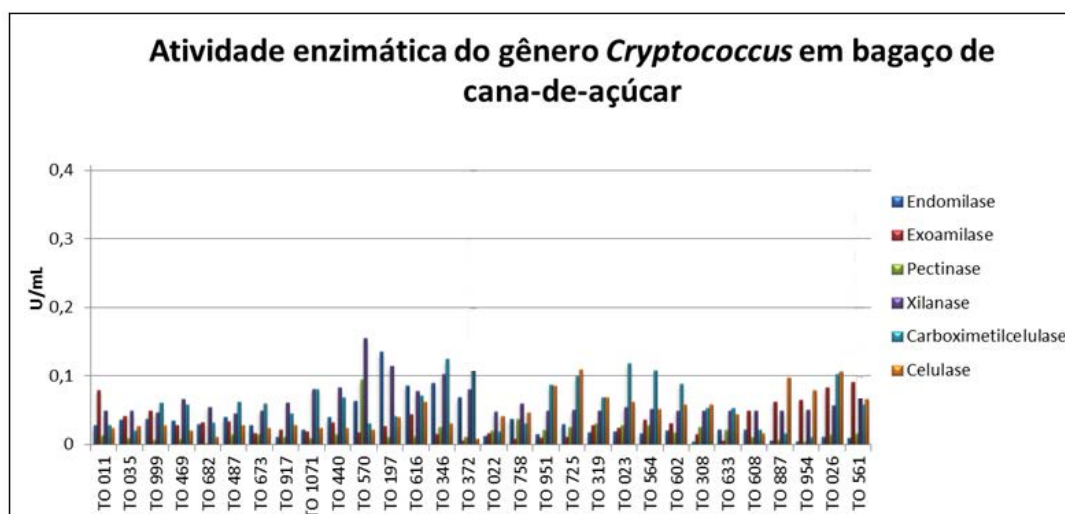
4.1.1 Meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar

Entre os trinta isolados do gênero *Cryptococcus*, apenas dois (TO 197 e TO 346) aumentaram significativamente ($p < 0,05$) a concentração de açúcar redutor no meio contendo bagaço de cana-de-açúcar bruto. Os demais consumiram os eventuais monossacarídeos resultantes do processo de

esterilização (autoclavagem), o que nos permite concluir que não conseguiram liberar monossacarídeos a partir do substrato lignocelulósico. Com relação ao Grau Brix, nove isolados aumentaram significativamente ($p < 0,05$) a concentração de sólidos solúveis totais. Ao observar os valores de crescimento após o período de incubação, é possível inferir que, ao consumirem os açúcares residuais disponíveis no meio, foi possível que os isolados mantivessem o crescimento e a viabilidade celular.

Os valores de atividade máxima em U.mL^{-1} , encontrados no gênero *Cryptococcus* inoculado em bagaço de cana-de-açúcar, foram os seguintes: xilanase = $0,155 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,142$ (TO 570); endoamilase = $0,135 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,051$ (TO 197); carboximetilcelulase = $0,125 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,046$ (TO 346); celulase = $0,109 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,112$ (TO 725); pectinase = $0,095 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,006$ (TO 570) e exoamilase = $0,0251 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,023$ (TO 564). Na Figura 1 é possível observar os valores médios em U.mL^{-1} obtidos para a atividade enzimática.

Figura 1. Valores da atividade enzimática (U.mL^{-1}) do gênero *Cryptococcus* inoculado em bagaço de cana-de-açúcar



4.2 Gênero *Lecythophora*

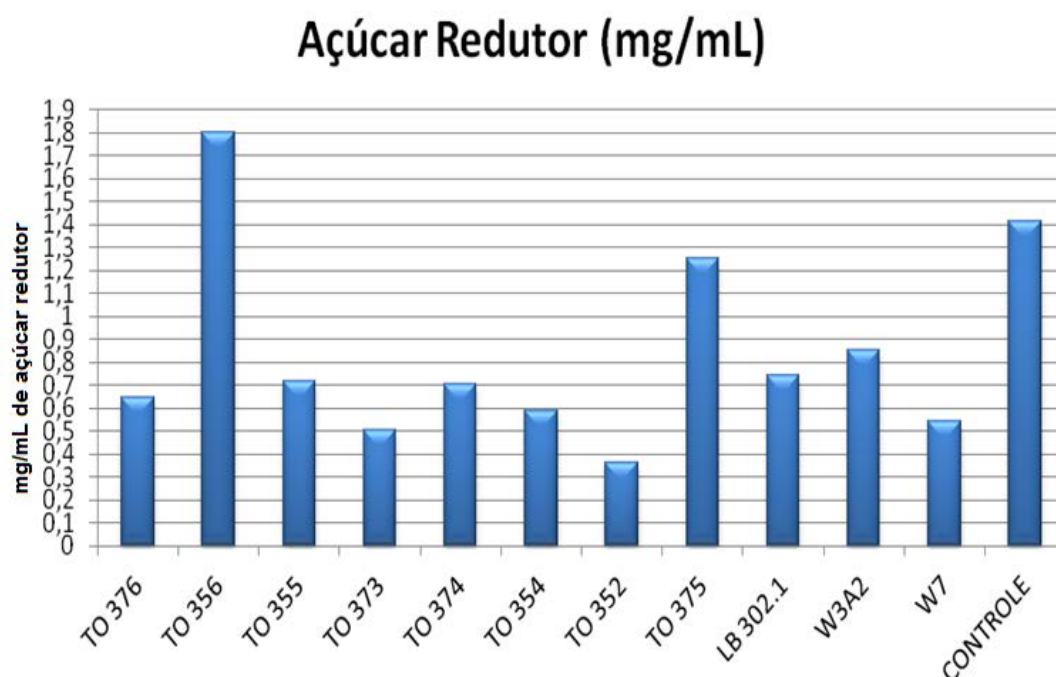
4.2.1 Meio suplementado com bagaço de cana

Após o período de incubação foi confirmado que todos os fungos se multiplicaram durante a incubação, uma vez que a contagem de células viáveis superou a densidade celular inicial.

Dos onze isolados do gênero *Lecythophora*, nenhum aumentou significativamente ($p < 0,05$) a concentração de açúcares redutores no meio suplementado com o bagaço de cana-de-açúcar, indicando que, ou esses monossacarídeos não foram produzidos ou, uma vez sendo produzidos, foram em seguida consumidos pelo fungo. Esta última hipótese provavelmente ocorreu com cinco (45%) dessas linhagens, pois a quantidade de açúcar redutor encontrada foi inferior ao controle (sem a presença do fungo), (Figura 2).

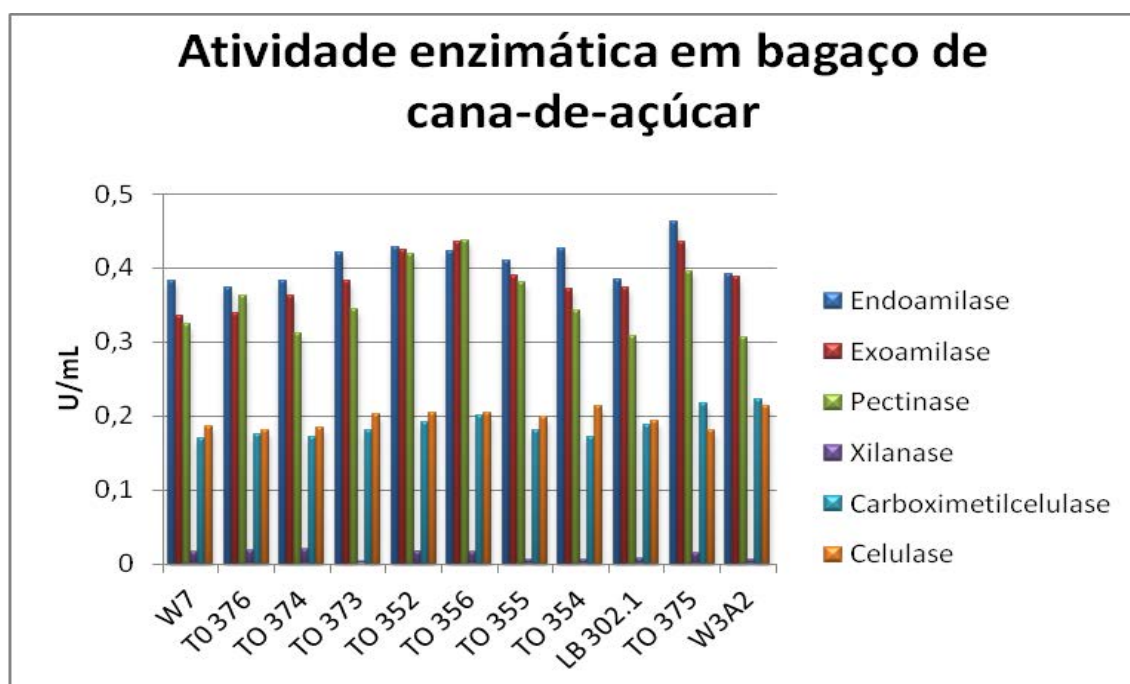
Em relação ao aumento da concentração de sólidos solúveis, com exceção de TO 376, todos os demais diferiram positivamente do controle, ou seja, houve aumento da concentração de sólidos solúveis totais medida através do grau Brix. No entanto, não houve alteração da concentração de açúcares redutores, sugerindo que podem ter atacado o substrato lignocelulósico e utilizado os produtos gerados. Esta hipótese é suportada pelo crescimento e viabilidade celular terem sido mantidos após o período de incubação.

Figura 2. Valores médios da liberação de açúcar redutor (mg/mL) dos fungos do gênero *Lecythophora* em meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar.



Os valores da atividade máxima em U.mL^{-1} , encontrados no gênero *Lecythophora* inoculado em bagaço de cana-de-açúcar para as enzimas testadas foram: endoamilase = $0,463 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,048$; pectinase = $0,437 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,148$ (TO 356); exoamilase com atividade máxima de $0,435 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,064$ (TO 375); carboximetilcelulase = $0,223 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,083$ (W3A2) ; celulase = $0,214 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,023$ (W3A2) e xilanase = $0,020 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,011$ (TO 374). Na figura 3 pode ser visualizado o desempenho médio enzimático de cada isolado em bagaço de cana-de-açúcar, atentando que os maiores valores de atividade enzimática se concentraram nas enzimas: endoamilase; exoamilase e pectinase.

Figura 3. Atividade enzimática (U/mL) do gênero *Lecythophora* em meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar



4.2.2 Meio suplementado com sabugo de milho triturado

Em meio suplementado com sabugo de milho triturado, todos os onze isolados do gênero *Lecythophora* diminuíram significativamente ($p < 0,05$) a concentração de açúcar redutor em relação ao controle sem inóculo. Provavelmente os isolados consumiram os monossacarídeos liberados durante o processo de autoclavagem. Ao analisar os valores de crescimento após o

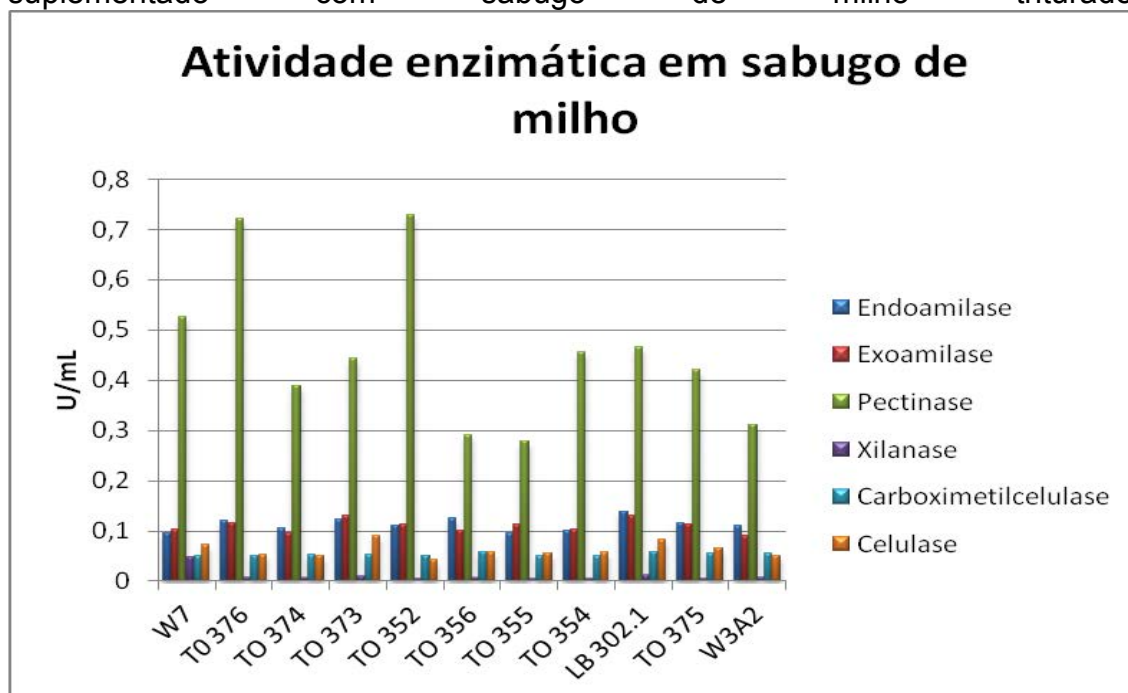
período de incubação, é possível inferir que todos os isolados mantiveram a viabilidade, podendo ter utilizado os açúcares residuais existentes no meio para o crescimento.

Em relação ao Grau Brix, quatro isolados diferiram positivamente do controle sem inóculo, aumentando a concentração de sólidos solúveis totais, embora sem alterarem a concentração de açúcares redutores, sugerindo que podem ter atacado o substrato lignocelulósico e utilizado os produtos gerados. Esta hipótese, assim como no inóculo em meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar é suportada pelo crescimento e viabilidade celular terem sido mantidos após o período de incubação.

Os valores da atividade máxima em U.mL^{-1} encontrados no gênero *Lecythophora* inoculado em sabugo de milho triturado para as enzimas testadas foram: pectinase = $0,728 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,222$ (TO 352); endoamilase = $0,138 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,020$ (LB 302.1); exoamilase = $0,130 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,020$ (TO 373); celulase = $0,091 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,049$; carboximetilcelulase = $0,057 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,008$ e xilanase = $0,0096 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,004$.

Os isolados do gênero *Lecythophora* apresentaram menor produção do *pool* enzimático em meio suplementado com sabugo de milho em relação ao meio com bagaço-de-cana de açúcar. A figura 4 mostra a produção enzimática média de cada isolado em meio suplementado com sabugo de milho triturado, evidenciando também que a enzima que teve maior atividade enzimática nesse substrato foi a pectinase.

Figura 4. Atividade enzimática (U/mL) do gênero *Lecythophora* em meio suplementado com sabugo de milho triturado.



4.2.3 Meio suplementado com casca de arroz

Em meio suplementado com casca de arroz, dois dos isolados do gênero *Lecythophora* (W7 e W3A2), aumentaram significativamente ($p < 0,05$) a concentração de açúcar redutor em relação ao controle sem inóculo, indicando que podem ter liberado açúcar redutor por ação enzimática sobre o substrato.

Ambas as linhagens foram as que melhor se adaptaram ao substrato, produzindo uma biomassa celular expressiva (Tabela 1), indicando que também consumiram parcialmente os produtos de hidrólise gerados. Curiosamente, a linhagem W7 foi a que demonstrou maior produção de pectinase nesse substrato e a relação disso com a produção de açúcares redutores precisa ser melhor analisada.

Em relação ao grau Brix, sete isolados diferiram positivamente do controle, indicando que houve aumento da concentração de sólidos solúveis totais após o período de incubação. Tal aumento ocorreu concomitante ao crescimento celular; entretanto, os quatro isolados que não diferiram do controle em relação ao grau Brix cresceram mais e provavelmente utilizaram algum nutriente que não é detectado pela metodologia empregada, específica para detectar açúcares redutores.

Tabela 1. Crescimento e viabilidade celular do gênero *Lecythophora* nos diferentes resíduos.

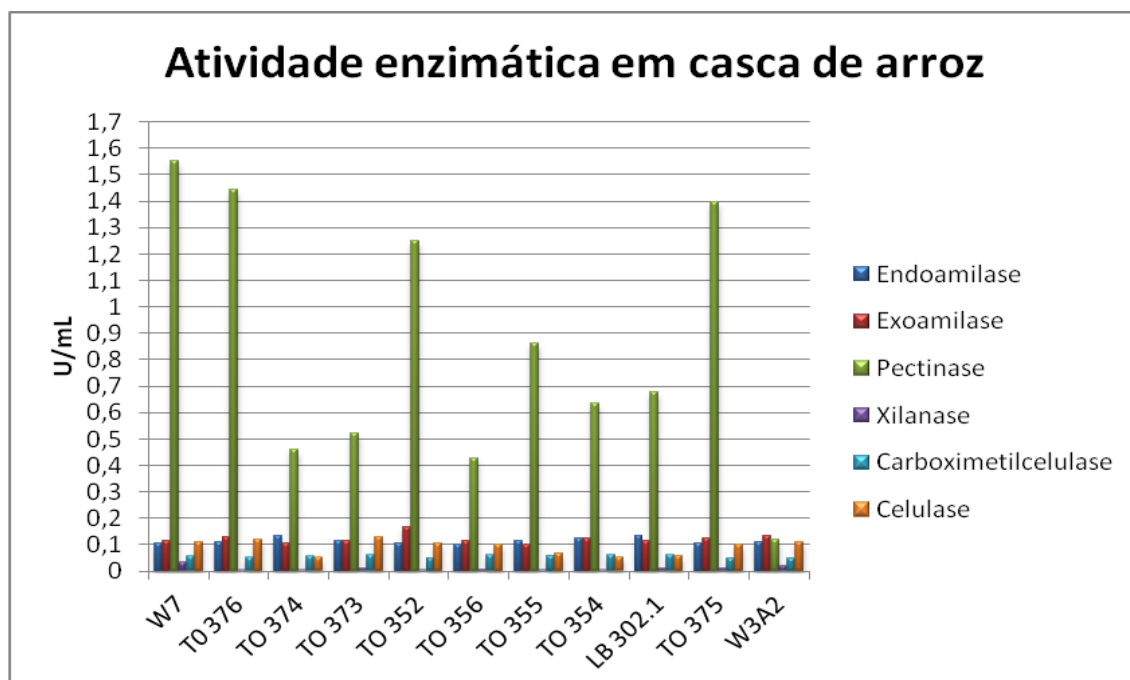
Isolado	Concentração celular 10^7 células/mL			
	Casca de arroz	Casca de arroz	Bagaço de cana	Sabugo de milho
W3A2	1,6	3,0	0,08	0,08
W7	1,1	3,6	0,1	0,07
LB 302.1	1,1	1,3	0,2	0,03
TO 354	0,6	0,5	0,09	0,08
TO 352	2,0	0,7	0,1	0,09
TO 373	1,8	0,6	0,1	0,1
TO 355	1,3	0,5	0,09	0,15
TO 375	0,6	0,5	0,1	0,08
TO 356	0,5	0,9	0,1	0,08
TO 376	0,8	0,3	0,08	0,05
TO 374	0,6	1,0	0,3	0,03

*Inóculo inicial igual a 4×10^4 células

Os valores da atividade máxima em Unidades de enzima.mL⁻¹ neste substrato (casca de arroz) foram: pectinase = $1,550 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,263$ (W7), exoamilase = $0,164 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,051$ (TO 352); endoamilase = $0,135 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,059$ (LB 302.1); celulase = $0,129 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,059$ (TO 373) ; carboximetilcelulase = $0,061 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,004$ (LB 302.1) e xilanase = $0,0188 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,006$ (W3A2).

Na figura 5 encontra-se a atividade enzimática média de cada isolado em meio suplementado com casca de arroz, mostrando que a maior atividade enzimática consistiu na pectinase. Porém, com relação às demais enzimas (endoamilase, exoamilase, xilanase, carboximetilcelulase e celulase,) os isolados inoculados em casca de arroz tiveram baixa atividade enzimática quando comparados com os resultados obtidos nos outros substratos testados neste trabalho.

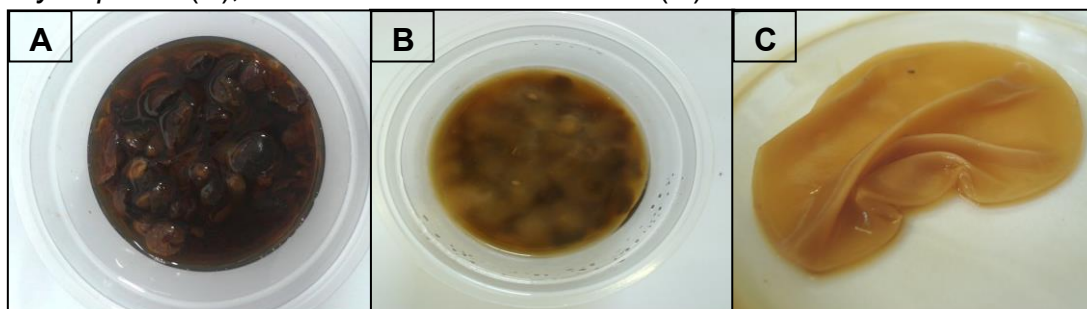
Figura 5. Atividade enzimática do gênero *Lecythophora* em meio suplementado com casca de arroz.



4.2.4 Meio suplementado com casca de café

Em meio suplementado com casca de café, três isolados (TO 373; LB 302.1 e W7) aumentaram significativamente a concentração de açúcar redutor. Na aferição do Grau Brix, dois isolados (LB 302.1 e W7) diminuíram significativamente a concentração de sólidos solúveis totais e ambos os isolados apresentaram elevado crescimento celular, sendo W7 com $3,6 \times 10^7$ células. mL⁻¹ e LB 302.1 com $1,4 \times 10^7$ células. mL⁻¹. Isto sugere que estes isolados podem ter atacado o substrato lignocelulósico e utilizado os produtos gerados para crescimento, fato sustentado pela elevada concentração celular observada após o período de incubação. Ao final do período de incubação, observou-se também que houve a formação de um consistente biofilme, possuindo cerca de 3 mm de espessura como pode ser visualizado na figura 6.

Figura 6. Meio de cultivo suplementado com casca de café (A); Meio de cultivo contendo biofilme após período de incubação: linhagem W7 do gênero *Lecythophora* (B); Detalhe do biofilme formado (C).



Os valores da atividade máxima em U.mL^{-1} encontrados no gênero *Lecythophora* inoculado em casca de café foram: exoamilase= $1,485 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,183$ (TO 376); pectinase = $0,974 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,077$ (TO 374); celulase= $0,810 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,061$ (TO 355); endoamilase= $0,369 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,239$ (W7); xilanase = $0,207 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,021$ (W3A2) e carboximetilcelulase = $0,193 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,073$. Na figura 7, podem ser visualizados os valores médios de cada isolado para cada uma das enzimas em meio suplementado com casca de café, onde se destacam a exoamilase e a pectinase.

Figura 7. Atividade enzimática (U/mL) do gênero *Lecythophora* em meio suplementado com casca de café.

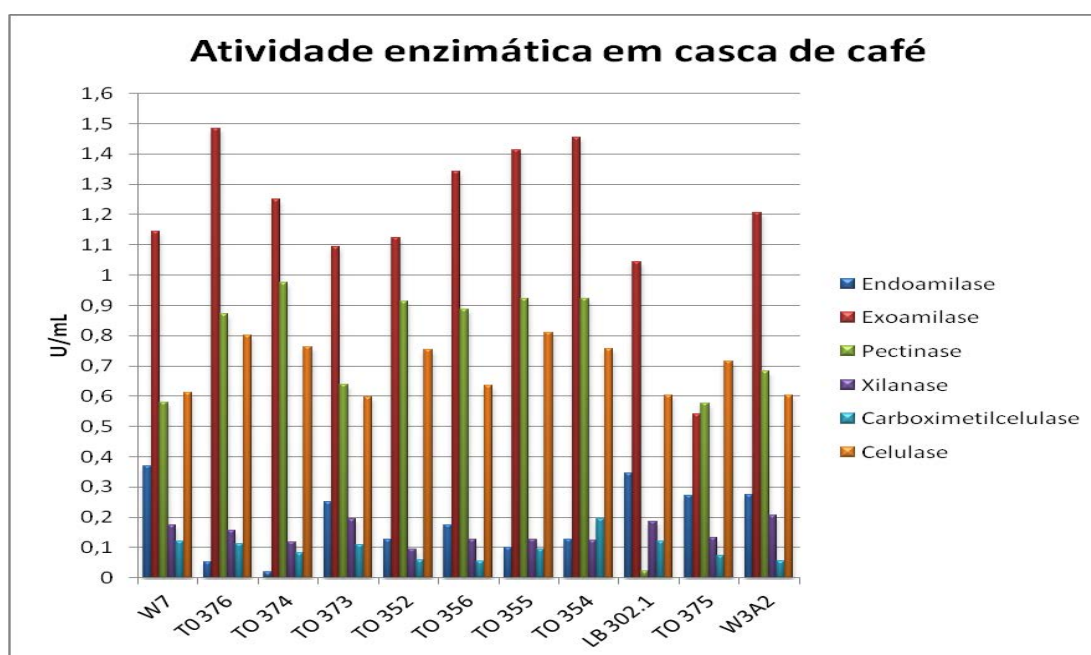
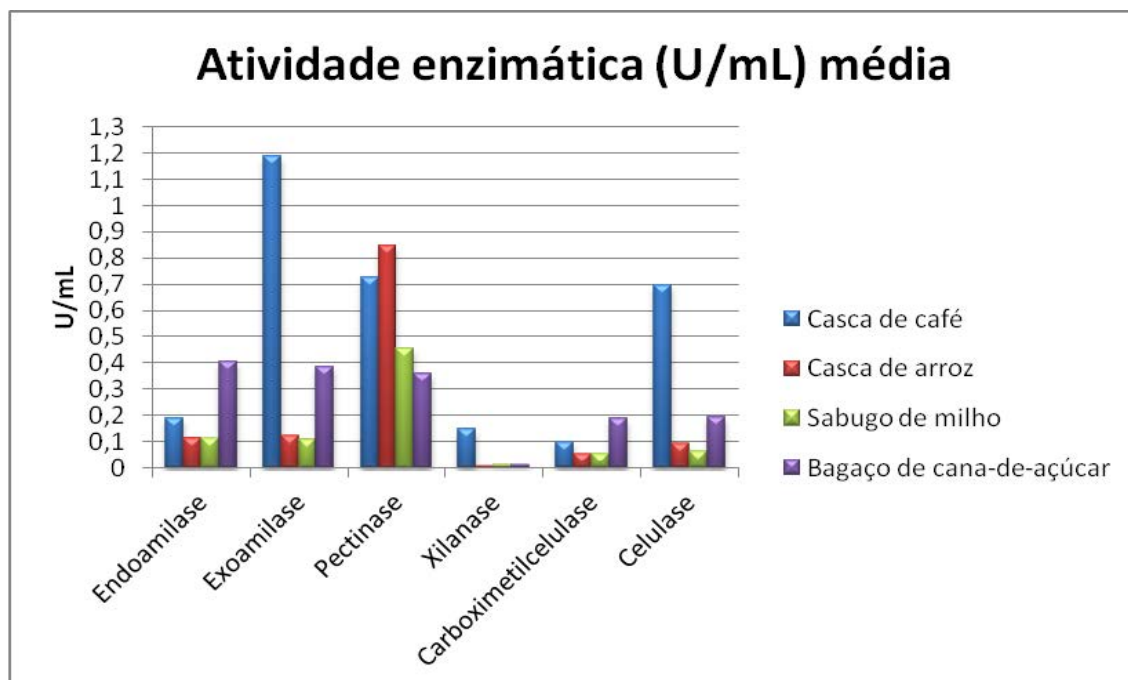


Figura 8. Valores médios da atividade enzimática (U.mL⁻¹) dos fungos do gênero *Lecythophora* em diferentes substratos lignocelulósicos.



Avaliando todos os substratos concomitantemente, nota-se que a casca de café foi a que melhor contribuiu para uma elevada atividade enzimática quando comparada os demais resíduos. Nota-se também que a pectinase foi a enzima que teve uma melhor atividade em todos os substratos utilizados.

Na figura 8 podemos observar os valores médios de unidades de enzima obtidos em cada um dos resíduos lignocelulósicos utilizados.

4.3 Consórcio das linhagens

O consórcio das linhagens do gênero *Lecythophora* foi realizado para avaliar se ocorreria o aumento da atividade enzimática de todas as enzimas analisadas nesse trabalho, bem como o aumento do açúcar redutor das alíquotas após o período de incubação.

As cinco linhagens selecionadas, sendo elas: TO 356, TO 375, W7, W3a2 e LB 302.1, resultaram em dez consórcios microbianos, sendo eles: TO 375 + LB 302.1; TO 375+ W7; TO 375 +W3A2; TO 375 + TO 356; LB 302.1 + W7; LB 302.1 + W3A2; LB 302.1 + TO 356; W7 + W3A2; W3A2 + TO 356.

Essas linhagens foram selecionadas analisando quais tiveram maiores

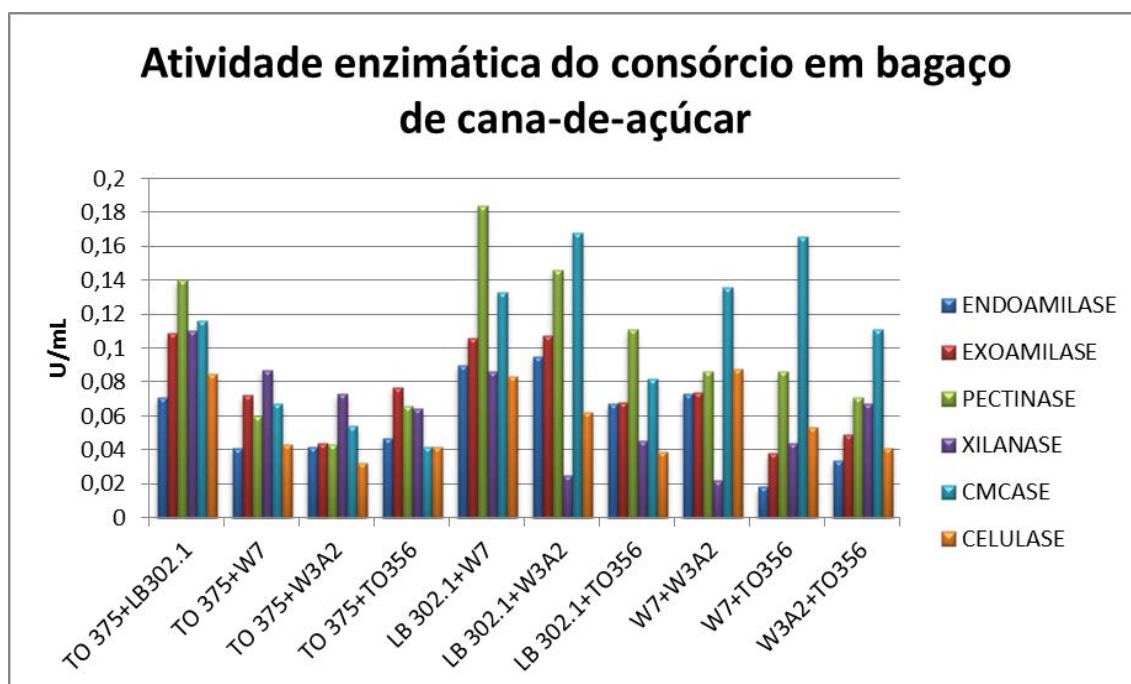
valores de Unidades de enzima produzidas nos quatro resíduos, a fim de obter um *pool* enzimático para melhor degradação do resíduo lignocelulósico.

4.3.1 Consórcio das linhagens em meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar

A análise dos dados, conduzida utilizando o software PAST, mostrou que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) ao comparar o açúcar redutor do controle (meio sem inóculo) com o açúcar redutor das alíquotas resultantes do consórcio em meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar.

Foi verificado também, que, com exceção da xilanase, a qual teve uma atividade enzimática de 0,110 U/mL no consórcio TO375+LB302.1, houve uma diminuição da atividade enzimática de todas as enzimas avaliadas, quando comparamos os resultados das culturas isoladas frente aos resultados dos consórcios (culturas mistas). Na figura 9 temos a representação dos valores de atividade enzimática em meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar.

Figura 9. Atividade enzimática do consórcio do gênero *Lecythophora* em meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar.

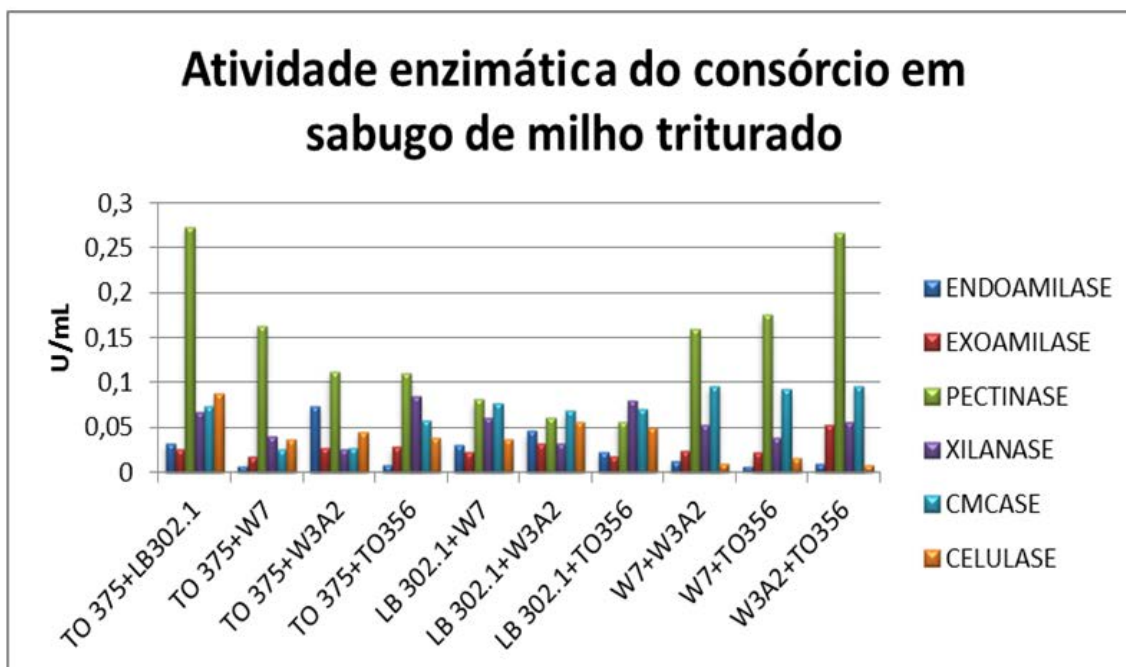


4.3.2 Consórcio das linhagens em meio suplementado com sabugo de milho triturado

O meio suplementado com sabugo de milho triturado teve cinco consórcios, sendo eles: TO375+LB302.1; TO375+W7; LB302.1+W7; LB302.1+W3A2; W7+TO356, que aumentaram significativamente ($p < 0,05$) a concentração de açúcar redutor quando comparados com o controle sem inóculo. O consórcio TO375+LB302, foi o que liberou maior quantidade de açúcar redutor (0,907mg/mL).

Entretanto, ao comparar a atividade enzimática do consórcio com a atividade enzimática das culturas sem estarem consorciadas, nota-se que não houve aumento da atividade enzimática de nenhuma das enzimas estudadas. Na figura 9, pode ser observado que, a maior atividade enzimática foi da enzima pectinase, a partir do consórcio TO375+LB302.1, com 0,273 U/mL. Esse consórcio também teve o melhor resultado nos açúcares redutores.

Figura 10. Atividade enzimática do consórcio do gênero *Lecythophora* em meio suplementado com sabugo de milho triturado.



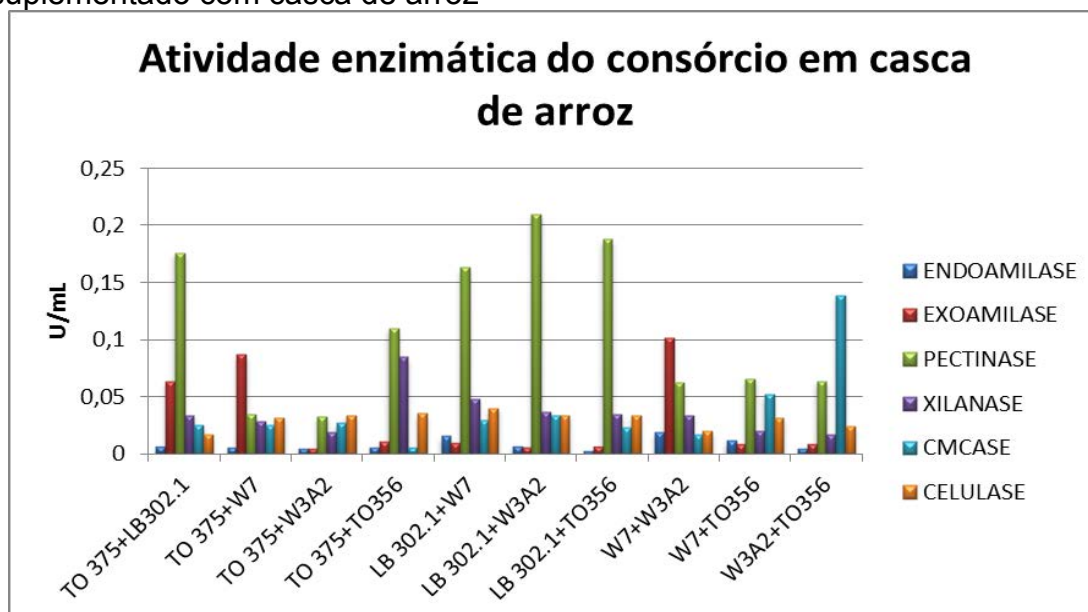
4.3.3 Consórcio das linhagens em meio suplementado com casca de arroz

Os consórcios inoculados em meio suplementado com casca de arroz, em sua grande maioria (5 consórcios), diferiram negativamente do controle ($p < 0,05$) ao analisar a concentração de açúcares redutores, indicando que estes consórcios consumiram os açúcares redutores que ainda estavam disponíveis no meio, utilizando tal recurso, provavelmente, para o aumento de biomassa, algo que foi constatado ao avaliar a viabilidade celular das amostras, que chegou a uma concentração final de $1,2 \times 10^7$ células. mL⁻¹ (Consórcio TO 356+W7). Os demais consórcios não apresentaram diferença significativa ao serem comparados com o controle (meio sem inóculo).

Com relação à atividade enzimática, uma enzima, a xilanase, apresentou aumento em sua produção a partir do inóculo do consórcio (LB302.1+W7) em casca de arroz. Tal atividade enzimática atingiu o valor de 0,048 U.mL (Figura 10), porém, tal valor não foi maior do que o alcançado pelo consórcio TO375+LB302.1 em bagaço de cana-de-açúcar. Nota-se a presença da linhagem LB302.1 em ambos os consórcios, podendo ela desempenhar alguma função no aumento da produção da xilanase a partir desses resíduos.

Nenhuma outra enzima apresentou aumento em sua produção nesse substrato.

Figura 11. Atividade enzimática do consórcio do gênero *Lecythophora* em meio suplementado com casca de arroz

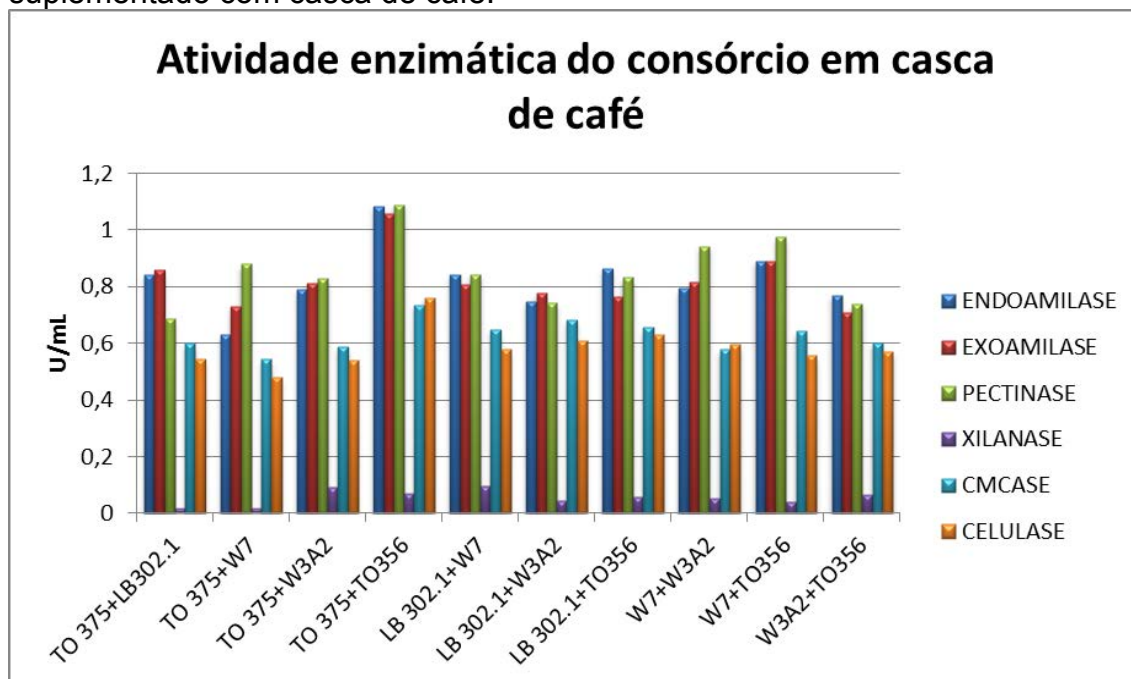


4.3.4 Consórcio das linhagens em meio suplementado com casca de café

O meio suplementado com casca de café não apresentou diferença significativa da concentração de açúcares redutores dos meios inoculados com consórcio em relação ao meio sem inóculo (controle). Porém, a partir da curva de calibração feita durante os experimentos, nota-se que este meio contém uma grande quantidade de açúcares redutores presente, sendo 3,094 mg/mL a maior concentração encontrada.

Com relação à atividade enzimática, o consórcio TO356+W3A2, entre linhagens do gênero *Lecythophora*, aumentou os valores de Unidades de enzima.mL⁻¹ em três das seis enzimas analisadas, quando comparadas com os melhores valores de atividade enzimática das linhagens sem estarem consorciadas em meio suplementado com casca de café. . As enzimas que tiveram aumento na atividade foram: endoamilase, com 1,084 U. mL⁻¹, pectinase, com 1,089 U mL⁻¹ e carboximetilcelulase, com 0,736 U.mL⁻¹, como pode ser visualizado na figura 12.

Figura 12. Atividade enzimática do consórcio do gênero *Lecythophora* em meio suplementado com casca de café.



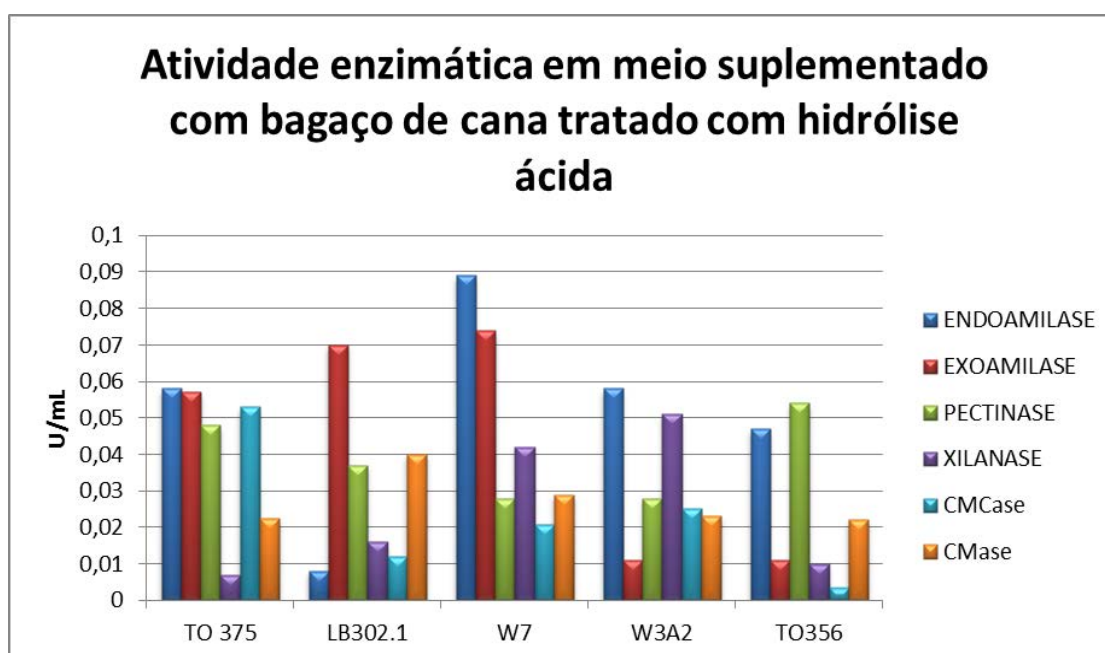
4.4 Hidrólise ácida e enzimática do bagaço de cana-de-açúcar

Os valores da atividade máxima em Unidades de enzima.mL⁻¹, encontrados no gênero *Lecythophora* inoculado em bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado foram: endoamilase = 0,089 U.mL⁻¹ ± 0,047 (W7); pectinase = 0,054 U.mL⁻¹ ± 0,0034 (TO 356); exoamilase com atividade máxima de 0,074 U.mL⁻¹ ± 0,003 (W7); carboximetilcelulase = 0,0250 U.mL⁻¹ ± 0,0078 (W3A2); celulase = 0,040 U.mL⁻¹ ± 0,039 (LB 302.1) e xilanase = 0,051 U.mL⁻¹ ± 0,021 (W3A2).

Com relação ao açúcar redutor, nenhuma das linhagens diferiu significativamente ($p < 0,05$) do controle, com exceção da linhagem W7, a qual diferiu negativamente. No entanto, todas as cinco linhagens tiveram um crescimento expressivo, sendo que a W7 foi a linhagem que apresentou o maior crescimento celular, chegando à 5.10^6 células. mL⁻¹. Tal evento nos permite inferir as linhagens foram capazes de degradar a celulignina, liberando monossacarídeos que foram utilizados para a sua própria nutrição e crescimento.

Na figura 13 pode ser visualizado o desempenho médio enzimático de cada isolado em bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado, atentando para o fato de que a enzima que apresentou maior atividade foi a endoamilase com 0,089 U/mL (W7).

Figura 13. Atividade enzimática (U/mL) do gênero *Lecythophora* em meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado



5. Discussão

O jardim de fungos encontrado em ninhos de formigas cortadeiras possui uma ampla fonte de enzimas lignocelulolíticas extracelulares, algo evidenciado nesse estudo e em estudos anteriores, como o de Carreiro (2000). Todas as linhagens avaliadas apresentaram alguma produção, mesmo que pouco expressiva, de enzimas lignocelulolíticas.

O gênero *Cryptococcus* não se mostrou um bom produtor enzimático quando inoculado no bagaço cana-de-açúcar, diante das condições experimentais utilizadas no presente estudo. Dessa forma, não foi dada continuidade aos experimentos utilizando linhagens desse gênero.

Dentre os resíduos agro-industriais utilizados, a casca de café foi aquele que proporcionou uma maior produção do *pool* enzimático e isso provavelmente ocorreu devido à elevada concentração de açúcares redutores, influenciando positivamente na produção das enzimas lignocelulolíticas extracelulares. Esses resultados estão de acordo com o trabalho de Blanco et al. (1999), o qual verificou que a elevada produção enzimática está intimamente relacionada com o crescimento do micro-organismo em elevadas concentrações de açúcares.

Ademais, os baixos valores enzimáticos também podem estar relacionados às condições de cultivo utilizadas, bem como a temperatura, pH, concentração do substrato e presença de outros compostos que podem influenciar os resultados. A obtenção de maiores valores de produção de enzimas pode ocorrer se esses e outros parâmetros forem otimizados (FLORENCIO, 2011).

A hidrólise enzimática é uma reação heterogênea, catalisada pelas celulasas, sendo diferenciada por um substrato insolúvel, sendo este o material lignocelulósico e um catalisador solúvel, o qual é representado pelas enzimas. A completa hidrólise da celulose requer a ação concomitante de inúmeras enzimas (celulasas) com diferentes especificidades ao substrato (CARVALHO, 2009). Dessa forma, foi realizado um consórcio (cultura mista) das melhores linhagens do gênero *Lecythophora*.

Em meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar, apenas uma enzima (xilanase) teve aumento na produção quando comparado com os inóculos de cultura pura no mesmo substrato e isso ocorreu pela associação de duas linhagens(TO375+LB302.1). O meio suplementado com sabugo de milho triturado não proporcionou o aumento da produção das enzimas avaliadas. A casca de arroz resultou no aumento de apenas uma enzima, sendo a xilanase, a partir do consórcio LB302.1+W7. Porém, tal aumento não foi maior do que a produção constatada no bagaço de cana-de-açúcar.

O melhor substrato para a indução da produção de enzimas lignocelulolíticas a partir das culturas consorciadas foi, mais uma vez, a casca do café, provavelmente por conter maior concentração de açúcar disponível, resultando no aumento da produção de enzimas (BLANCO, 1999). Apenas um dos consórcios (TO356+W3A2) apresentou aumento na produção de enzimas, sendo elas a endoamilase, a carboximetilcelulase e a pectinase, sendo que a pectinase foi a qual obteve maior produção com 1,089 U/mL.

Existem estudos desenvolvidos por Gutierrez-Correa e Tengerdy (1997) e Deshpande (2008) que utilizaram concomitantemente dois fungos filamentosos na produção de enzimas lignocelulolíticas a partir do bagaço de cana-de-açúcar, onde mostraram que houve aumento nas produções dessas enzimas com os fungos consorciados. Porém, os resultados encontrados em nosso trabalho não condizem em sua totalidade com os encontrados por Gutierrez-Correa e Tengerdy(1997) e Deshpande (2008) e isso provavelmente se deve às condições experimentais, sendo que Gutierrez-Correa e Tengerdy(1997) também suplementaram o meio de fermentação com farelo de soja, o que interferiu positivamente no resultado.

Em relação ao bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado quimicamente, o principal objetivo do pré-tratamento ácido com ácido sulfúrico foi solubilizar a fração hemicelulósica da biomassa a fim de facilitar a acessibilidade das enzimas hidrolíticas ao material polimérico (ALVIRA et al., 2010). Após a hidrólise ácida era esperada uma maior liberação de açúcares redutores . No entanto, os resultados obtidos foram menores daqueles obtidos no bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. Tal fato deve-se, provavelmente, às condições experimentais e determinados parâmetros como temperatura, pH e

concentração do substrato. Ainda, deve haver compatibilidade entre a escolha da tecnologia de pré-tratamento com a etapa de hidrólise enzimática, sendo que a relação entre composição do substrato, tipo de pré-tratamento, e dosagem enzimática possui grande influência sobre a degradação da biomassa lignocelulósica (KUMAR, et al, 2009).

Ao avaliar todos os resíduos, verificamos que as atividades amilolítica e pectinolítica foram as que se sobressaíram, principalmente em meio suplementado com casca de café e casca de arroz. Amilases possuem amplo uso na indústria textil, alimentícia e farmacêutica (SOUZA, 2010). Já as pectinases podem ser empregadas nas indústrias de suco, nutrição animal, degomagem de fibras, dentre outras aplicações (UENOJO, 2007). Dessa forma, as linhagens avaliadas nesse trabalho apresentam um elevado potencial biotecnológico.

6 Conclusões

Os isolados do gênero *Cryptococcus*, ao contrário do que era esperado, não apresentaram resultados satisfatórios no *pool* enzimático em meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar. Por outro lado, observou-se maior produção enzimática nos diferentes substratos com as linhagens do gênero *Lecythophora*.

O meio suplementado com casca de café foi o que proporcionou a obtenção de maiores valores de unidades de enzima.mL⁻¹ para todas as enzimas estudadas. Entretanto, nos experimentos de consórcio, independentemente do substrato, nem todos os consórcios de *Lecythophora* apresentaram um bom desempenho na produção enzimática, como era esperado. A partir disto, nota-se que testes de produção enzimática utilizando as linhagens do gênero *Lecythophora* em casca de café como substrato devem ser otimizados.

7 REFERÊNCIAS

ABIFINA: Associação Brasileira das Indústrias de Química Fina, Biotecnologia e suas Especialidades. Disponível em:<
<http://www.abifina.org.br/factoNoticia.asp?cod=271>>. Acesso em 24 fev. 2014.

ALMEIDA, J. R. M., et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.82, p.340-349, 2007.

ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.

ANTONINI, S. R. C. **Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2004.

ARCURI, S. L.; MELO, W. G. P.; NAGAMOTO, N. S.; PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A. Produção de enzimas por leveduras isoladas de bitus de *Atta sexdens rubropilosa*. In: XXI - ALAM Congresso Latino Americano de Microbiologia, 2012, Santos. **Anais...**, 2012.

BRASIL. **Matriz Energética Nacional 2030**. Ministério de Minas e Energia. Brasil, 2007.

CARREIRO, S. C. **Pesquisa de fator *Killer* e análise da degradação de polissacarídeos vegetais por leveduras associadas aos ninhos de *Atta sexdens***. 2000. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química nova**, v. 32, n 8, 2009.

CASTRO, A.M.; PEREIRA Jr, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2009.

DESHPANDE, S.K.; BHOTMANGE, M.G.; CHAKRABART, T.; SHASTRI, P.N. Production of cellulase and xylanase by *Trichoderma reesei* (QM 9414 mutant), *Aspergillus niger* and mixed culture by SSF of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). **Indian Journal of Chemical Technology**. v. 15, p. 449-456, 2008.

DIAS, M. O. S.; ENSINAS, A.V.; NEBRA, S. A.; FILHO, R. M.; ROSELL, C. E. V.; MACIEL, M. R. W. Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse: Integration to conventional bioethanol production process. **Chemical Engineering Research & Design**, v. 87, p. 1206-1216, 2009.

FLORENCIO, C. **Microrganismos produtores de celulases : seleção de isolados de *Trichoderma* spp.** 2011. 83 f.(Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, Sap Carlos, 2011.

GARCIA, A. P. C. **Desenvolvimento de um processo integrado de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana de açúcar.** 20º Programa de Bolsas de Verão da Universidade Federal do Paraná. 37 p. 2011.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GUTIERREZ-CORREA, M.; PORTAL, L.; MORENO, P.; TENDERDY, R.P. Mixed culture solid substrate fermentation on *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**. v. 68, p. 173-178, 1999.

HAMMER, O., HARPER, D.A.T., RYAN, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**. Disponível em: < http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>. Acesso em nov. 2013.

KUMAR, R., MAGO, G., BALAN, V., WYMAN, C.E. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. **Bioresour. Technol.** v.100, p. 3948–3962, 2009.

LAUFENBERG, G. Transformation of vegetable waste into added products: the upgrading concept; practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, p.167-198, 2003.

MACEDO, H. “**III Workshop Tecnológico sobre: Hidrólise para Produção de Etanol**”. Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas. 2008.

MELO, W. G. P., et al . Degradação de polissacarídeos vegetais por leveduras isoladas de ninhos de *Acromyrmex balzani* (Hymenoptera: Formicidae). In: XV – ALAM Congresso Latino Americano de Microbiologia, 2012, Santos. **Anais...**, 2012

MENDES, T. D., et al. Generation of nutrients and detoxification: possible roles of yeasts in leaf-cutting ant nests. **Insects**, Postfach, v. 3, n. 1, p. 228-245, 2012.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the production of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, Washignton, v. 31, n. 3, p. 426-620, 1959.

PAGNOCCA, F. C.; MASIULIONIS, V.E. AND RODRIGUES, A. . “Specialized fungal parasites and opportunistic fungi in gardens of attine ants”. **Psyche: A Journal of Entomology**, vol. 2012, p 1-10, 2011.

PAGNOCCA, F.C. ; RODRIGUES, A. R.; BACCI JUNIOR, M. Microrganismos associados à agricultura das formigas cortadeiras. in “**Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo**”. Della Lucia, T. (ed). Editora da U.F.Viçosa, MG. 2011.

RODRIGUES, R. S. **Produção de enzimas e avaliação do pré-tratamento ácido de biomassas para produção de bioetanol**. 2009. 81 p. Dissertação apresentada a Universidade Federal de Viçosa, para obtenção do título de *Magister Scientiae*. Viçosa, Minas Gerais, 2009.

RUBIN, E.M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v.454. p.841-845, 2008.

SANHUEZA, R. M.V.; MELO, I. S (Ed.). **Métodos usados no biocontrole de fitopatógenos**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2007. p. 109-115.

SILVA, W.F.; AGUAR, D.A.; RUDORFF, B.F.T.; SUGAWARA, L.M.; AULICINO, T.L.I.N. Análise da expansão da área cultivada com cana-de-açúcar na região Centro-Sul do Brasil: safras 2005/2006 a 2008/2009. In: **Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, nº 14, 2009, Natal. Anais XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto Natal, Brasil, 25-30 abril 2009, INPE, p. 467-474.

SOUZA, J.T. **Aproveitamento da casca de arroz para fabricação de chapas aglomeradas**. 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Tecnologia da Madeira, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

SOUZA, P. M. ; OLIVEIRA- MAGALHÃES, P. Application of microbial amylase in industry. **Brazilian Journal of Microbiology** , v. 41, p. 850-861, 2010.

TONACO, I.A.; BOTREL, M.C.G.; RODRIGUES, B.O.; XAVIER, F.B.; CARNEIRO, R.H.C.; Utilização de casca de café como substrato para produção de mudas de *Eucalyptus urophylla*. In: **Semana de Ciência e Tecnologia do IFMG campus Bambuí**, n.3, 2010, Bambuí : IFMG, 2010.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M.. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388, 2007.

VALE, A.T.; GENTIL, L.V; GONÇALEZ, J.C.; COSTA, A. F. Caracterização energética e rendimento da carbonização de resíduos de grãos de café (*Coffea arabica*, L) e de madeira (*Cedrelinga catenaeformis*), Duke. **Revista Cerne**, Lavras, v. 13, n. 4, p. 416-420. 2007.

WALTER, J.P.; ROSSATO, M.V. **Destino do resíduo casca de arroz na microrregião de restinga seca - rs: um enfoque à responsabilidade sócio ambiental**. Disponível em: < [HTTP://www.excelenciaemgestao.org/Portals/2/documents/cneg6/anais/T10_0261_1040.pdf](http://www.excelenciaemgestao.org/Portals/2/documents/cneg6/anais/T10_0261_1040.pdf)>. Acesso em 22 agosto 2014.