UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química – Araraquara
NuBBE - Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais

YVES CASSIANO ZUCHINI

Penicillium javanicum: avaliação preliminar de atividade enzimática para degradação de biomassa e estudo da produção de extratos com ação antifúngica.

Araraquara – SP
2024

Z94p

Zuchini, Yves Cassiano
Penicillium javanicum: avaliação preliminar de atividade enzimática para degradação de biomassa e estudo da produção de extratos com ação antifúngica / Yves Cassiano Zuchini. -- Araraquara, 2024
57 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Engenharia Química) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara
Orientador: Ian Castro-Gamboa

1. Biomassa. 2. Enzimas. 3. Antifúngico. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

YVES CASSIANO ZUCHINI

Penicillium javanicum: avaliação preliminar de atividade enzimática para degradação de biomassa e estudo da produção de extratos com ação antifúngica.

Trabalho de conclusão de curso apresentado Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Orientador: Ian Castro-Gamboa

Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente
gov.br
IAN CASTRO GAMBOA
Data: 25/12/2024 10:57:02-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Documento assinado digitalmente
gov.br
LIDIANE GASPARETO FELIPPE
Data: 26/12/2024 14:04:38-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Lidiane Gaspareto Felippe

Documento assinado digitalmente
gov.br
ISABELE RODRIGUES NASCIMENTO
Data: 26/12/2024 14:45:39-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Isabele Rodrigues Nascimento

Agradecimentos

Aos meus pais, Márcia Cassiano e Aldo Zuchini, minha irmã Melissa e meu cunhado Alexandre, por todo o apoio e preocupação, sempre me incentivando pelo caminho que eu escolhi.

Aos meus amigos, Bruna Borges, Giulia Machado (Gilda), Maria Fernanda (Clô), Pedro Tito e William Tonello, por todo o apoio durante os anos da graduação, por serem minha companhia nos bons momentos e por me darem força nos mais difíceis, não teria chegado tão longe sem vocês.

Aos professores do IQ que contribuíram para minha formação e conhecimento, em especial à professora Kelly por sempre abraçar e incentivar minhas ideias, sempre apontando o caminho certo a seguir.

Ao professor Ian, que acompanhou minha jornada desde o começo até o fim da minha graduação. Obrigado professor pela orientação, motivação, preocupação, carinho e principalmente pelos conselhos que me deu ao longo desses anos.

Aos amigos do NuBBE, que me acompanharam nos anos de pesquisa, que me ajudaram e me guiaram, Ana Letícia, Emanuel Vitor, Marcelino Santos, Lucas Henrique e Adriano Souza. De vocês, que muitas vezes dedicavam horas do dia para me ensinar ou que vinham no fim de semana para me ajudar, levo com imenso carinho tudo que aprendi.

À Dr. Juliana Rodrigues, ao Dr. João Luiz Bronzel Júnior e a Dr. Lidiane Gaspareto Felippe, pelo suporte, pela prestatividade e proatividade, por sempre encorajarem meus projetos e complementarem minha pesquisa. Agradeço também Vilma Pestana e Marquinhos, por todo auxílio nas mais diversas formas.

À Aglaete Araújo, Ana Clara Santos e Lucas Humberto Rezende., que fizeram parte da minha jornada por pouco tempo, mas que foram bons amigos e companheiros de laboratório.

À Profa. Dra. Rosane Guerra e ao Doutorando Josivan Regis, do Laboratório de Imunofisiologia (LIF) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), pela parceria e realização dos ensaios microbiológicos.

Ao Instituto de Química da UNESP-Ar e ao NuBBE. Agradeço também a FAPESP pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho: Processo nº 2023/04874-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Resumo

O crescimento populacional global representa um dos grandes desafios do século XXI exigindo uma maior produção de energia. Uma alternativa sustentável para suprir essa demanda é o aproveitamento da biomassa lignocelulósica. A conversão da lignocelulose em energia e combustível pode ser realizada por processos físicos, químicos e biológicos que decompõem essa biomassa em componentes mais simples. Os tratamentos físicos e químicos comumente utilizados são mais caros e menos favoráveis ao meio ambiente, tornando o tratamento biológico uma alternativa mais sustentável e economicamente viável, com potencial para a produção de biocombustíveis. Este estudo apresenta resultados preliminares sobre as atividades enzimática e antifúngica de extratos produzidos pelo fungo *Penicillium javanicum* em fermentação em estado sólido (FES) feita em uma mistura de bagaço-de-cana e farelo de trigo. Observamos que este microrganismo é capaz de produzir CMCase e β-glicosidase, enzimas cuja produção ainda não havia sido registrada na literatura para essa espécie, o que aponta para o potencial uso do fungo no tratamento de biomassas. Além disso, foi avaliado também a atividade antifúngica de extratos feitos a partir do crescimento em *Potato Dextrose Broth* (PDB) contra cepas padrão e clínicas de *Candida albicans*. A pesquisa nessa área contribui para a sustentabilidade e inovação, ao aproveitar recursos naturais com menos impacto ambiental, ressaltando ainda que os fungos também representam uma rica fonte de diversidade química que pode ser explorada na luta contra patógenos multirresistentes.

Palavras-chaves: biomassa lignocelulósica, produção de energia sustentável, atividade enzimática, propriedades antifúngicas

Abstract

Global population growth represents one of the greatest challenges of the 21st century, requiring increased energy production. A sustainable alternative to meet this demand is the use of lignocellulosic biomass. The conversion of lignocellulose into energy and fuel can be carried out by physical, chemical and biological processes that decompose this biomass into simpler components. The physical and chemical treatments commonly used are more expensive and less environmentally friendly, making biological treatment a more sustainable and economically viable alternative, with potential for the production of biofuels. This study presents preliminary results on the enzymatic and antifungal activities of extracts produced by the fungus *Penicillium javanicum* in solid-state fermentation (SSF) carried out in a mixture of sugarcane bagasse and wheat bran. We observed that this microorganism is capable of producing CMCase and β-glucosidase, enzymes whose production had not yet been reported in the literature for this species, which points to the potential use of the fungus in the treatment of biomass. In addition, the antifungal activity of extracts made from growth in Potato Dextrose Broth (PDB) against standard and clinical strains of *Candida albicans* was also evaluated. Research in this area contributes to sustainability and innovation by using natural resources with less environmental impact, highlighting that fungi also represent a rich source of chemical diversity that can be exploited in the fight against multidrug-resistant pathogens.

Keywords: lignocellulosic biomass, sustainable energy production, enzymatic activity, antifungal properties

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da celulose. 14
Figura 2 - Estrutura da hemicelulose 15
Figura 3 – Estrutura da lignina 16
Figura 4 - Estrutura da Lignocelulose 16
Figura 5 – Esquemático da estrutura da lignocelulose e as moléculas componentes 17
Figura 6 – Coluna de Lavagem 22
Figura 7 – Ilustrativo da redução do DNS ao seu análogo nitroamino 24
Figura 8 - Esquemática dos ensaios para a determinação de atividade enzimática da CMCase. 28
Figura 9 – Ilustrativo da clivagem do PNPG em p-nitrofenol 29
Figura 10 – Extratos obtidos e congelados 34
Figura 11 – Número de mol de glicose por absorbância 37
Figura 12 – Atividade da CMCase da Replica Biológica A – Com Desvio Padrão 42
Figura 13 – Atividade da CMCase da Replica Biológica B – Com Desvio Padrão 43
Figura 14 – Atividade da CMCase obtida de cada réplica biológica 43
Figura 15 – Média da atividade da CMCase 44
Figura 16 - Esquemática dos ensaios para a determinação da atividade enzimática de β-glicosidase 45
Figura 17 - Valores das soluções de *p*-nitrofenol para a curva-padrão 46
Figura 18 – Curva-padrão de *p*-nitrofenol 47
Figura 19 – Atividade da β-glicosidase de cada réplica biológica com Desvio Padrão 50
Figura 20 - Atividade Média da β-glicosidase com Desvio Padrão 51
Figura 21 - Porcentagens de inibição e redução em biofilmes maduros tratados com extratos de *P. javanicum* 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da casca do cacau 12
Tabela 2 – Composição da Lignocelulose na casca de cacau 13
Tabela 3 – Valores das soluções de glicose para a curva-padrão com DNS 26
Tabela 4 – Cepas de Referência testadas 30
Tabela 5 – Extratos de *Penicillium javanicum* 31
Tabela 6 – Tabela de dados granulométricos do bagaço de cana 33
Tabela 7 – Dados para cálculo do volume necessário de DNS 35
Tabela 8 – Valores de absorbância obtidos 36
Tabela 9 – Dados do ensaio preliminar para determinação do fator de diluição 38
Tabela 10 - Dados do ensaio preliminar para determinação do fator de diluição das referências 39
Tabela 11 – Dados de absorbância das amostras 40
Tabela 12 - Dados de quantidade de glicose das amostras medidas 41
Tabela 13 – Glicose gerada pela enzima e atividade enzimática 42
Tabela 14 – Dados de mols de *p*-nitrofenol e absorbância 46
Tabela 15 – Dados do ensaio de diluição feito com Água milli-Q® 48
Tabela 16 – Dados do ensaio de diluição feito com solução carbonato de Sódio 2M 48
Tabela 17 – Valores de Absorbância Obtidos de Cada Réplica 49
Tabela 18 – Quantidade de p-nitrofenol e atividade enzimática 49
Tabela 19 – Média da Atividade Enzimática das Réplicas Biológicas e Desvio Padrão 50
Tabela 20 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima dos Extratos de *P. javanicum* contra *C. albicans*. 52

Lista de Siglas e Abreviaturas

CBS	*Cocoa bean shell*, casca de amêndoa do cacau
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitório Mínima
CLSI	*Clinical and Laboratory Standards Institute*
CM	*Cocoa mucilage*, mucilagem do cacau
CMC	Carboximetilcelulose sódico
CPH	*Cocoa pod husk*, casca do cacau
DNS ou DNSA	Ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzóico
LIF	Laboratório de Imunofisiologia
MFC	*Minimum Fungicide Concentration*
MIC	*Minimum Inhibitory Concentration*
MOPS	Ácido 3-(N-morfolina) propanossulfônico
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NuBBE	Núcleo de Bioensaios Biossínteses e Ecofisiologia de Produtos Naturais
PBS	*Phosphate buffered saline* ou tampão fosfato-salino
PDB	*Potato Dextrose Broth*
pNP	4-nitrofenol ou *p*-nitrofenol
PNPG	4-nitrofenil-β-*D*-glucopiranósido
SDA	Ágar Sabouraud-Dextrose
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFMA	Universidade Federal do Maranhão

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12
1.1. CASCA DO CACAU 12
1.2. LIGNOCELULOSE E OS POLÍMEROS QUE A COMPÕEM 13
1.3. PRÉ-TRATAMENTO DA LIGNOCELULOSE 17
1.4. ENZIMAS 18
2. OBJETIVOS 20
3. METODOLOGIA ANALÍTICA 20
3.1. SELEÇÃO DE FUNGOS 20
3.1.1. Penicillium javanicum 20
3.2. COLUNA DE LAVAGEM EM LEITO FLUIDIZADO 21
3.3. AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA 23
3.4. DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES POR DNS 24
3.4.1. BREVE HISTÓRICO DO MÉTODO 24
3.4.2. PREPARO DO REAGENTE DNS 25
3.4.3. MARCHA ANALÍTICA E CURVA-PADRÃO 26
3.4.1. METODOLOGIA PARA ENSAIO PARA ATIVIDADE DA CMCASE 27
3.5. QUANTIFICAÇÃO DO COMPOSTO 4-NITROFENOL 29
3.6. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA 29
3.6.1. PREPARO DOS EXTRATOS 29
3.6.2. MICRORGANISMOS 30
3.6.3. PREPARAÇÃO DO INÓCULO 31
3.6.4. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) 31
3.6.5. CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (MFC) 31
3.6.6. BIOFILME 32
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES 32
4.1. ENSAIO ENZIMÁTICO 32
4.2. DETERMINAÇÃO POR DNS 35
4.2.1. PREPARO DO REAGENTE DNS 35
4.2.2. PREPARO DAS SOLUÇÕES SUBSTRATO 35
4.2.3. CURVA-PADRÃO DNS-GLICOSE 36
4.2.4. ENSAIO PARA ATIVIDADE DA CMCASE 37
4.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE β-GLICOSIDASE 44
4.3.1. PREPARO DA SOLUÇÃO SUBSTRATO 45
4.3.2. CURVA-PADRÃO DE *p*-NITROFENOL 45
4.3.3. ENSAIO PARA A ATIVIDADE DE β-GLICOSIDADE 47
4.3.4. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIFÚNGICAS 51
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS 54

1. INTRODUÇÃO

Muitas industrias geram biomassa como rejeito industrial, sendo essa muito utilizada para queima e geração de energia termina, entretanto o cacau (*Theobroma cacao L.*) em 2017, teve uma produção mundial estimada em 4,2 milhões de toneladas (BEG, AHMAD, *et al.*, 2017), sendo 85% deste valor composto por resíduos (HANDOJO, TRIHARYOGI e INDARTO, 2019). Os resíduos podem ser divididos em três classes, a casca do cacau (CPH, do inglês *cocoa pod husk*), a mucilagem (CM, do inglês *cocoa mucilage*) e a casca de amêndoa (CBS, do inglês *cocoa bean shell*) (MENDOZA-MENESES, FEREGRINO-PÉREZ e GUTIÉRREZ-ANTONIO, 2021).

A casca do cacau é composta por lignocelulose, um complexo dos polímeros: celulose, hemicelulose e lignina, que formam a estrutura principal das paredes celulares das plantas, podendo ser usada para a produção de biocombustível. Para tanto, é necessário realizar um pré-tratamento para que a estrutura seja degradada, e os compostos resultantes sejam fermentados (ARORA, NANDAL, *et al.*, 2020).

1.1. CASCA DO CACAU

A casca do cacau (CPH) tem a sua composição química apresentada na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1 – Composição da casca do cacau

Resíduo	Umidade (%)	Cinzas (g/100g)	Proteína (g/100g)	Gordura (g/100g)	Carboidratos (g/100g)	Referência
CPH	6,4 – 14,1	5,9 – 13,0	2,1 – 9,1	5,9 – 13,0	17,5 – 47	FIGUEROA, GARCIA e VEJA, 2019
	-	6,4 – 8,4	7 – 10	1,5 – 2	32 – 47	LU, RODRIGUEZ-GARCIA, *et al.*, 2018
	-	11,37	11,27	7,15	46,6	OLUGOSI O. A., 2019
	80,2	9,1	5,9	1,2	57,6	OLUGOSI O. A., 2019

Fonte: Adaptado de MENDOZA-MENESES, FEREGRINO-PEREZ e GUTIERREZ-ANTONIO, 2021.

A sua composição pode variar de acordo com o estágio de crescimento da planta, a região e o solo, mas é possível notar que a casca de cacau tem uma composição considerável de carboidratos.

A lignocelulose tem potencial de produção de energia derivado da composição heteromatriz, que é celulose, hemicelulose e lignina, variando em quantidade dependendo da

origem do material (KUCHARSKA, RYBARCZYK, *et al.*, 2018). Na Tabela 2 tem-se a composição de lignocelulose em diferentes amostras de CPH.

Tabela 2 – Composição da Lignocelulose na casca de cacau

Composto				Referências
Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Pectina (%)	
29,93	10,94	11,64	-	DARMAYANTI, AMINI, *et al*, 2019
23,04	38,08	18,19	-	ASIEDU, NEBA e ADDO, 2019
33,02	37	23,75	3,71	MEZA-SEPULVEDA, CASTRO, *et al*, 2021
23,8	8,2	33,4	6,9	SUSANTI, ALVIN e KIM, 2020
32	9,9	29,5	-	COSTA, SILVA, *et al*, 2020

Fonte: Adaptado de MENDOZA-MENESES, FEREGRINO-PEREZ e GUTIERREZ-ANTONIO, 2021.

Saber a composição da lignocelulose é importante, uma vez que quanto maior a quantidade de lignina, maior a recalcitrância da biomassa. Além disso, uma quantidade maior de celulose também é desejada, uma vez que quanto maior a quantidade de celulose, maior é a quantidade de açúcares teóricos que pode ser obtido da biomassa. Na Tabela 2, observa-se que a composição de celulose pode variar de 23% a 32%.

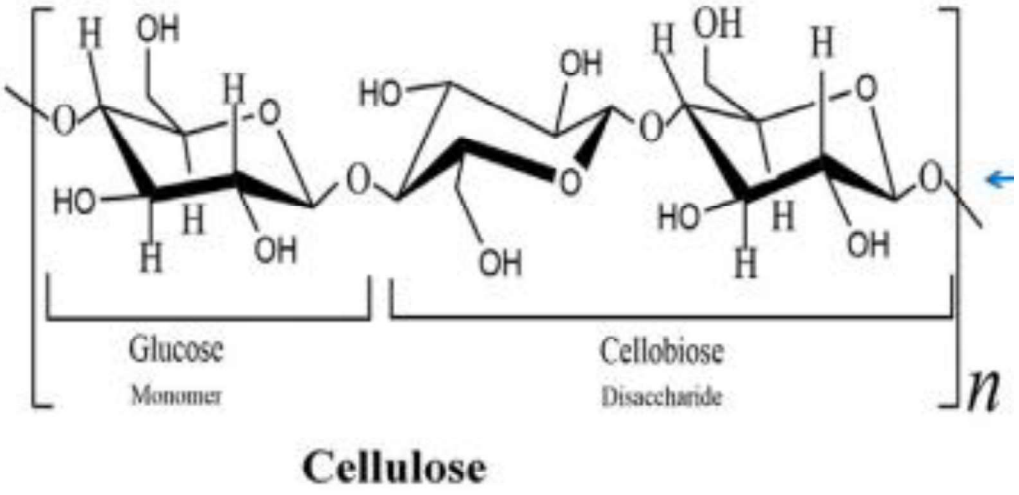
1.2. LIGNOCELULOSE E OS POLÍMEROS QUE A COMPÕEM

A lignocelulose é composta por dois polímeros de carboidratos e um polímero aromático, sendo eles a celulose, a hemicelulose e a lignina, respectivamente. A composição da lignocelulose varia de uma espécie de planta para outra, sendo que a composição também difere com a idade, estágio de crescimento da planta e condições de crescimento (SHARMA, XU e QIN, 2017).

A celulose é o material estrutural da parede celular e é composta por subunidades de D-glicose que são unidas por ligações β-1,4-glicosídicas. As cadeias de polissacarídeos não são ramificadas e são dispostas de forma paralela, formando então as microfibrilas de celulose, estas ligadas fortemente umas às outras por ligações de hidrogênio, permitindo uma estrutura

cristalina rígida ou amorfa. Além disso, cerca de 40-60% da lignocelulose é formada por celulose (SHARMA, XU e QIN, 2017). Na Figura 1, tem-se a estrutura da celulose.

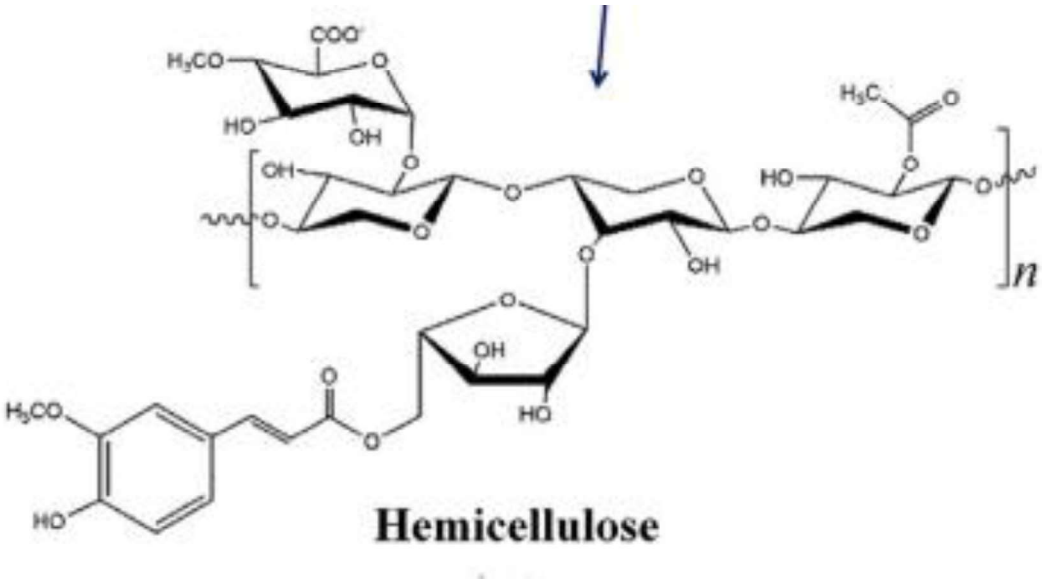
Figura 1 – Estrutura da celulose.



Fonte: Retirado de KUMAR, BHARDWAJ, *et al*, 2020.

A hemicelulose corresponde a cerca de 20-40% da lignocelulose, ela envolve as fibras de celulose e atua como um elo de ligação entre a celulose e a lignina (SHARMA, XU e QIN, 2017). A hemicelulose é um grupo heterogêneo de polissacarídeos ramificados, composta por diferentes monômeros, como a glicose, galactose, manose, xilose, arabinose e ácido glucurônico. A hemicelulose é facilmente hidrolisada por ácidos ou bases diluídas, bem como por enzimas (DHYANI e BHASKAR, 2018). A estrutura da hemicelulose é apresentada na Figura 2 a seguir.

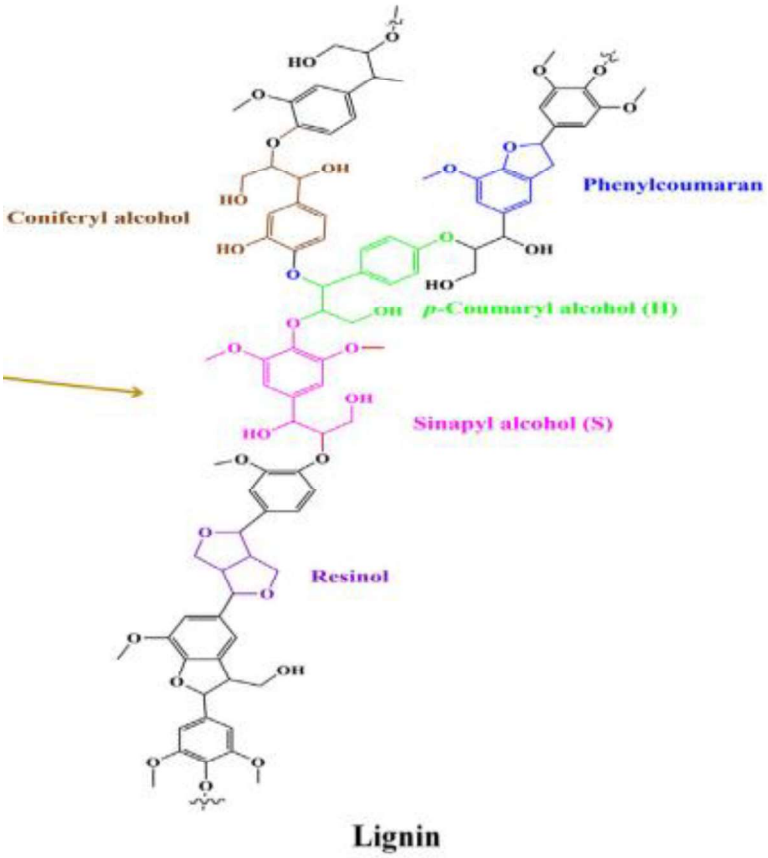
Figura 2 - Estrutura da hemicelulose



Fonte: Retirado de KUMAR, BHARDWAJ, *et al*, 2020.

A lignina é um heterobiopolímero amorfo complexo, insolúvel em água. A lignina é formada pelo acoplamento de três monolignóis: álcool trans-*p*-cumarílico, álcool transconiferílico e álcool transinapílico. Quando esses monômeros formam polímeros, as unidades fenilpropano se denominam *p*-hidroxifenil, guaiacil e siringil, sendo as unidades fenilpropanóides o principal gargalo da quebra da biomassa lignocelulósica, uma vez que esta fornece suporte estrutural, tal como impermeabilidade e proteção contra atividade microbiana. Além disso, a lignina compõe 10-24% da lignocelulose (SHARMA, XU e QIN, 2017). Na Figura 3 é representada a estrutura da lignina.

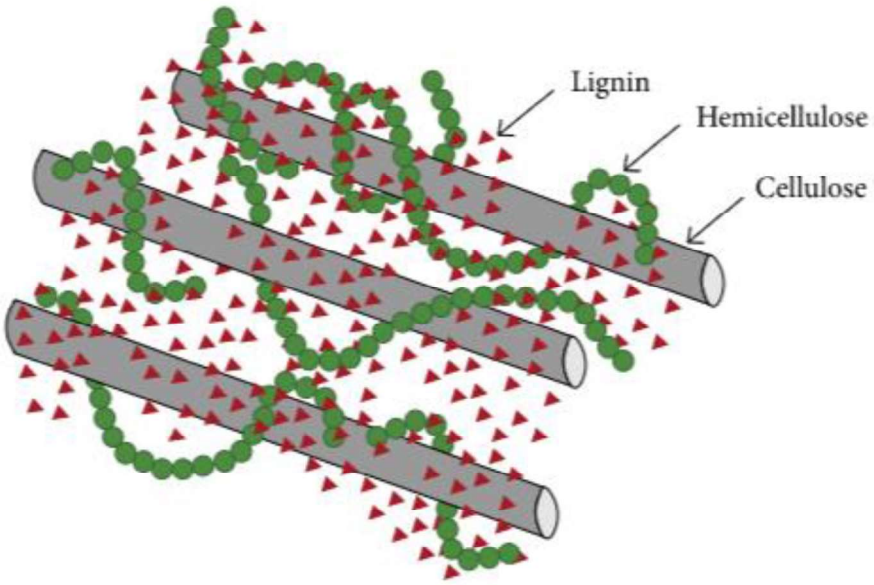
Figura 3 – Estrutura da lignina



Fonte: Retirado de KUMAR, BHARDWAJ, *et al*, 2020.

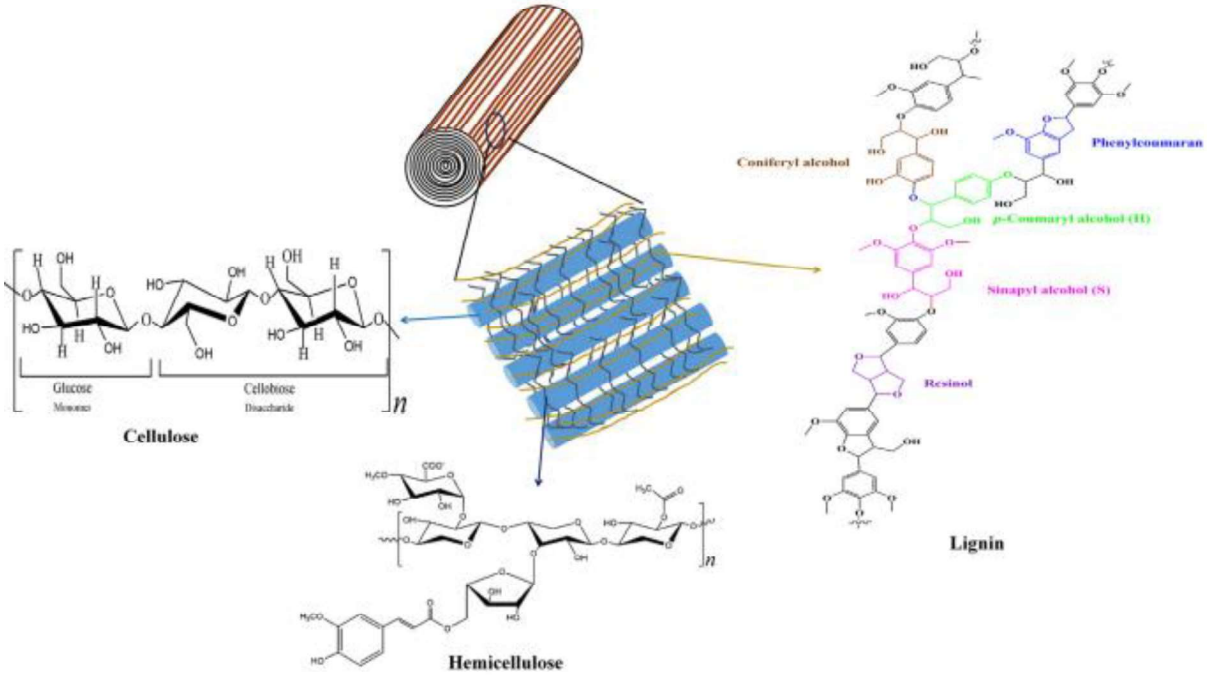
Na Figura 4 e na Figura 5, a estrutura da lignocelulose é representada.

Figura 4 - Estrutura da Lignocelulose



Fonte: Retirado de MENDOZA-MENESES, FEREGRINO-PEREZ e GUTIERREZ-ANTONIO, 2021.

Figura 5 – Esquemático da estrutura da lignocelulose e as moléculas componentes



Fonte: Retirado de KUMAR, BHARDWAJ, *et al*, 2020.

Na Figura 4 e na Figura 5, *Lignin*, *Hemicellulose* e *Cellulose*, são respectivamente, lignina, hemicelulose e celulose.

Devido ao teor de lignocelulose na CPH, é possível então produzir biocombustível (LU, RODRIGUEZ-GARCIA, *et al.*, 2018).

1.3. PRÉ-TRATAMENTO DA LIGNOCELULOSE

A biomassa de lignocelulose possui mecanismos químicos e estruturais complexos, que proporcionam uma resistência chamada de "recalcitrância da biomassa". Nestes, há a cristalinidade da celulose, a qual influencia na digestibilidade enzimática da biomassa, uma vez que as regiões altamente ordenadas são muito compactas, estas apresentam uma maior resistência as enzimas, ácidos e inchaço na água. Além disso, o grau de polimerização da celulose é uma indicação da recalcitrância da biomassa, quanto mais longa a cadeia com maior dificuldade ocorre a hidrólise da celulose. Outro fator a ser considerado é que a hemileculose atua como uma barreira física que limita a acessibilidade da enzima. Já a lignina confere recalcitrância da biomassa contra a hidrólise enzimática, impedindo o fácil acesso de enzimas ao polímero de carboidratos, adsorvendo as enzimas e desativando enzimas hidrolisantes (KUMAR, BHARDWAJ, *et al.*, 2020).

O pré-tratamento é uma etapa fundamental na conversão da biomassa de lignocelulose, assim, a escolha do tratamento influencia no custo geral e na configuração do processo (KUMAR, BHARDWAJ, *et al.*, 2020).

Nas últimas décadas, vários métodos de pré-tratamento foram identificados, avaliados e demonstrados em laboratório, piloto ou escala industrial (KUMAR, BHARDWAJ, *et al.*, 2020). Com isso, o tratamento da biomassa de lignocelulose pode ser dividido e classificados como métodos: físicos, químicos, biológicos e/ou uma combinação dos mesmos (SHARMA, XU e QIN, 2017).

O objetivo desses tratamentos é desintegrar a celulose, hemicelulose e lignina para que então os polímeros sejam convertidos em porções menores e fiquem disponíveis para hidrólise enzimática e outros processos para produção de vários produtos de valor agregado com alto rendimento (SHARMA, XU e QIN, 2017).

Cada método para tratamento apresenta vantagens e desvantagens. Os métodos físicos (como moagem e trituração), apesar de levarem à quebra mecânica da biomassa e a redução do tamanho da partícula, exigem muita energia e não são rentáveis (SHARMA, XU e QIN, 2017). Já o método químico, como aplicação de ácidos, álcalis, e outros, apresentam rápida ação, mas produzem substâncias tóxicas e necessitam de tratamento extra para recuperação de produtos químicos para sustentar o sistema (SHARMA, XU e QIN, 2017). O tratamento biológico, apesar de ser mais lento e apresentar maior dificuldade para controlar o sistema, este é o que apresenta um menor custo, requer um baixo consumo de energia, não necessita de produtos químicos e é ecologicamente correto (SHARMA, XU e QIN, 2017). O método biológico da degradação de biomassa de lignocelulose tem sido o menos investigado, isso é devido ao baixo significado industrial e ao atual progresso tecnológico limitado (SHARMA, XU e QIN, 2017).

O pré-tratamento biológico utiliza diferentes microrganismos, tais como fungos marrons, brancos e de podridão, ou mesmo produtos de base biológica, tal como enzimas, que degradam seletivamente a lignina e as hemiceluloses, resultando na sacarificação da biomassa e, em sequência, produção de bioetanol (KUMAR, BHARDWAJ, *et al.*, 2020).

1.4. ENZIMAS

As enzimas são proteínas que atuam catalisando reações químicas, elas são essenciais para o sistema metabólico dos organismos vivos e fundamentais na degradação de matéria

orgânica (ORLANDELLI, SPECIAN, *et al.*, 2012). A fim de produzir enzimas por fonte microbiológica, é necessário garantir que o meio em que o microrganismo se desenvolve contenha fontes de carbono, fontes de nitrogênio, micronutrientes (como extrato de levedura), elementos minerais (como fósforo, enxofre, potássio e outros) e elementos traços (como manganês, cobre, zinco e outros), sendo esse último responsável por constituir enzimas e coenzimas (ORLANDELLI, SPECIAN, *et al.*, 2012). Além disso, é necessária uma fonte indutora para a produção da enzima, assim, uma vez em que o microrganismo identifique a presença dessas substâncias, é iniciado o processo de produção da enzima responsável pela degradação das mesmas, como por exemplo amido para induzir amilases e carboximetilcelulose para celulases (ORLANDELLI, SPECIAN, *et al.*, 2012).

Em específico para biomassa lignocelulolítica, dentre as enzimas que a degradam, pode-se citar: a β-glicosidase (LEITE, ALVES-PRADO, *et al.*, 2008); a CMCase, ou carboximetil celulase (PEREIRA, MARQUES, *et al.*, 2015); a avicelase, ou exoglucanase (PEREIRA, MARQUES, *et al.*, 2015); a lacase (BUSWELL, CAI e CHANG, 1995); a manganês peroxidase (BUSWELL, CAI e CHANG, 1995); e a lignina peroxidase (BUSWELL, CAI e CHANG, 1995). Sendo as três primeiras atuando nas ligações da celulose, e as três seguintes na lignina.

1.5 IMPORTÂNCIA DA INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA

A investigação da atividade antimicrobiana de fungos derivados de produtos naturais tem se mostrado essencial para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, especialmente diante do aumento global da resistência a antibióticos convencionais. Fungos são reconhecidos pela sua capacidade de produzir metabólitos secundários com um vasto potencial bioativo, incluindo compostos com propriedades antimicrobianas (SURVAWANSHI, 2021) (KHAN, 2022). Esses metabólitos possuem uma gama de mecanismos de ação que podem ser empregados no tratamento de infecções bacterianas, fúngicas e virais, ampliando o arsenal terapêutico disponível (PEREIRA, 2023).

Além de possibilitar a descoberta de novos medicamentos, o estudo de fungos e seus derivados oferece uma oportunidade de identificar moléculas mais seguras e eficazes para a medicina clínica, com menor risco de efeitos adversos quando comparado a terapias tradicionais (ZAIDI, 2023). A exploração desses compostos provenientes de fontes naturais também contribui para a sustentabilidade na área farmacêutica, pois muitos desses fungos podem ser

cultivados e processados de forma a reduzir os impactos ambientais associados à síntese de medicamentos sintéticos (GOMEZ, 2022).

Portanto, fungos representam uma rica fonte de diversidade química, cuja exploração contínua pode desempenhar um papel crucial na luta contra patógenos multirresistentes, promovendo inovação terapêutica e avanços na medicina (NAYAK, 2022). A pesquisa nesse campo tem grande potencial para contribuir com soluções eficazes para desafios emergentes na saúde pública, incluindo infecções difíceis de tratar e resistentes aos tratamentos atuais.

2. OBJETIVOS

Avaliar a presença e a produção de enzimas específicas e o perfil de atividade enzimática do fungo *Penicillium javanicum*.

Avaliar a atividade antifúngica de extratos e metabólitos secundários do fungo *Penicillium javanicum*, obtidos com diferentes tempos de crescimento, frente às cepas de *Candida albicans*.

3. METODOLOGIA ANALÍTICA

3.1. SELEÇÃO DE FUNGOS

No pré-tratamento biológico, a celulose e a hemicelulose são hidrolisadas em açúcares monoméricos, isso ocorre por meio dos microrganismos celulolíticos e hemicelulolíticos (SHARMA, XU e QIN, 2017). Os fungos são bem conhecidos por seu efeito interativo na decomposição de resíduos lignocelulósicos por suas enzimas, a maioria destes produz várias enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e lignolíticas (SHARMA, XU e QIN, 2017). Várias espécies de fungos da podridão branca (basidiomicetos) degradam a lignina por meio da produção de peroxidases e lacases. Assim, dentre os fungos lignocelulolíticos, podem ser citados: os da espécie ascomicetos, como *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp. Trichoderma reesei*; os da espécie basidiomicetos, os de podridão branca, como *Schizophyllum sp.*, *P. chrysosporium*, e os de podridão parda, como *Fomitopsis palustres*; além de algumas espécies anaeróbicas como *Orpinomyces sp.* (SHARMA, XU e QIN, 2017).

3.1.1. Penicillium javanicum

Para a produção de celulases, foi selecionado o *Penicillium javanicum*. Este está disponível na micoteca do Núcleo de Bioensaios Biosíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE - IQAR), e foi selecionado pois é constatado na literatura que os fungos do gênero *Penicillum* produzem enzimas capazes de degradar biomassa lignocelulolítica (SHARMA, XU e QIN, 2017).

O gênero *Penicillium* é um dos clados fúngicos mais comuns, presente no mundo inteiro e com grande impacto nos mais diversos setores, como no de alimentos, processos biotecnológicos, estudos fitopatológicos e outros (BAZIOLI, 2017) (NUNES, 2023), e engloba cerca de 483 espécies (HOUBRAKEN, 2020) (NUNES, 2023).

A cepa do fungo *Penicillium javanicum* foi cedida pelo pesquisador MSc. Emanuel Victor dos Santos Nunes, doutorando do Departamento de Bioquímica e Química Orgânica do Instituto de Química/UNESP – Araraquara. O processo de coleta, isolamento e caracterização do fungo utilizado é descrito por Nunes (2023).

3.2. COLUNA DE LAVAGEM EM LEITO FLUIDIZADO

O processo para avaliar a produção de celulases (CMCase, avicelase e β-glicosidase) é descrito nos tópicos seguinte, entretanto, antes é necessário preparar os substratos para o crescimento do fungo.

Para o substrato foi utilizado bagaço de cana, resíduo das indústrias sucroalcooleiras da região de Araraquara, gentilmente doado pela Profª. Drª. Kelly Johana Dussán Medina, professora Assistente Doutor do Departamento de Engenharia, Física e Matemática do Instituto de Química/UNESP – Araraquara. Foi utilizado também farelo de trigo, adquirido em uma casa de rações em Araraquara.

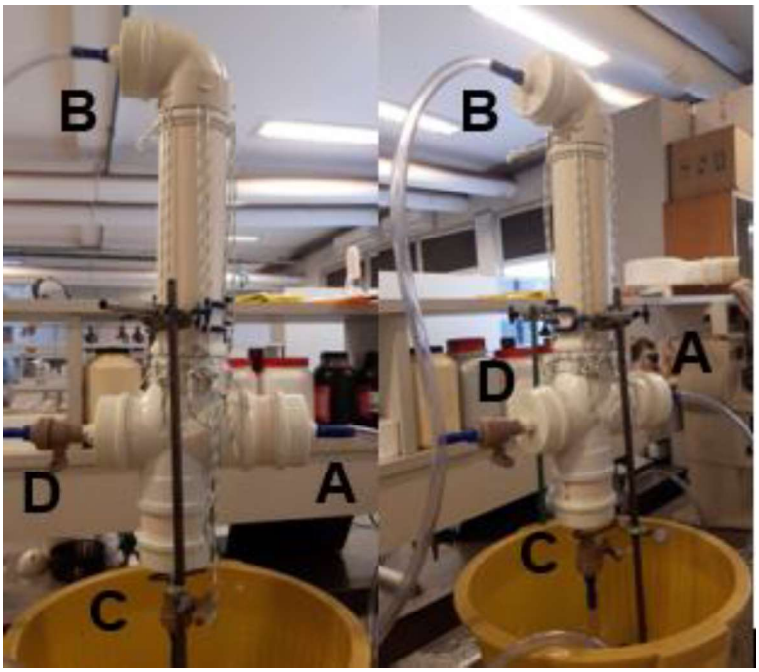
Para garantir a precisão no processo de produção enzimática, é essencial que os substratos sejam adequadamente limpos antes de seu uso. Tanto o bagaço da cana quanto o farelo de trigo devem ser lavados para eliminar completamente vestígios de glicose e amido, respectivamente. A presença de glicose e amido pode interferir adversamente na produção das enzimas alvo, atuando como inibidores. Além disso, quaisquer partículas de terra presentes, especialmente no bagaço da cana, precisam ser removidas. A terra, se não for retirada, pode constituir uma parte substancial do substrato, levando a uma leitura incorreta do peso. Esta etapa é crucial para assegurar que a pesagem reflita apenas o material desejado, sem a interferência de contaminantes.

Para a lavagem, inicialmente foi utilizado um sistema a vácuo de filtração, composto por um kitassato, um funil de büchner e papel filtro, acoplados a uma bomba. Entretanto o processo se mostrou inviável, uma vez que o volume de substrato a ser lavado é grande e entope o sistema de filtragem com muita facilidade, além de ser um processo muito demorado. Em seguida optou-se por realizar uma lavagem em bacia e filtração com uma peneira simples, mas

o processo também se mostrou muito demorado, em especial para o farelo de trigo, uma vez que é necessária uma grande sequência de lavagens para a remoção do amido, levando a um alto gasto de água e tempo.

Optou-se então por montar um sistema que consegue fazer uma lavagem contínua do material, e é capaz de operar sem maiores problemas, como o entupimento. Para tal, foi desenvolvida uma coluna de lavagem por leito fluidizado, apresentada na Figura 6 a seguir.

Figura 6 – Coluna de Lavagem



Fonte: O autor, 2024.

Na coluna, a água é introduzida pelo ponto de entrada marcado com a letra “A”. Esta água preenche o interior da coluna até atingir o ponto de saída “B”, que é o local por onde a água, agora carregada com amido, é expelida. Diretamente abaixo da saída “B”, encontra-se a região onde a torta (torta é o material que é retido dentro da coluna) é submetida à lavagem. Nesta área, a entrada contínua de água faz com que as partículas sólidas presentes na coluna sejam suspensas e entrem em estado de fluidização, ou seja, mantenham-se em movimento constante. Este movimento aumenta o contato entre as partículas e a água. A combinação da maior área de contato com a agitação resultante da fluidização facilita a separação e remoção do amido da torta.

A torta fica presa dentro da coluna por um sistema de filtros, que impende que o material de interesse saia da matriz principal (cano longo entre a cruzeta e o cotovelo). Essa matriz é

destacável, podendo ser removida manualmente para retirado do substrato e dos filtros. Já os filtros, que são dois, são compostos por 3 camadas (em cada ponta da matriz), a primeira de uma rede plástica inerte, que garante a resistência, a segunda de uma rede fina de tecido inerte que garante a filtração, e a terceira novamente de rede plástica inerte.

Já a saída "C" é usada para esgotar toda a água restante na coluna uma vez que o processo de lavagem tenha sido encerrado.

A entrada "D", que contém uma válvula, foi idealizada para realizar a secagem da torta. Uma vez que a torta tenha sido lavada, é necessário secá-la. A secagem ocorrerá por um soprador que foi gentilmente doado pelo departamento, entretanto ele não apresentou pressão o suficiente.

Foram associados os links dos vídeos públicos das primeiras iterações da coluna logo após a montagem:

TESTE 1

https://drive.google.com/file/d/1QVe97kjYsqGbbFuYVnNv53okwyE-Pfbh/view?usp=drive_link

TESTE 3

https://drive.google.com/file/d/1h6-E5fwc0fWENQSDGcwHLl2Kqnt9cFB5/view?usp=drive_link

TESTE 5

https://drive.google.com/file/d/1HcZRnq9XnH7OSWiYCRmcDO1Nvri35y9F/view?usp=drive_link

3.3. AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A avaliação de atividade enzimática se baseia em um método de determinação indireto, neste a enzima (contido no extrato bruto obtido em etapas anteriores) reage com um substrato específico, como por exemplo, o substrato avicel reage com a enzima avicelase e o substrato CMC reage com a enzima CMCase. Esses processos resultam em um produto específico e quantificável, sendo a quantificação feita por métodos colorimétricos. Os métodos utilizados para a quantificação das enzimas de interesse são descritos nos tópicos seguintes.

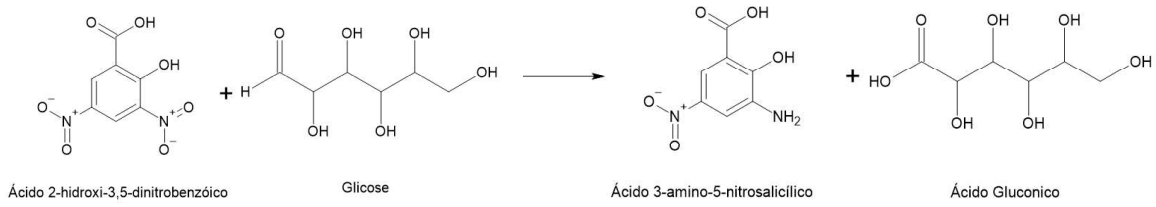
Na metodologia usada em (PEREIRA, MARQUES, *et al.*, 2015), tanto a CMCase quanto a avicelase reagem com seus respectivos substratos gerando glicose, a glicose então é quantificada pelo método de determinação de açúcares redutores usando o ácido 3,5-dinitrosalicílico, também referido como ácido DNS, DNS ou DNSA, desenvolvido por SUMNER, 1921.

Já no ensaio para a determinação da atividade da enzima beta-glicosidase, a enzima reage com o substrato 4-nitrofenil-β-D-glucopiranósido (PNPG), gerando o composto 4-nitrofenol (pNP) que pode ser quantificado seguindo a metodologia usada por LEITE, ALVES-PRADO, *et al*, 2008.

3.4. DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES POR DNS

O autor SUMNER, 1921 desenvolveu o método para a determinação de açúcares redutores para avaliar a urina de pacientes com diabetes e sem diabetes. O método se baseia na capacidade do ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzóico (DNS) ser reduzido pela glicose no composto nitroamino análogo, o ácido 3-amino-2-hidroxi-5-nitrobenzóico (ácido 3-amino-5-nitrosalicílico), o que é altamente colorido (VASCONCELOS, PINTO e ARAGÃO, 2013).

Figura 7 – Ilustrativo da redução do DNS ao seu análogo nitroamino



Fonte: O autor, 2024.

O composto absorve fortemente a luz, assim, sob as condições corretas de concentração, é possível estabelecer uma relação direta entre absorbância e a quantidade de açúcares redutores presentes (C., JASSO, *et al.*, 2010) (VASCONCELOS, PINTO e ARAGÃO, 2013).

3.4.1. BREVE HISTÓRICO DO MÉTODO

No método relatado por SUMNER, 1921, 1,0 ml de amostra é misturado com 1,0 ml de solução 2% de DNS e 2,0 ml de solução de NaOH 1,5%. A mistura é homogeneizada e aquecida por 5 minutos a 100 ℃, para em seguida ser resfriada e diluída a 25 ml. Após 3 anos de aperfeiçoamento, Sumner em 1924 introduziu tartarato duplo de sódio e potássio (chamado de sal de Rochelle) e alterou as quantidades de reagentes, também unificou em uma única solução

(SUMNER, 1924). Essas modificações tiveram 3 justificativas: I, de prevenir a destruição de parte das moléculas de açúcar pelo oxigênio que é dissolvido durante o processo de aquecimento; II, proporcionar o aumento da quantidade de cor gerada, o que por si proporciona uma melhor detecção de pequenas quantidades de glicose; e III, fazer com que o estoque do reagente possa ser feito por um período indeterminado (SUMNER, 1924) (VASCONCELOS, PINTO e ARAGÃO, 2013).

Já no ano seguinte, em 1925, Sumner propôs a adição de fenol, o que resulta na incrementação da quantidade de cor gerada pela glicose, aumento esse que pode chegar a 300% (SUMNER, 1925). Entretanto, a cor gerada na presença de fenol não apresenta estabilidade, quando em repouso, a qualidade da cor pode mudar em contato com o ar (SUMNER, 1925) (VASCONCELOS, PINTO e ARAGÃO, 2013).

Em 1934, Sumner utiliza o método de DNS para determinar atividade de invertase (também chamada de sacara ou β-D-fructo-furanosidio-frutohidrolase), que é uma enzima cujo substrato preferencial é a sacarose, resultando na sua hidrólise uma molécula de glicose e outra de frutose (SUMNER e HOWEL, 1934) (MOURA, PINTO e RODRIGUES, 2007). Nos anos seguintes o método foi aplicado também para determinação da atividade de outras enzimas (VASCONCELOS, PINTO e ARAGÃO, 2013).

Já neste trabalho, o método de determinação de açúcares redutores por DNS usado foi o apresentado pela EMBRAPA que se baseia na metodologia de Bernfeld apresentada em 1955 (VASCONCELOS, PINTO e ARAGÃO, 2013). Neste, a metodologia usa um volume de reagentes menor (o que reduz o passivo gerado) e não usa o fenol como reagente (VASCONCELOS, PINTO e ARAGÃO, 2013). O procedimento apresentado pela EMBRAPA é descrito a seguir, as modificações e variáveis adotadas são descritas no corpo do tópico 4.2.

3.4.2. PREPARO DO REAGENTE DNS

Para um volume final de 1 litro, 10 g de DNS são adicionados a 200 ml de uma solução de hidróxido de sódio 2 mol/l recém-preparada, denominada de solução A. Em paralelo, 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio são dissolvidos em 500 ml de água destilada sob aquecimento e agitação constantes, essa solução é denominada solução B. Nessas mesmas condições, a solução A é adicionada sobre a solução B até a completa dissolução do DNS. Após o resfriamento a mistura é transferida a um balão volumétrico de 1 litro e o volume é completado (VASCONCELOS, PINTO e ARAGÃO, 2013).

3.4.3. MARCHA ANALÍTICA E CURVA-PADRÃO

Transferir uma alíquota de volume definido da amostra para um tubo de ensaio. Adicionar um volume igual do reagente DNS no tubo. A mistura deve ser homogeneizada. O tubo então deve ser levado para banho-maria com água em ebulição (100 ℃) pelo tempo determinado. A reação é interrompida imergindo os tubos em banho de água fria. A mistura é diluída e homogeneizada, então a leitura da intensidade da cor é lida em um espectrofotômetro a 540 nm contra uma amostra de calibração. Essa marcha é a apresentada no relatório da EMBRAPA (VASCONCELOS, PINTO e ARAGÃO, 2013). A absorbância é correlacionada com quantidade de glicose utilizando uma curva-padrão.

Foi preparado uma solução-mãe de glicose dissolvendo 500,5 mg de glicose em 500 ml de água milli-Q ®, tendo uma concentração aproximada de 1 mg/ml. Em seguida, foram adicionadas alíquotas de 0 a 500 µl da solução de glicose em 12 tubos de ensaio, seguidas por alíquotas de água milli-Q ®, de forma que cada tubo tivesse volume final de 500 µl, cada qual com uma concentração diferente de glicose. A Tabela 3**Erro! Fonte de referência não encontrada.** apresenta os valores de volume de solução e concentração calculada de glicose.

Tabela 3 – Valores das soluções de glicose para a curva-padrão com DNS

Tubo	Solução de Glicose (µl)	Água milli-Q ® (µl)	Massa de Glicose (µg)	Mols de Glicose (µmol)	Concentração de Glicose (µmol/ml)
1	0	500	0,00	0	0
2	25	475	24,98	0,139	0,277
3	50	450	49,95	0,277	0,555
4	100	400	99,90	0,555	1,109
5	150	350	149,85	0,832	1,664
6	200	300	199,80	1,109	2,218
7	250	250	249,75	1,386	2,773
8	300	200	299,70	1,664	3,327
9	350	150	349,65	1,941	3,882
10	400	100	399,60	2,218	4,436
11	450	50	449,55	2,495	4,991
12	500	0	499,50	2,773	5,545

Fonte: O autor, 2024.

Com as soluções prontas, o ensaio com o DNS foi feito. Nesse, 500 µl de solução DNS foi adicionado em um tubo de ensaio e homogeneizado, o tubo então foi posicionado em um banho-maria com a água já fervendo (100℃). O processo foi repetido com o tubo seguinte, de

forma que cada tubo de ensaio, em relação ao tubo anterior, demorasse 30 segundos para ser posicionado no banho-maria, o ensaio foi feito de forma a selecionar tubos aleatoriamente. Da mesma forma, para retirar os tubos do banho foi respeitada a ordem em que foram colocados, tal qual respeitando também o intervalo de 30 segundos entre cada tubo. Dito isso, os tubos foram colocados em um banho de gelo imediatamente após a retirada do aquecimento para que a reação fosse interrompida.

Em seguida, a solução de cada tubo foi diluída para um volume final de 5 ml, que é o volume 10 vezes maior que o volume do meio reacional, isto é, o volume sem o DNS. Após a diluição foi feita a medida de absorbância de cada tubo em 540 nm.

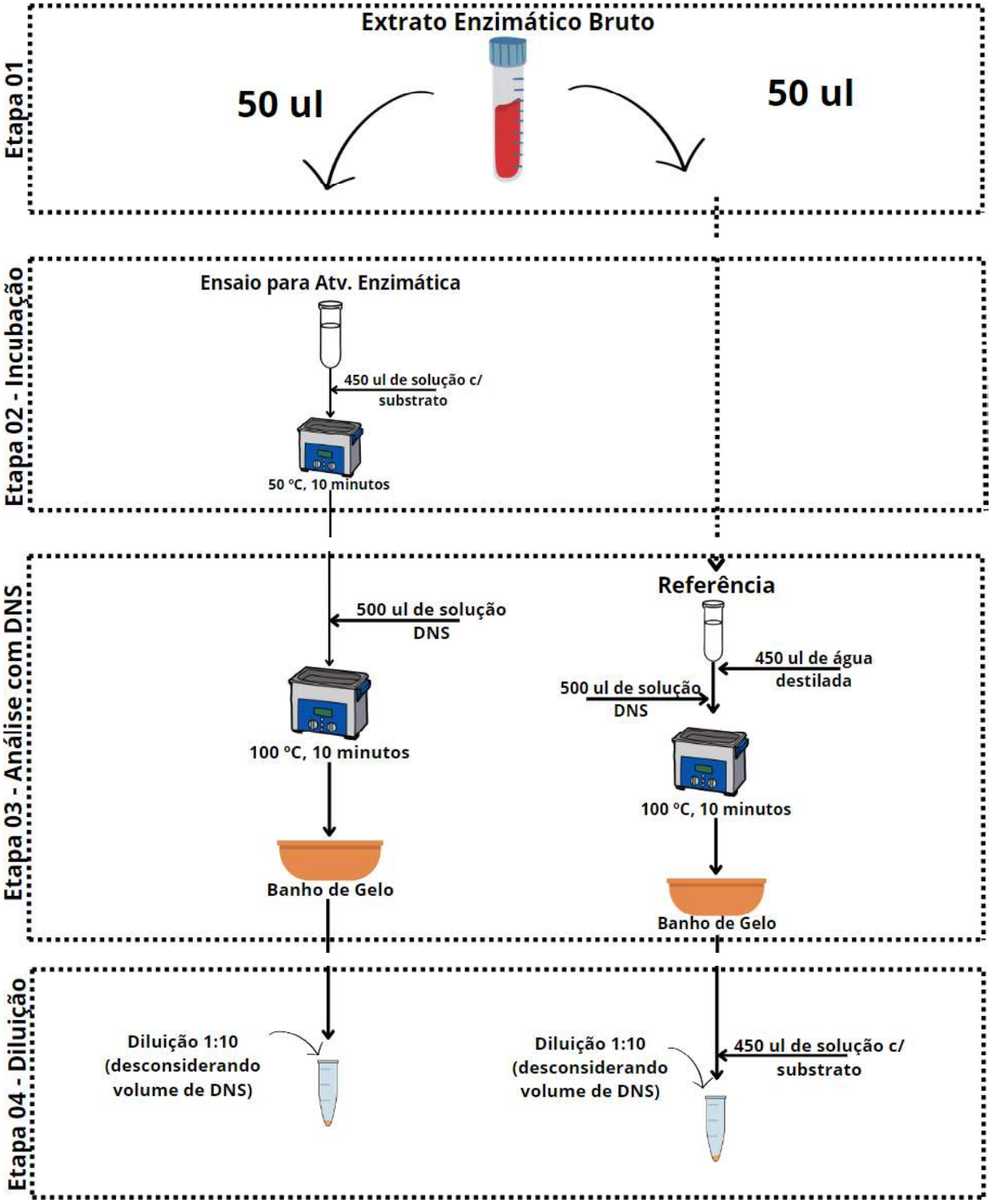
3.4.1. METODOLOGIA PARA ENSAIO PARA ATIVIDADE DA CMCASE

O ensaio para quantificação da atividade de CMCase seguiu a metodologia de PEREIRA, MARQUES, *et al*, 2015, entretanto o volume para análise foi duplicado, de 25 µl para 50 µl. Isso foi feito, pois ao usar a quantidade de 25 µl o volume final (após o teste com DNS) seria de 2,5 ml, insuficiente para a leitura no espectrofotômetro que necessita em torno de 4 ml.

No ensaio, 50 µl de extrato enzimático bruto foram transferidos para um tubo de ensaio, em seguida, 450 µl de solução contendo CMC foram adicionadas ao tubo, e este foi imediatamente posicionado em banho-maria na temperatura de 50 ℃. Esse processo foi feito para cada amostra, respeitando um intervalo de 30 segundos entre as amostras para evitar tempos de incubação diferentes, foi feito também de forma a selecionar as amostras aleatoriamente. Após 10 minutos a primeira amostra foi retirada, em seguida a cada 30 segundos uma amostra era retirada, respeitando a ordem em que foram postas.

Uma vez que todas as amostras tenham sido incubadas, elas então passaram para o ensaio com o DNS. O conjunto de ensaios é representado de maneira gráfica na Figura 8**Erro! Fonte de referência não encontrada.** a seguir.

Figura 8 - Esquemática dos ensaios para a determinação de atividade enzimática da CMCase.



Fonte: O autor, 2024.

O primeiro ensaio teve em mente determinar se as amostras apresentariam valores de absorbância acima do valor máximo da curva-padrão. Assim, foi determinado que se a amostra apresentou uma absorbância de 0,800 ou maior, a amostra então seria diluída em um fator de 1:10, caso contrário seria de 1:1 (sem diluição). Nota-se que a diluição apresentada a seguir não

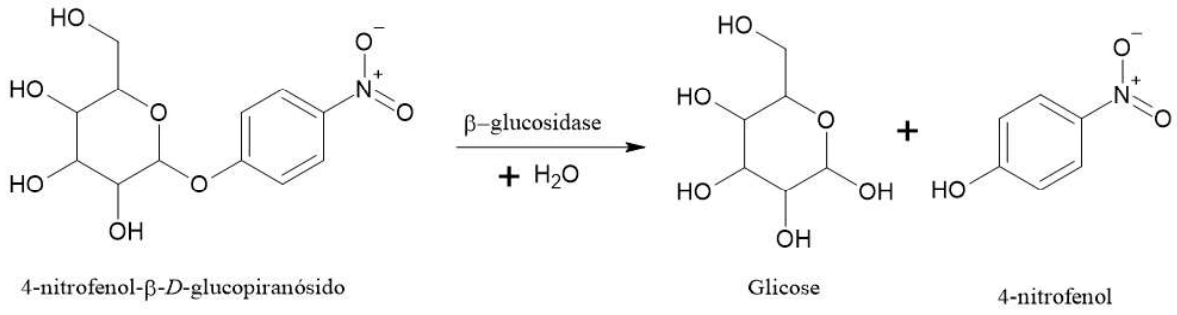
é a diluição feita na etapa final do processo, mas sim uma diluição em uma etapa intermediária (da Etapa 02 para a Etapa 03, Figura 8).

3.5. QUANTIFICAÇÃO DO COMPOSTO 4-NITROFENOL

O método tradicionalmente utilizado na análise da β-glicosidase foi desenvolvido por EIVAZI, e TABATABAI, 1988, posteriormente sintetizado por Tabatabai em 1994 (PAZUTTI e CHAER, 2012). Essas análises tiveram em vista a quantificação da atividade enzimática dessas enzimas no solo, uma vez que as β-glicosidases tem participação essencial na ciclagem de carbono no solo, especialmente na decomposição de componentes celulósicos de plantas (PAZUTTI e CHAER, 2012).

A determinação da atividade enzimática de β-glicosidase se baseia na determinação colorimétrica do p-nitrofenol liberado quando a amostra é incubada com solução tamponada contendo 4-nitrofenil-β-D-glucopiranósido sob temperatura e tempo definidos (PAZUTTI e CHAER, 2012).

Figura 9 – Ilustrativo da clivagem do PNPG em p-nitrofenol



Fonte: O autor, 2024.

O método usado se baseia no mesmo utilizado por LEITE, ALVES-PRADO, *et al*, 2008. O método consiste em diluir 50 µl do extrato enzimático em 250 µl de tampão acetato de sódio 0,1 mol/l pH 5,0. Em seguida é adicionado 250 µl de solução PNPG 4 mmol/l e imediatamente levar a amostra para aquecimento por 10 minutos. A reação é interrompida com a adição de 2 ml de solução carbonato de sódio 2 mol/l, então a absorbância é medida em 410 nm (LEITE, ALVES-PRADO, *et al.*, 2008).

3.6. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

3.6.1. PREPARO DOS EXTRATOS

Os extratos para avaliação de atividade antifúngica do *Penicillium javanicum* foram preparados a partir do seu crescimento em meio líquido de *Potato Dextrose Broth* (PDB). Para

tal 16 erlenmeyers de 500 ml foram preparados com 200 ml do meio, seguindo as indicações do fabricante. Em seguida, estes foram autoclavados à 121 ℃ por 15 minutos e mantidos em câmara de fluxo laminar para que a temperatura abaixasse.

Em seguida, dos 16 meios preparados, 12 foram inoculados com a cepa do fungo *P. javanicum*, os 4 demais foram mantidos como controle para aferir a presença ou não de contaminações.

As extrações foram feitas a cada 3 dias, assim, foram obtidos extratos de crescimento de 3, 6, 9 e 12 dias.

Para as extrações, o meio de crescimento foi filtrado e agitado com 200 ml de acetato de etila, em seguida, após a separação de fases a fase orgânica foi reservada e a fase aquosa foi novamente agitada com acetato, esse processo foi feito três vezes. Os 600 ml de solvente foram então agitados com água milli-Q® para então terem o volume reduzido em um rota evaporador.

Os volumes reduzidos foram então secos e pesados para então ser feita a ressuspensão em solução metanol-água (95:05). A solução foi então filtrada por um cartucho C_{18} como etapa de Clean-up. O filtrado final foi novamente seco e pesado, e esses extratos foram encaminhados para os ensaios de inibição descritos a seguir.

3.6.2. MICRORGANISMOS

Uma cepa de referência de *Candida albicans* (ATCC), incluindo duas cepas de *C. albicans* de isolados clínicos, foram usadas após aprovação pelo Comitê de Ética Brasileiro (nº 813.402/2014) (Tabela 4). Os ensaios antifúngicos foram realizados pelo Laboratório de Imunofisiologia (LIF) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, MA, Brasil. Todos os isolados de C. albicans foram identificados por PCR multiplex. Este método foi escolhido porque permite a identificação de isolados clínicos com alta especificidade e tem o potencial de discriminar espécies individuais de Candida em infecções polifúngicas. Para os experimentos, os isolados foram subcultivados em ágar Sabouraud-dextrose (SDA) com cloranfenicol por 24 h a 37 ◦C.

Tabela 4 – Cepas de Referência testadas

Identificação	Tipo de cepa
Ca ATCC 90028	Cepa padrão
Ca A01	Cepa clínica isolada do sangue
Ca A02	Cepa clínica isolada da vagina

Legenda: *Ca* = *Candida albicans*.

3.6.3. PREPARAÇÃO DO INÓCULO

As diferentes cepas foram ativadas em SDA com cloranfenicol por semeadura e incubação por 24 h a 35 ºC. As colônias foram ressuspensas em 5 mL de solução salina estéril a 0,85% (0,145 mol/L; 8,5 g/L NaCl). A suspensão resultante foi homogeneizada em um Vortex® por 15 s. A densidade celular foi ajustada em um espectrofotômetro (Global Trade Technology), em um comprimento de onda de 530 nm, pela adição de solução salina para obter uma absorbância correspondente aos padrões de 0,5 McFarland.

3.6.4. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Os testes de suscetibilidade antifúngica foram padronizados seguindo diretrizes previamente estabelecidas (M27-A3) (CLSI—CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2012), e de acordo com (OSTROSKY, MIZUMOTO, *et al.*, 2008). Para o teste, 100 µL de meio RPMI 1640 (com glutamina e vermelho de fenol, sem bicarbonato) tamponado com MOPS [ácido 3-(N-morfolina) propanossulfônico] foram adicionados aos poços de uma placa de microtitulação estéril de 96 poços, que continha uma suspensão celular de Candida spp. (1×10^6 UFC/mL). Em seguida, 100 µL das amostras (Tabela 5) na concentração de 50 mg/mL foram adicionados à primeira coluna, seguido por diluições seriadas de até 0,095 mg/mL. Fluconazol (0,125–256 µg/mL) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foi usado como controle positivo. O meio RPMI 1640, sem as amostras, serviu como controle de crescimento. O inóculo de Candida spp. com as amostras foi incubado por 24 h a 37 ºC.

O resultado foi analisado visualmente e lido em um leitor de microplacas a 540 nm. A MIC foi definida como a menor concentração das amostras na qual nenhum crescimento foi visível ou detectado. O teste foi realizado em triplicata em dois experimentos diferentes.

Tabela 5 – Extratos de *Penicillium javanicum*

AMOSTRAS	
F1-E3D	Filtrado 1, Extrato do 3° dia
F2-E6D	Filtrado 2, Extrato do 6° dia
F3-E9D	Filtrado 3, Extrato do 9° dia
F1-E12D	Filtrado 1, Extrato do 12° dia

3.6.5. CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (MFC)

A MFC foi determinada com base nos resultados da MIC. Uma alíquota de 10 µL dos poços correspondendo a até 4× o MIC foi semeada em placas de SDA com cloranfenicol. As

placas foram incubadas por 24–48 h a 37 ºC, e o MFC foi definido como a menor concentração das amostras que inibiram o crescimento fúngico. Todos os testes foram realizados em triplicata. A razão MFC/MIC foi calculada para determinar se as amostras tinham atividade fungistática (MFC/MIC ≥ 4) ou fungicida (MFC/MIC < 4) (ZAGO, SILVA, *et al.*, 2015).

3.6.6. BIOFILME

Os experimentos foram realizados conforme descrito por (OLIVEIRA, OLIVEIRA, *et al.*, 2017), com modificações. As placas foram incubadas por 24 h a 37 ºC. Após esse período, o sobrenadante foi removido e o pellet foi lavado duas vezes com PBS. O número de UFCs (Unidades Formadoras de Colônias) foi determinado e a atividade metabólica foi avaliada pelo ensaio MTT ou pela formação de biomassa usando coloração com cristal violeta.

Para o ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio), uma concentração de 5 mg/mL foi adicionada e as amostras foram lidas em um leitor de microplacas a 570 nm. Para a coloração com violeta de cristal, 0,2 mg/mL do corante foi adicionado, e as amostras foram lidas a 595 nm, conforme descrito por (ZAGO, SILVA, *et al.*, 2015). Para a quantificação de UFC, diluições de 10^{-2} a 10^{-4} foram semeadas em placas de SDA com cloranfenicol pela técnica de microgotas, e as placas foram incubadas por 24–48 h a 37 ºC. O ensaio foi realizado em triplicata em dois experimentos diferentes.

Os efeitos das amostras no biofilme foram analisados e as microplacas foram incubadas por 48 h a 37 ◦C. O meio de cultura foi trocado após 24 h. O sobrenadante foi aspirado, e o biofilme foi lavado duas vezes com PBS. Concentrações das amostras (200 µL) correspondentes a 2× e 4× MIC foram usadas. As placas foram incubadas a 37 ◦C por mais 24 h. Após esse período, as placas foram lavadas duas vezes com 100 µL de PBS, e o número de UFCs, a atividade metabólica (ensaio MTT) e a biomassa (coloração com cristal violeta) foram analisados. Em todos os experimentos, biofilmes sem amostras foram usados como controles negativos, e biofilmes com Fluconazol foram usados como controles positivos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. ENSAIO ENZIMÁTICO

Todo o processo para o preparo enzimático foi feito seguindo as instruções do artigo de Pereira et al. (2015), com algumas modificações dado as ferramentas e recursos dos laboratórios NuBBE (PEREIRA, MARQUES, *et al.*, 2015).

Para o meio foram preparados os substratos, esse processo foi iniciado pela lavagem e secagem, tanto do farelo de trigo quanto do bagaço de cana. A lavagem foi descrita no tópico

anterior, já a secagem foi feita por liofilização. Após a secagem, o bagaço de cana foi separado e caracterizado por granulometria. O resultado desta é apresentado na Tabela 6 a seguir.

Tabela 6 – Tabela de dados granulométricos do bagaço de cana

Diâmetro de Partícula (mm)	Peso (g)	Fração Mássica (%)
$D_p > 2{,}38$	5,88	6,07
$2{,}38 > D_P \geq 1{,}41$	31,92	32,98
$1{,}41 > D_p \geq 0{,}50$	42,22	43,62
$0{,}50 > D_p$	16,76	17,32

Fonte: Dados experimentais, o autor 2024.

Diante dos intervalos obtidos de granulometria, foi optado por seguir com a segunda fração de diâmetro de partícula ($2{,}38 > D_P \geq 1{,}41$), uma vez que partículas muito pequenas podem se aglomerar com facilidade e fazer uma torta densa ao serem umedecidas, processo que pode prejudicar o acesso do fungo ao substrato.

Em seguida, foi pesado 2,5 g de cada substrato (bagaço de cana e farelo de trigo), totalizando 5 g de substrato por Erlenmeyer. São utilizados 7 erlenmeyers para a análise, como foi feita em duplicata, foram utilizados 14. Em seguida, uma solução nutriente foi preparada, tendo as seguintes concentrações (g/L): 3,5 de $(NH_4)_2SO_4$; 3,0 de KH_2PO_4; 0,5 de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,5 de $CaCl_2$; 10,0 de Tween 80 e $1{,}0\ ml \cdot L^{-1}$ de Solução Traço (PEREIRA, MARQUES, *et al.*, 2015). Já a solução traço tem as concentrações (mg/ml): 5,0 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 1,6 de $MnSO_4 \cdot H_2O$; 1,4 de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; e 3,665 de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (PEREIRA, MARQUES, *et al.*, 2015). Para esse último composto, o autor apresenta na forma anidra ($CoCl_2$), entretanto o reagente disponível era na forma hidratada, assim, foram calculados a quantidade de íons e corrigido para a massa da forma hexahidratada. Com a solução pronta, utilizou-se cerca de 11,67 ml de solução por erlenmeyer para hidratar o substrato, resultando em uma umidade de 70%. Após a hidratação, os erlens foram devidamende tampados e autoclavados, procedimento que foi feito seguindo as normas do laboratório. Em seguida, foram deixados por 15 minutos em luz uv.

Para inoculação dos substratos com o fungo, foi feito o processo de inoculação por discos (PEREIRA, MARQUES, *et al.*, 2015). Neste, 4 placas contendo meio *Potato Dextrose Agar* (PDA) foram inoculadas com o fungo (*P. javanicum*) para que ele cobrisse toda a superfície das placas, o que levou um período de 240 horas. Imediatamente após esse período, as placas foram cortadas em discos de aproximadamente 0,8 milímetros de diâmetro, e foram inseridos 5 destes discos em cada ernlenmeyer.

Os frascos foram deixados incubando em 28 ºC, e a cada 48 horas dois frascos eram retirados para realização da extração. A extração foi feita utilizando água milli-Q®, 50 mililitros de água foram adicionados em cada um dos dois erlenmeyers. Em seguida, estes foram sujeitos a agitação em 100 rotações por minuto, por uma hora. Após a agitação, o meio foi filtrado em tecido inerte sem algodão em um sistema a vácuo. O líquido restante foi centrifugado a 9.000 (nove mil) rotações por minuto a 4 ºC por 15 minutos, o sobrenadante foi separado e o sólido descartado. Para cada extrato enzimático obtido (um por erlenmeyer), foi retirada uma alíquota de 5 ml, que foi destinada a um falcon de 15 ml. O volume restante foi armazenado em um falcon de 50 ml, e em seguida ambos foram congelados. Essa separação em dois frascos é feita para que não seja necessário descongelar todo o extrato para fazer as análises. A seguir a foto dos extratos na Figura 10.

Figura 10 – Extratos obtidos e congelados

Fonte: Foto retirada pelo autor, 2024.

Os extratos enzimáticos contidos no tubo falcon de 15 ml foram usados para os ensaios preliminares das enzimas, com eles foi identificado se as enzimas de interesse estavam presentes e se haveria necessidade de adaptações nos métodos utilizados devido a quantidade e atividade das enzimas. Depois desses ensaios os tubos de 15 ml com as enzimas foram descartados, uma vez que depois de repetir os ciclos de congelamento e descongelamento, somados do tempo em que os tubos ficam descongelados, as enzimas perdem atividade.

Para mitigar esse processo, os tubos de 50 ml foram descongelados e foram separadas 18 alíquotas de cada um (considerando 6 enzimas em triplicata) de 1 ml cada, assim, quando um ensaio fosse feito não haveria necessidade de descongelar novamente todo o extrato. Foram consideradas 6 enzimas, pois como prospecção futura era esperado avaliar também a avicelase, a manganês peroxidase, a lignase e a lacase, resultando assim em 6 enzimas.

4.2. DETERMINAÇÃO POR DNS

4.2.1. PREPARO DO REAGENTE DNS

O preparo da solução de DNS seguiu a metodologia proposta pela EMBRAPA (VASCONCELOS, PINTO e ARAGÃO, 2013). Entretando, para evitar a confecção de um excesso de solução, foi feito um cálculo estimado da quantidade necessária de solução DNS, considerando a análise de duas enzimas, a curva padrão, as réplicas e o número de amostra. Os dados considerados são expostos na Tabela 7 a seguir.

Tabela 7 – Dados para cálculo do volume necessário de DNS

Ensaio	Amostras	Referências	Nº de Réplicas	Brancos	Total
CMCase	14	14	3	3	87
Curva Padrão	11	0	3	3	36
Total	-	-	-	-	123

Fonte: O autor, 2024.

Os números na tabela são dados em quantidades de amostras, ou em quanidade de ensaios. Neste, nota-se que há distinção entre “Brancos” e “Referências”. O termo “Branco” é a amostra sem meio reacional, ou seja, contento apenas o volume de solução DNS que seria usado, e um volume de solução tampão representando o meio reacional, este é usado para calibrar o espectrofotômetro no ponto “zero”. Já as “Referências” são os ensaios das amostras sem a presença do substrato que gera o açúcar no meio, isso é feito para quantificar o açúcar que a amostra carrega, para posteriormente ser subtraído do valor medido.

Assim, como observado na tabela, são feitos 123 análises, e como em cada ensaio é usado 500 µl de solução DNS, assim seria necessário 60 ml de solução DNS, entretanto foi preparado 300 ml para a eventual necessidade de refazer as análises. O preparo foi feito seguindo as concentrações e valores corrigidos apresentados no tópico 3.4.2.

4.2.2. PREPARO DAS SOLUÇÕES SUBSTRATO

Foi utilizada mesma metodologia aplicada por (PEREIRA, MARQUES, *et al.*, 2015). Assim, primeiro foi preparado a solução tampão de acetato 0,1 mol/l em pH 5,0. Para tal, foi utilizada a equação de Henderson-Hasselbalch, explicitada abaixo.

$$\mathrm{pH} = \mathrm{pK_a} + \log\frac{[\mathrm{A^-}]}{[\mathrm{HA}]}$$

Sendo, nesse caso, $[A^-]$ a concentração do íon acetado, $[HA]$ a concentração do ácido acético, e o K_a (constante de acidez) adotado foi de $1{,}76 \cdot 10^{-5}$. O volume desejado foi de 1 litro, assim, com esses dados foi possível calcular uma massa necessária de acetato de sódio de 5,230 g e um volume de 2,0732 ml de ácido acético. O pH foi medido utilizando um pHmetro calibrado, e foi corrigido utilizando uma solução de hidróxido de sódio 2 mol/l, pois apresentou pH levemente abaixo do desejado (4,90).

Utilizando 50 ml da solução tampão, foi então preparado uma solução de CMC 40,0 g/l, que em seguida foi congelada usando nitrogênio líquido.

4.2.3. CURVA-PADRÃO DNS-GLICOSE

Para o preparo da curva-padrão, foi utilizada a metodologia apresentada pela EMBRAPA (VASCONCELOS, PINTO e ARAGÃO, 2013), adaptando apena o volume e o tempo de reação.

O procedimento foi feito em triplicata e os valores de absorbância e absorbância média, estão apresentados na Tabela 8 a seguir.

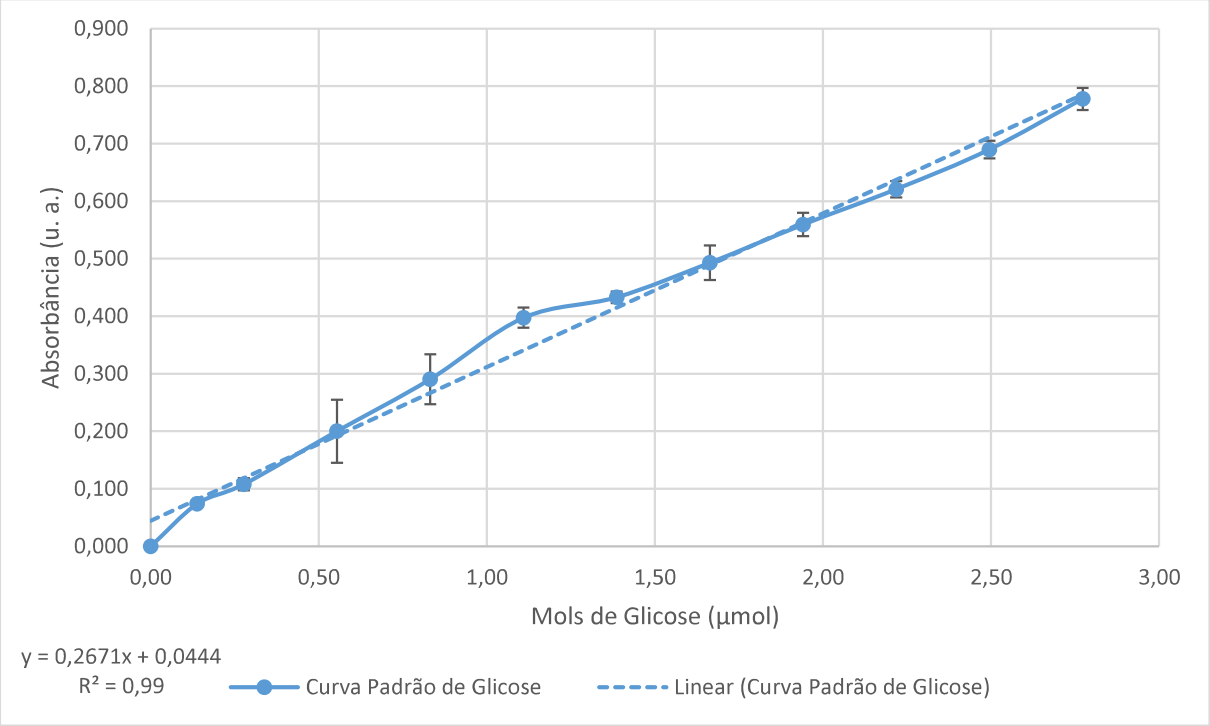
Tabela 8 – Valores de absorbância obtidos

Tubo	Mols de Glicose (µmol)	Absorbância 01	Absorbância 02	Absorbância 03	Absorção Média	Desvio Padrão
1	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	0,139	0,069	0,077	0,075	0,074	0,004
3	0,277	0,107	0,119	0,098	0,108	0,011
4	0,555	0,263	0,173	0,164	0,200	0,055
5	0,832	0,326	0,242	0,303	0,290	0,043
6	1,109	0,410	0,385	-	0,398	0,018
7	1,386	0,433	0,443	0,423	0,433	0,010
8	1,664	0,503	0,517	0,459	0,493	0,030
9	1,941	0,553	0,582	0,543	0,559	0,020
10	2,218	0,615	0,637	0,610	0,621	0,014
11	2,495	0,700	0,697	0,672	0,690	0,015
12	2,773	0,785	0,792	0,756	0,778	0,019

Fonte: O autor, 2024.

Com esses valores, foi possível correlacionar de forma gráfica os valores de número de mols de glicose com a absorbância média. A relação é apresentada na Figura 11, é apresentado também a reta tendência, a sua equação e o R^2.

Figura 11 – Número de mol de glicose por absorbância



Fonte: O autor, 2024.

Como apresentado, o R^2 obtido é de 0,99, o coeficiente angular é de 0,2671 e o coeficiente linear é de 0,0444. O coeficiente linear é o menor valor de absorbância que a curva-padrão aceita, uma vez que um valor menor que este resulta em um valor negativo de número de mols de glicose. Assim, o menor valor que pode ser medido é de 0,044 de absorbância, valores menores que este foram considerados como quantidade nula de glicose.

4.2.4. ENSAIO PARA ATIVIDADE DA CMCASE

Os dados deste teste estão apresentados na Tabela 9 a seguir.

Tabela 9 – Dados do ensaio preliminar para determinação do fator de diluição

Amostra	Absorbância	Fator de Diluição (1:x)
1A	1,012	10
1B	0,951	10
2A	1,918	10
2B	1,769	10
3A	1,426	10
3B	-	10
4A	0,528	1
4B	0,518	1
5A	0,570	1
5B	0,726	1
6A	0,659	1
6B	0,728	1
7A	0,573	1
7B	0,588	1

Fonte: O autor, 2024.

Não foi possível ler a amostra 3B devido a um erro no experimento, entretanto foi considerado que ela apresentaria a mesma necessidade de diluição da sua duplicata biológica (3A).

Foi feito também um teste preliminar das referências, isto é, foi quantificado a glicose presente nos extratos (que não são resultado do período de incubação da enzima com o substrato). Os resultados estão expostos na

Tabela 10 a seguir.

Tabela 10 - Dados do ensaio preliminar para determinação do fator de diluição das referências

Referência da Amostra	Absorbância	Fator de Diluição (1:x)
1A	0,322	1
1B	0,346	1
2A	0,035	1
2B	0,048	1
3A	0,039	1
3B	0,043	1
4A	0,035	1
4B	0,038	1
5A	0,035	1
5B	0,029	1
6A	0,032	1
6B	0,037	1
7A	0,042	1
7B	0,028	1

Fonte: O autor, 2024.

Como exposto, 11 dos 14 pontos tem valor de absorbância inferior a 0,044, assim, dado o valor do coeficiente linear da curva-padrão, nesses pontos o valor de glicose é considerado como zero. Já os 3 demais pontos (1A, 1B e 2B) tem um valor significativo de absorbância, entretanto não necessitam de diluição. Esses valores de glicose nos primeiros pontos são esperados, uma vez que mesmo com a lavagem do bagaço de cana e do farelo de trigo (substrato utilizado para crescimento do fungo no ensaio biológico), ainda assim algum amido e/ou glicose podem ter sido retidos no meio.

Com isso, a determinação de glicose foi feita novamente, em triplicata, seguindo os fatores de diluição determinados. Os dados estão expressos na Tabela 11 a seguir.

Tabela 11 – Dados de absorbância das amostras

Amostra	Diluição (1:x)	Absorção – Com Incubação			Absorção - Referências		
		1ª Réplica	2ª Réplica	3ª Réplica	1ª Réplica	2ª Réplica	3ª Réplica
1A	10	-**	0,057	0,066	0,278	0,003*	0,345
1B	10	-**	0,045	0,007	0,269	0*	0,243
2A	10	0,288	0,309	0,248	0,020	0*	0,035
2B	10	0,245	0,345	0,250	0,018	0,002*	0,048
3A	10	0,110	0,142	0,079	0,023	0,005*	0,044
3B	10	0,183	0,126	0,182	0,020	0,005*	0,043
4A	1	-**	0,528	0,522	0,035	0,035	0,037
4B	1	-**	0,518	0,654	0,036	0,038	0,047
5A	1	0,687	0,57	0,724	0,025	0,035	0,043
5B	1	0,453	0,726	0,588	0,049	0,029	0,035
6A	1	0,373	0,659	0,503	0,021	0,032	0,043
6B	1	0,581	0,728	0,632	0,022	0,037	0,032
7A	1	0,463	0,573	0,635	0,035	0,042	0,042
7B	1	0,616	0,588	0,662	0,031	0,028	0,034

Fonte: O autor, 2024.

* - Essas amostras foram erroneamente diluídas em um fator de 1:10, fazendo com que os valores de absorbância ficassem abaixo do detectável pela curva-padrão;

** - A solução com CMC é muito viscosa, assim, leva alguns segundos para transferir uma alíquota usando a pipeta. Nesse ensaio, em uma das amostras houve um atraso na transferência, o que causou em um atraso no preparo das amostras seguintes. Essas amostras foram deixadas fora do teste devido ao fato de estarem fora do tempo limite de 30 segundos.

É possível observar que as amostras 1A e 1B apresentam absorbância que estão no limite inferior da curva-padrão. Assim, foi deduzido que uma diluição com fator de 1:10 é excessivo para essas amostras. Com isso, o ensaio foi refeito para essas amostras utilizando um fator de 1:5, nesse, a amostra 1A apresentou absorbância de 0,070 e a 1B 0,110. Esses valores foram considerados baixos. Assim, tendo em vista novos teste, quando no ensaio sem diluição a amostra apresentar uma absorbância de 1,400 ou maior, essa então deve ser diluída em um fator de 1:10; já se o valor se encontrar entre 0,800 e 1,400 então a diluição deve ser em um fator de 1:2.

Pela equação da reta tendência dada pela curva-padrão, tem-se:

$$\text{Glicose}(\mu\text{mol}) = \left(\frac{\text{Absorbância} - 0{,}0444}{0{,}2671}\right) \cdot \text{Fator de Diluição}$$

Com isso, foi possível estimar a quantidade de glicose usando a absorbância medida. Os dados resultantes desse cálculo estão expressos na Tabela 12.

Tabela 12 - Dados de quantidade de glicose das amostras medidas

Amostra	Diluição (1:x)	Glicose (µmol) – Com Incubação			Glicose (µmol) - Referências		
		1ª Réplica	2ª Réplica	3ª Réplica	1ª Réplica	2ª Réplica	3ª Réplica
1A	10	-	0,471	0,808	0,875	1,000*	1,125
1B	10	-	0,022	0,000	0,841	0,792*	0,744
2A	10	9,120	9,906	7,622	0,000	0,000*	0,000
2B	10	7,510	11,254	7,697	0,000	0,000*	0,013
3A	10	2,455	3,654	1,295	0,000	0,000*	0,000
3B	10	5,189	3,054	5,151	0,000	0,000*	0,000
4A	1	-	1,811	1,788	0,000	0,000	0,000
4B	1	-	1,773	2,282	0,000	0,000	0,010
5A	1	2,406	1,968	2,544	0,000	0,000	0,000
5B	1	1,530	2,552	2,035	0,017	0,000	0,000
6A	1	1,230	2,301	1,717	0,000	0,000	0,000
6B	1	2,009	2,559	2,200	0,000	0,000	0,000
7A	1	1,567	1,979	2,211	0,000	0,000	0,000
7B	1	2,140	2,035	2,312	0,000	0,000	0,000

Fonte: O autor, 2024.

* - Para estes, a glicose foi calculada utilizando a absorção média das outras duas réplicas. Não é o ideal, entretanto foi o escolhido para não excluir os pontos das amostras dessa réplica.

Com os valores de glicose, foi feita a subtração do valor de referência, em seguida foi calculada a atividade enzimática por:

$$\text{Atividade Enzimática (U/ml)} = \frac{\text{Glicose}(\mu\text{mol})}{\text{Volume de Extrato}(\text{ml}) \cdot \text{Tempo de Reação}(\text{min})}$$

Utilizando o volume de extrato de $0{,}05$ ml e o tempo de 10 minutos, foi possível então determinar a atividade, os dados obtidos estão expostos na Tabela 13 a seguir.

Tabela 13 – Glicose gerada pela enzima e atividade enzimática

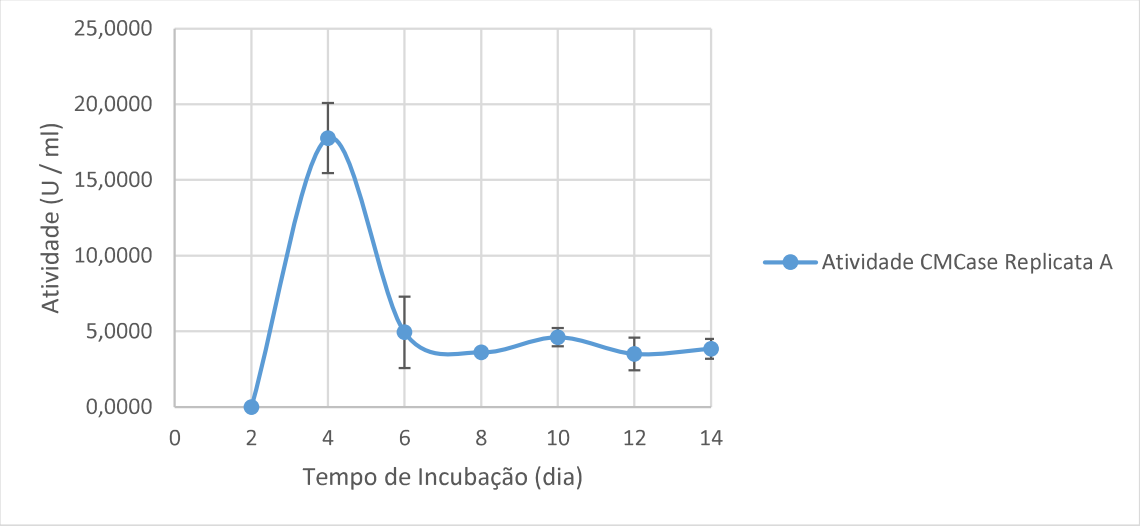
Amostra	Glicose (µmol) gerada			Atividade enzimática (U/ml)			Média	Desvio Padrão
	1ª Réplica	2ª Réplica	3ª Réplica	1ª Réplica	2ª Réplica	3ª Réplica		
1A	-	-0,529	-0,317	-	-	-	-	-
2A	9,120	9,906	7,622	18,24	19,81	15,24	17,77	2,32
3A	2,455	3,654	1,295	4,91	7,31	2,59	4,94	2,36
4A	-	1,811	1,788	-	3,62	3,58	3,60	0,03
5A	2,406	1,968	2,544	4,81	3,94	5,09	4,61	0,60
6A	1,230	2,301	1,717	2,46	4,60	3,43	3,50	1,07
7A	1,567	1,979	2,211	3,13	3,96	4,42	3,84	0,65
1B	-	-0,771	-0,744	-	-	-	-	-
2B	7,510	11,254	7,684	15,02	22,51	15,37	17,63	4,29
3B	5,189	3,054	5,151	10,38	6,11	10,30	8,93	2,44
4B	-	1,773	2,273	-	3,55	4,55	4,05	0,71
5B	1,513	2,552	2,035	3,03	5,10	4,07	4,07	1,04
6B	2,009	2,559	2,200	4,02	5,12	4,40	4,51	0,56
7B	2,140	2,035	2,312	4,28	4,07	4,62	4,33	0,28

Fonte: O autor, 2024.

Os valores negativos de glicose nas amostras 1A e 1B são resultado da diluição excessiva feita na amostra.

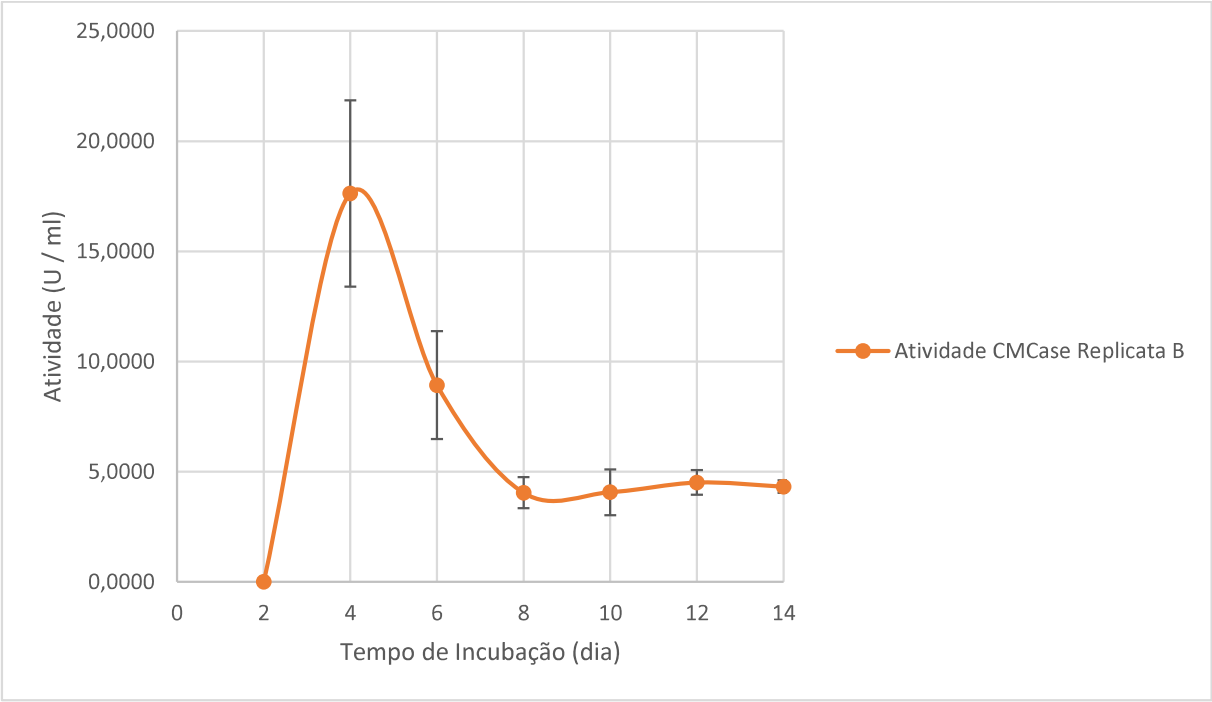
Com os dados de atividade enzimática, foi possível então representá-los de forma gráfica, como mostrado na Figura 12, Figura 13 e Figura 14 a seguir.

Figura 12 – Atividade da CMCase da Replica Biológica A – Com Desvio Padrão



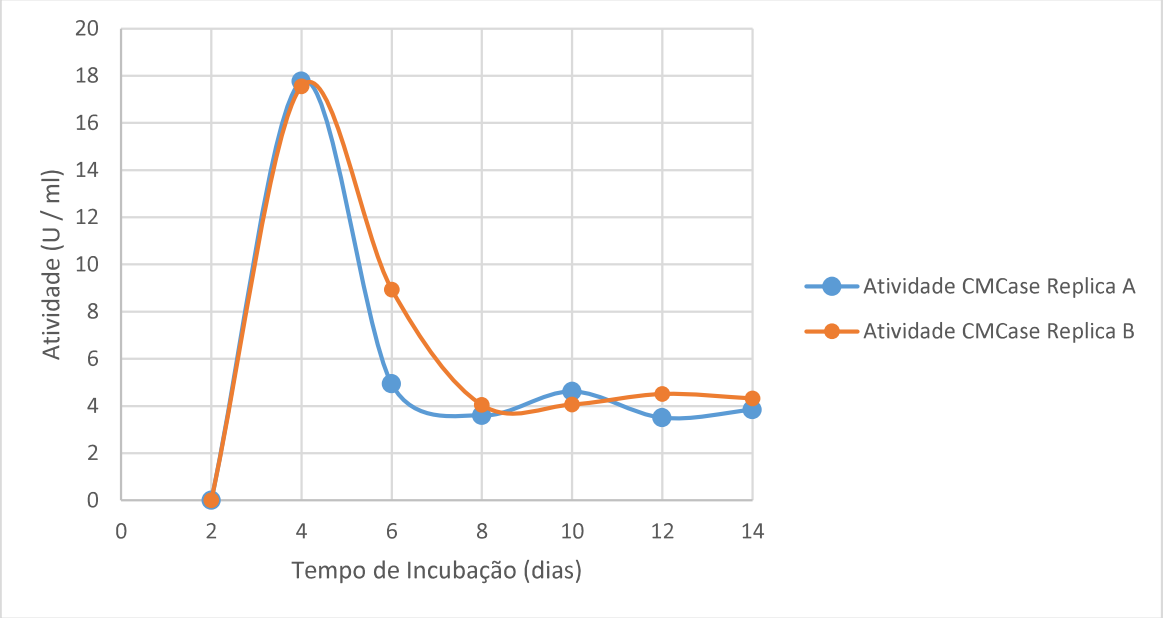
Fonte: O autor, 2024.

Figura 13 – Atividade da CMCase da Replica Biológica B – Com Desvio Padrão



Fonte: O autor, 2024.

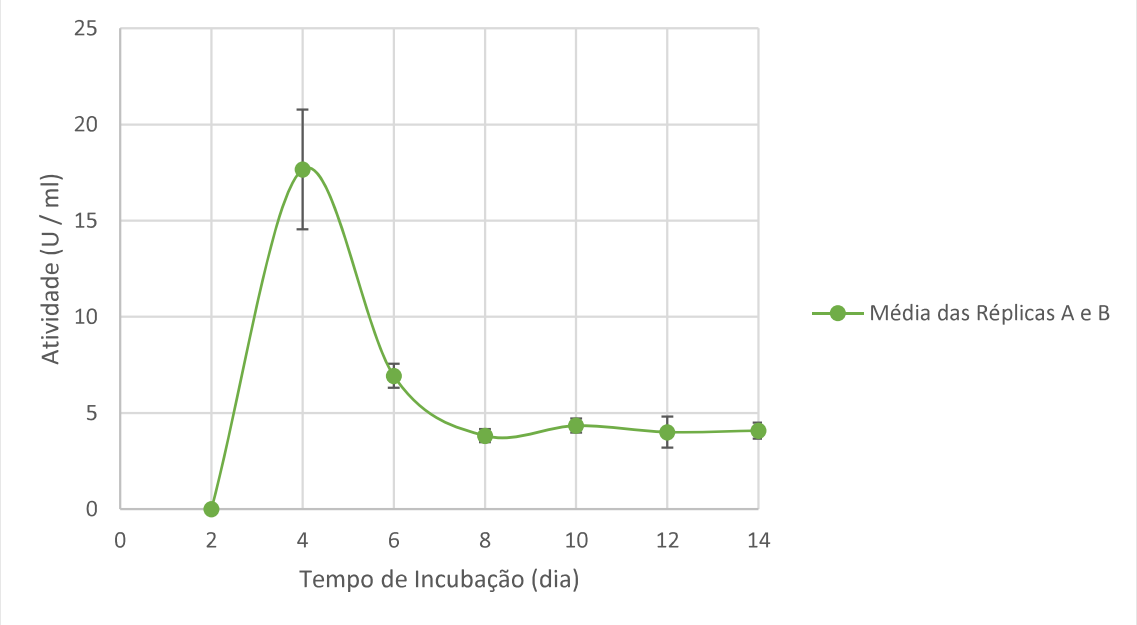
Figura 14 – Atividade da CMCase obtida de cada réplica biológica



Fonte: O autor, 2024.

Foi feita também a representação da atividade média, apresentada na Figura 15.

Figura 15 – Média da atividade da CMCase



Fonte: O autor, 2024.

Sem os valores do primeiro ponto (1A e 1B) não é possível tirar conclusões exatas, entretanto é possível perceber uma maior produção de enzimas no quarto dia. Isso pode ser esperado por dois fatos distintos: I, como dito anteriormente, mesmo com a lavagem dos

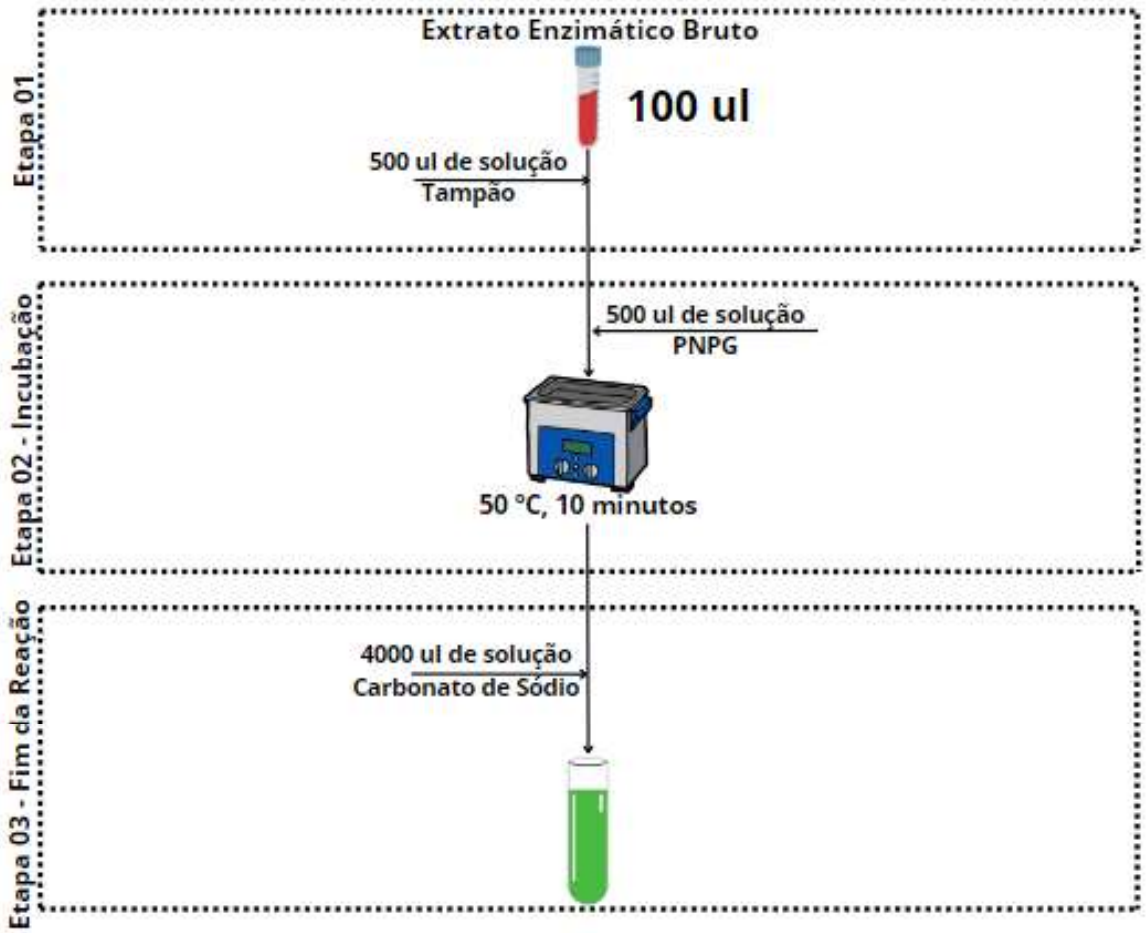
substratos usados para o crescimento do fungo, ainda sim alguma quantidade de amido ou de glicose pode ter restado no meio, fazendo com que nos primeiros dias de incubação o fungo esgotasse essa fonte de carbono e então começasse a produzir as enzimas para degradar o material; II, é necessário um período de adaptação para que o fungo comece a produzir as enzimas, o que pode ter ocorrido nos primeiros 4 dias. Por fim, após o pico de produção no quarto dia, nos dias seguintes houve uma menor produção dessas enzimas.

Além disso, outros fatorem tem efeito sobre a atividade enzimática, como temperatura, pH do meio e concentração do substrato usado. É necessário avaliações complementares que determinem as condições ótimas para a avaliação das atividades enzimáticas.

4.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE β-GLICOSIDASE

Como apresentado no tópico 3.5, a determinação da atividade de β-glicosidade se baseia na capacidade da enzima em clivar o PNPG, liberando o composto *p*-nitrofenol. Novamente, o método foi feito com o dobro dos volumes para que fosse possível fazer a leitura de absorbância no espectrofotômetro. Na Figura 16 o procedimento é apresentado de forma resumida.

Figura 16 - Esquemática dos ensaios para a determinação da atividade enzimática de β-glicosidase



Fonte: O autor, 2024.

4.3.1. PREPARO DA SOLUÇÃO SUBSTRATO

Foram preparados 50 ml de solução PNPG, para tal, em um balão volumétrico de 50 ml foi diluído 0,0631 g de PNPG com água milli-Q®. Com isso, a concentração obtida foi de 4,003 mmol/l.

4.3.2. CURVA-PADRÃO DE *p*-NITROFENOL

Foi preparada uma solução-mãe de *p*-nitrofenol de concentração de 9,98 mmol/l. Foi preparado também uma solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 2,00 mol/l.

Em seguida, a curva-padrão foi preparada usando diluições da solução-mãe de *p*-nitrofenol. Os dados são apresentados na Figura 17 a seguir.

Figura 17 - Valores das soluções de *p*-nitrofenol para a curva-padrão

Tubo	Solução Estoque pNP (µl)	Água Milli-Q ® (µl)	Nº de Mols de pNP (µmol)	Concentração pNP (µmol/ml)
1	0	100	0,000	0,000
2	10	90	0,100	0,020
3	20	80	0,200	0,039
4	30	70	0,299	0,059
5	40	60	0,399	0,078
6	50	50	0,499	0,098
7	60	40	0,599	0,117
8	70	30	0,698	0,137
9	80	20	0,798	0,157
10	90	10	0,898	0,176
11	100	0	0,998	0,196

Fonte: O autor, 2024.

Em seguida, após o preparo das soluções diluídas, foi acrescentado 500 µl de água milli-Q® (representando o volume de solução PNPG), 500 µl de solução tampão e 4000 µl de solução carbonato de sódio. Em seguida, foi feita a leitura de absorbância em 410 nm. O ensaio foi feito em triplicata e os dados obtidos estão expressos na Tabela 14 a seguir.

Tabela 14 – Dados de mols de *p*-nitrofenol e absorbância

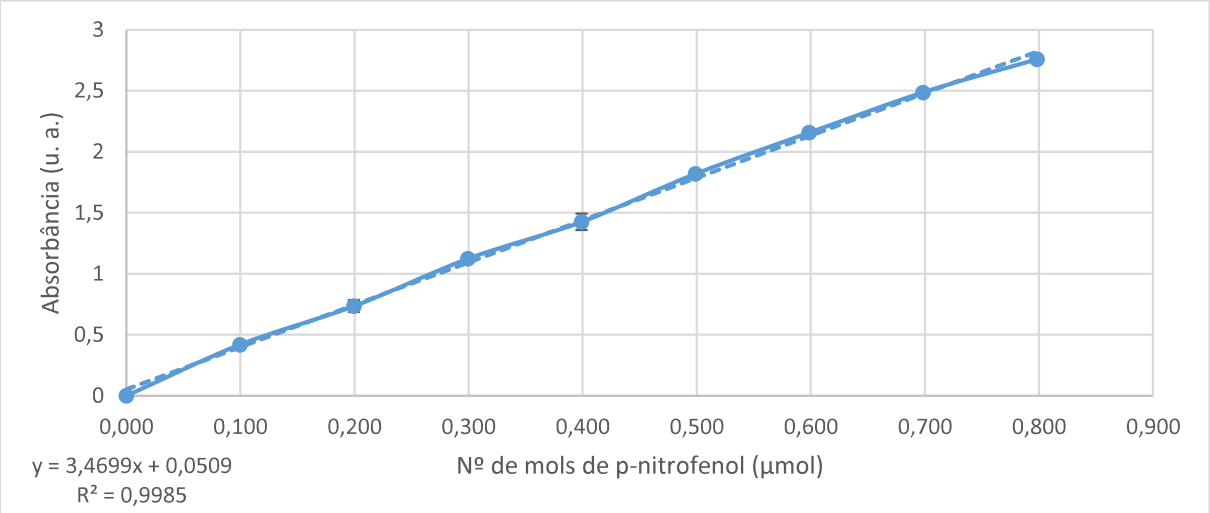
Tubos	Nº de Mols de pNP (µmol)	Absorbância 1	Absorbância 2	Absorbância 3	Média	Desvio Padrão
1	0,000	0	0	0	0	0
2	0,100	0,427	0,409	0,419	0,418	0,009
3	0,200	0,680	0,768	0,759	0,736	0,048
4	0,299	1,122	1,112	1,134	1,123	0,011
5	0,399	1,479	1,351	1,447	1,426	0,067
6	0,499	1,816	1,812	1,83	1,819	0,009
7	0,599	2,164	2,151	2,152	2,156	0,007
8	0,698	2,501	2,495	2,462	2,486	0,021
9	0,798	2,754	2,734	2,787	2,758	0,027
10	0,898	>+3	>+3	>+3	-	-
11	0,998	-	>+3	>+3	-	-

Fonte: O autor, 2024.

As soluções 10 e 11 apresentaram absorbância maior que 3 em relação a solução de calibração, portanto o valor não pode ser expresso pelo equipamento. Os dados foram expressos

de forma gráfica na Figura 18 a seguir, tal como o valor de R^2 e os coeficientes da equação de reta tendência.

Figura 18 – Curva-padrão de *p*-nitrofenol



Fonte: O autor, 2024.

Como apresentado na Figura 18, o R^2 obtido foi de 0,9985, já o coeficiente linear foi de 0,0509, portanto, valores de absorbância iguais ou menores a 0,050 são dados como zero mols de p-nitrofenol.

4.3.3. ENSAIO PARA A ATIVIDADE DE β-GLICOSIDADE

O método foi realizado usando o dobro do volume, uma vez que é necessário no mínimo 4 ml para aferir a absorbância no espectrofotômetro. Assim, para cada amostra foram coletados 100 µl de extrato enzimático, em seguida, foi adicionado 500 µl de tampão acetato 0,1 M, pH 5,00. Na etapa seguinte, para iniciar a incubação, foram adicionados 500 µl de solução PNPG 4mM, a mistura resultando foi então levada para incubação à 50 °C por 10 minutos. Assim como nos ensaios anteriores, foi respeitado um intervalo de 30 segundos entre amostras, tanto para serem colocadas no banho quanto para serem retiradas. Por fim, quando a amostra foi retirada da incubação, foi então adicionado 4000 µl de solução carbonato de sódio 2M, e em seguida foi lida a absorbância em 410 nm.

Após a medição, algumas amostras apresentaram absorbância acima do limite. Assim, foi necessário dilui-las. Porém, foi feito uma análise para aferir se a diluição teria alteração significante na avaliação, para tal, foi preparado uma solução padrão de p-nitrofenol diluindo 0,0694 g do composto em 50 ml de água milli-Q® em um balão volumétrico. Em seguida, o procedimento padrão foi seguido, usando 100 µl da solução padrão, 500 µl de água milli-Q®,

500 µl de tampão acetato e 4000 µl de solução carbonato de sódio. Essa mistura final foi então diluída com água e com solução carbonato de sódio e os dados obtidos estão apresentados na Tabela 15 e na Tabela 16 a seguir.

Tabela 15 – Dados do ensaio de diluição feito com Água milli-Q®

Diluição (1:x)	Teórico (µmol)	Abs 1 (u.a.)	Abs 2 (u.a.)	Exp. 1 (µmol)	Exp. 2 (µmol)	Erro 1 (%)	Erro 2 (%)	Média (µmol)	Erro Médio (%)
2	0,499	1,718	1,752	0,480	0,490	3,69%	1,73%	0,485	2,71%
5	0,200	0,648	0,700	0,172	0,187	13,76%	6,25%	0,180	10,01%
10	0,100	0,342	0,323	0,084	0,078	15,91%	21,40%	0,081	18,66%

Fonte: O autor, 2024.

Tabela 16 – Dados do ensaio de diluição feito com solução carbonato de Sódio 2M

Diluição (1:x)	Teórico (µmol)	Abs 1 (u.a.)	Abs 2 (u.a.)	Exp. 1 (µmol)	Exp. 2 (µmol)	Erro 1 (%)	Erro 2 (%)	Média (µmol)	Erro Médio (%)
2	0,499	1,800	1,800	0,504	0,504	1,04%	1,04%	0,504	1,04%
5	0,200	0,776	0,774	0,209	0,208	4,72%	4,43%	0,209	4,58%
10	0,100	0,383	0,377	0,096	0,094	4,07%	5,80%	0,095	4,94%

Fonte: O autor, 2024.

Nessas, as colunas são: “Teórico” é referente a quantidade de p-nitrofenol que foi calculada a partir da solução padrão; “Abs 1” e “Abs 2” são as absorbâncias das duplicatas feitas; “Exp. 1” e “Exp.2” são os valores experimentais de *p*-nitrofenol obtidos a partir das absorbâncias medidas; “Erro 1” e “Erro 2” são os devios do valor experimental em relação ao teórico; “Média” é o valor médio obtido entre as duplicatas; e “Erro Médio” é o desvio do valor médio experimental em relação ao teórico.

Nota-se, pelos desvios apresentados, que a diluição deve ser feita utilizando a solução carbonato de sódio 2M. Esse fato pode ser justificado pois uma vez que é feita a diluição com água, o pH cai, fazendo com que a mistura perca parte da cor, uma vez que o *p*-nitrofenol apresenta cor apenas em pH básico.

As diluições foram feitas com o carbonato de sódio e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 17 a seguir

Tabela 17 – Valores de Absorbância Obtidos de Cada Réplica

Amostra	Replica 1		Replica 2		Replica 3	
	Diluição (1:x)	Abs. 1	Diluição (1:x)	Abs. 2	Diluição (1:x)	Abs. 3
1A	1	0,357	1	0,319	1	0,327
1B	1	0,305	1	0,305	1	0,311
2A	2	1,971	2	1,93	2	1,911
2B	2	2,016	2	2,09	2	1,974
3A	2	2,130	2	2,616	2	2,659
3B	2	2,638	2	2,671	2	2,631
4A	2	2,562	2	2,724	2	2,748
4B	2	2,850	2	2,839	2	2,655
5A	2	2,858	2	2,726	2	2,792
5B	2	2,788	2	2,829	2	2,845
6A	2	2,933	2	2,965	2	2,964
6B	2	2,915	2	2,755	2	2,859
7A	2	2,861	2	2,946	2	2,849
7B	2	2,858	5	0,984	2	2,908

Fonte: O autor, 2024.

Com esses valores, foi possível utilizar a equação da curva-padrão e calcular a quantidade de p-nitrofenol:

$$\mathrm{p-nitrofenol(\mu mol)} = \left(\frac{\mathrm{Absorbância} - 0{,}051}{3{,}4699}\right) \cdot \mathrm{Fator\ de\ Diluição}$$

Também foi calculado a atividade enzimática utilizando a equação:

$$\mathrm{Atividade\ Enzimática\ (U/ml)} = \frac{\mathrm{p-nitrofenol(\mu mol)}}{\mathrm{Volume\ de\ Extrato(ml)} \cdot \mathrm{Tempo\ de\ Reação(min)}}$$

Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 18 a seguir.

Tabela 18 – Quantidade de p-nitrofenol e atividade enzimática

Amostra	Replica 1		Replica 2		Replica 3	
	p-nitrofenol (µmol)	Atividade (U/ml)	p-nitrofenol (µmol)	Atividade (U/ml)	p-nitrofenol (µmol)	Atividade (U/ml)
1A	0,0882	0,088	0,0773	0,077	0,0796	0,080
1B	0,0732	0,073	0,0732	0,073	0,0750	0,075
2A	1,1067	1,107	1,0831	1,083	1,0721	1,072
2B	1,1327	1,133	1,1753	1,175	1,1085	1,108
3A	1,1984	1,198	1,4785	1,479	1,5033	1,503
3B	1,4912	1,491	1,5102	1,510	1,4871	1,487
4A	1,4474	1,447	1,5408	1,541	1,5546	1,555
4B	1,6134	1,613	1,6070	1,607	1,5010	1,501
5A	1,6180	1,618	1,5419	1,542	1,5799	1,580
5B	1,5776	1,578	1,6013	1,601	1,6105	1,610
6A	1,6612	1,661	1,6797	1,680	1,6791	1,679
6B	1,6508	1,651	1,5586	1,559	1,6186	1,619
7A	1,6197	1,620	1,6687	1,669	1,6128	1,613
7B	1,6180	1,618	1,3446	1,345	1,6468	1,647

Fonte: O autor, 2024.

Também foi calculado a média da atividade enzimática e o desvio padrão, apresentados na Tabela 19 a seguir.

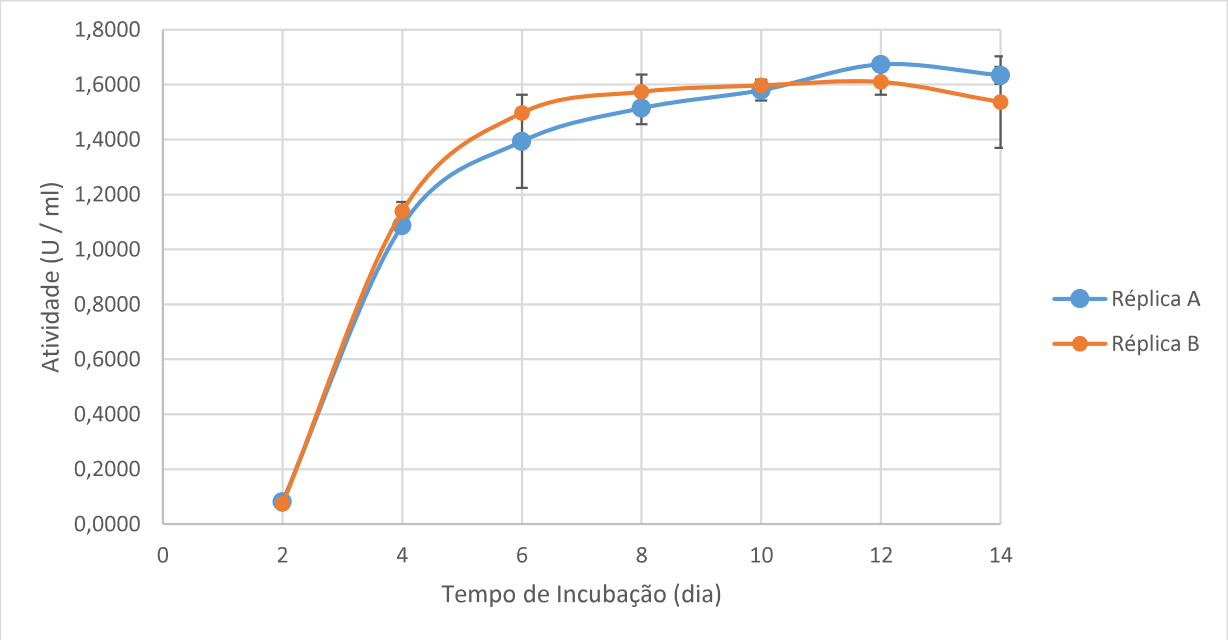
Tabela 19 – Média da Atividade Enzimática das Réplicas Biológicas e Desvio Padrão

Média Atividade Enzimática (U/ml)	Desvio Padrão
0,0817	0,0058
0,0738	0,0010
1,0873	0,0177
1,1388	0,0339
1,3934	0,1693
1,4962	0,0123
1,5142	0,0583
1,5738	0,0631
1,5799	0,0380
1,5965	0,0169
1,6733	0,0105
1,6093	0,0468
1,6337	0,0305
1,5365	0,1668

Fonte: O Autor, 2024.

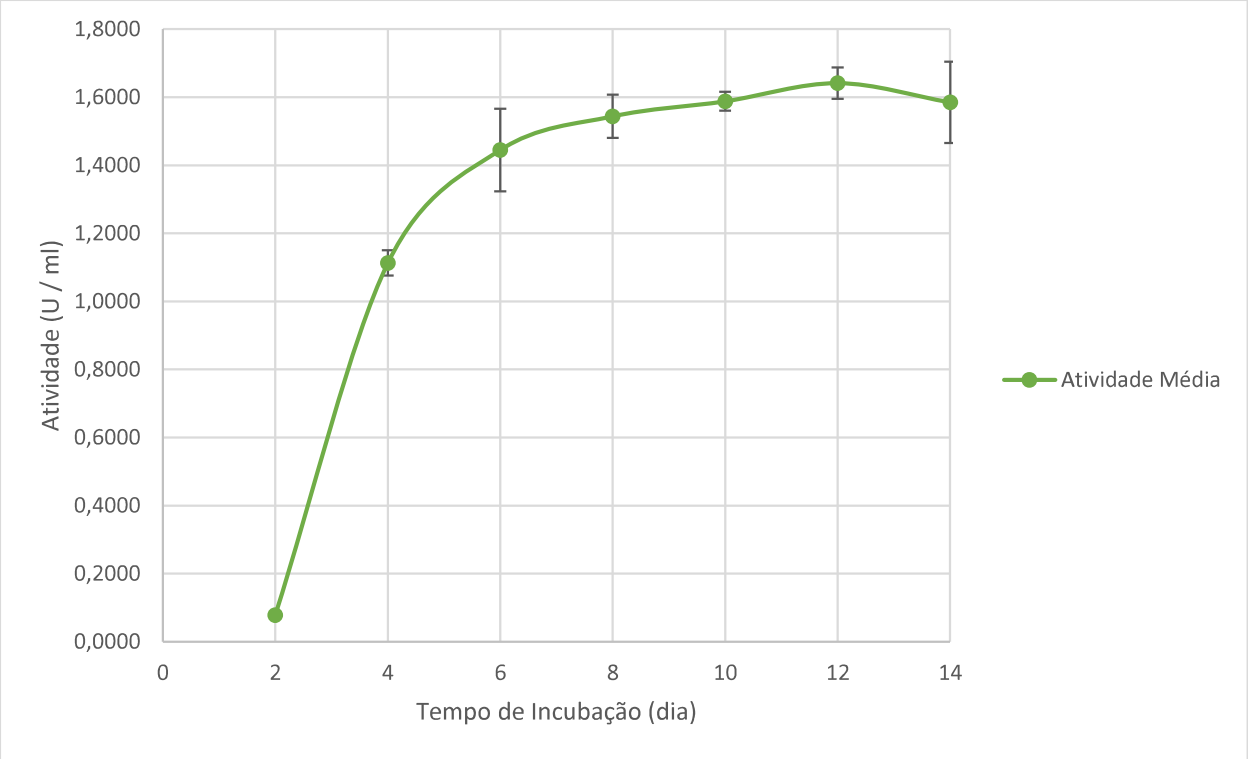
Os dados estão apresentados de forma gráfica na Figura 19 e Figura 20 a seguir.

Figura 19 – Atividade da **β**-glicosidase de cada réplica biológica com Desvio Padrão



Fonte: O autor, 2024.

Figura 20 - Atividade Média da **β**-glicosidase com Desvio Padrão



Fonte: O autor, 2024.

Nota-se que em relação a CMCase, a atividade enzimática da β-glicosidase foi menor, o máximo observado da primeira foi em torno de 20 U/ml, enquanto da segunda foi em torno de 1,6 U/ml. Isso pode ser explicado por algumas hipóteses: I, a quantidade produzida dessa enzima pode ter sido menor, o que explicaria uma menor atividade enzimática observada; II, as condições ótimas de cada enzima podem ser diferentes, nessa, as condições ótimas da CMCase podem ser mais próximas das utilizadas no ensaio, enquanto da β-glicosidade poderia ser mais distante dos pH e temperaturas utilizadas. Para avaliar essas hipóteses, seria necessário avaliar a quantidade de enzimas produzidas e condições de pH ótimas de cada uma.

4.3.4. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIFÚNGICAS

4.3.4.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima

A avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM) é essencial para determinar a eficácia de agentes antimicrobianos, especialmente no tratamento de infecções fúngicas, onde a resistência a antifúngicos tem se tornado uma preocupação crescente (SMITH, 2023). A CIM representa a menor concentração de um antifúngico necessário para inibir o crescimento visível de fungos, enquanto a CFM

define a concentração capaz de erradicar completamente os organismos viáveis (Martínez *et al*., 2022).

Assim, de acordo com os ensaios realizados, observou-se que as amostras de *P. javanicum* demonstraram potencial antifúngico, com atividade fungicida para quase todas as cepas testadas (Tabela 20). À exceção, as amostras F1-E3D e F2-E6D apresentaram atividade fungistática para as cepas de isolados clínicos de *Ca* A02. Os menores valores da razão CFM/MIC para as cepas padrão *Ca* ATCC90028 e isolados clínicos *Ca* A01 e *Ca* A02 foram registrados pelas amostras F2-E6D, F1-E3D e F1-E12D, respectivamente, variando entre 1,3 – 1,5. Esses valores demonstram uma capacidade na aplicação desses extratos como agentes fungicidas para essas cepas.

Tabela 20 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima dos Extratos de *P. javanicum* contra *C. albicans*.

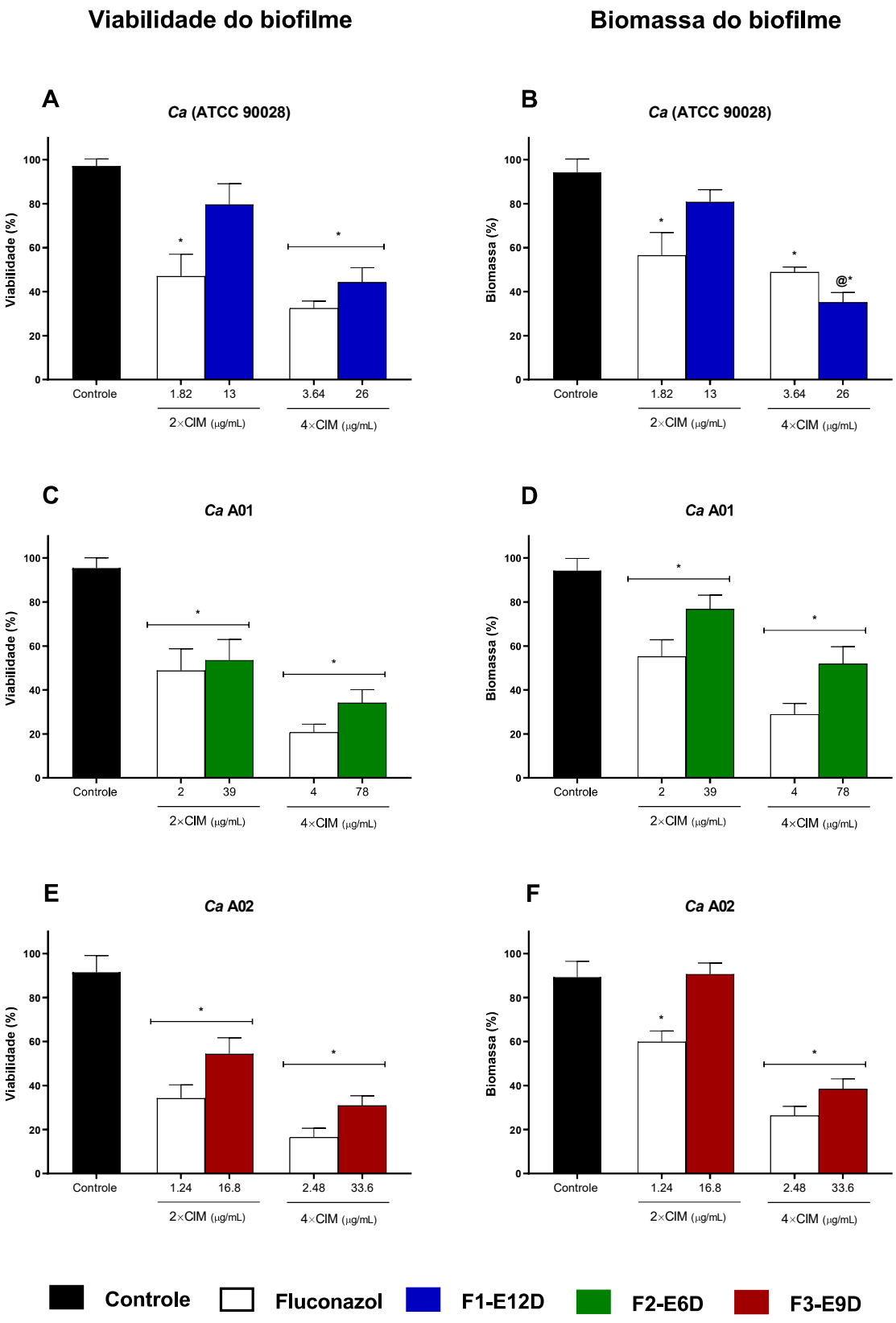
Extrato teste	**F1-E3D**			**F2-E6D**			**F3-E9D**			**F1-E12D**			**Fluoconazol**
Cepas	**CIM**	**CFM**	**CFM/CIM**	**CIM**	**CFM**	**Cepas**	**CIM**	**CFM**	**CFM/CIM**	**CIM**	**CFM**	**Cepas**	**CIM**
Ca ATCC 90028	125±0	312.5±205.4	2.5	125±0	166.7±64.5	1.3	15.6±2	62.5±0	4	6.5±2	20.83±8	3.2	0.91±0.6
Ca A01	250±0	375±136.9	1.5	19.5±9.6	67.7±30.7	3.4	166.7±64.5	375±136.9	2.2	83.3±32.2	208.3±64.5	2.5	1±0.7
Ca A02	33.8±15.3	156.3±76.5	4.6	26±8	125±0	4.8	8.4±3.8	19.5±9.5	2.3	166.7±64.5	291.7±170.8	1.7	0.62±0.4

4.3.4.2. Viabilidade e Biomassa do Biofilme

Biofilmes são comunidades microbianas organizadas em uma matriz extracelular que conferem proteção física e metabólica aos microrganismos, dificultando a penetração de agentes antimicrobianos e o sistema imunológico do hospedeiro (BADRAN, 2022). A porcentagem de inibição do biofilme indica a eficiência de um tratamento em impedir a formação do biofilme ou na sua dispersão, enquanto a redução da biomassa do biofilme avalia a diminuição da quantidade de material orgânico que compõe a estrutura do biofilme, refletindo diretamente no controle da infecção (JAMAL, 2022).

Mediante o exposto, os ensaios para avaliação da porcentagem de inibição do biofilme e da redução da biomassa do biofilme com os extratos de *P. javanicum* frente à cepas padrão e clínicas de *Candida albicans* revelaram que o tratamento com as amostras inibiu a formação do biofilme e a redução da biomassa do biofilme com eficácia similar em relação ao Fluconazol na concentração de 4× MIC. Para a cepa *Ca* ATCC 90028, a amostra F1-E12D apresentou redução maior e mais significativa do que a observada com o Fluconazol.

Figura 21 - Porcentagens de inibição e redução em biofilmes maduros tratados com extratos de *P. javanicum*



A Figura 21 mostra as porcentagens de inibição e redução em biofilmes maduros tratados com extratos de *P. javanicum* contra cepas padrão (A e B) e de isolados clínicos (C e D, E e F) de *C. albicans*, avaliadas pelo ensaio do MTT. As concentrações de tratamento foram

baseadas nos valores suprainibitórios (2× e 4× MIC) e comparadas com os controles não tratados (Controle) e ao fármaco de referência (Fluconazol) para o fungo leveduriforme *C. albicans*. Os dados são representados como média ± desvio padrão para três experimentos com significância de (*) $p<0,05$ comparado aos controles, (#) $p<0,005$ comparado aos controles e (@) $p<0,05$ comparado ao Fluconazol, e foram analisados por ANOVA, seguido pelo teste de Shapiro-Wilk.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Conclui-se que o fungo *Penicillium javanicum* demonstra significativa capacidade de produzir enzimas com potencial de sacarificação da celulose e substâncias/metabólitos secundários com atividade antifúngica contra cepas de *Candida albicans*, como evidenciado pelos resultados experimentais deste estudo. Os ensaios de fermentação em estado sólido (FES) geraram extratos enzimáticos com atividade notável, especialmente na produção de β-glicosidase e CMCase. Os dados mostraram que o fungo manteve níveis consistentes de produção enzimática ao longo dos períodos de incubação, evidenciando um potencial promissor para a degradação eficiente de biomassa lignocelulósica.

Observou-se uma atividade crescente de β-glicosidase nos períodos intermediários e finais da fermentação, sugerindo um padrão de produção que pode ser otimizado para maior rendimento. A curva de atividade enzimática indicou valores superiores de p-nitrofenol liberado em amostras diluídas em solução de carbonato de sódio, destacando a importância de condições alcalinas para maximizar a atividade enzimática. O uso da curva-padrão de p-nitrofenol possibilitou uma quantificação precisa da atividade enzimática, conferindo robustez aos resultados e demonstrando o rigor metodológico aplicado.

Da mesma forma, a atividade de CMCase apresentou um pico de produção no quarto dia de incubação, com uma redução seguida de estabilização em níveis quase constantes. Esses resultados abrem oportunidades para otimizar o processo visando maior rendimento.

Para maximizar o potencial de *P. javanicum* como agente de degradação de biomassa, estudos adicionais que explorem sua viabilidade sob diferentes condições ambientais, como variações de pH e temperatura, são cruciais. Tais condições ótimas podem aumentar significativamente a eficiência catalítica das enzimas. A identificação de outras enzimas associadas à degradação da lignocelulose, como lacases, poderia ampliar o escopo de degradação e contribuir para um processo de quebra de biomassa mais completo.

Além disso, o monitoramento detalhado das atividades enzimáticas ao longo do tempo, conforme demonstrado neste estudo, indica potencial para ajustes no processo de fermentação

que possam aumentar a produção enzimática. A análise dos desvios padrão e das médias das atividades das réplicas biológicas evidenciou a consistência e reprodutibilidade do processo, fatores essenciais para futuras aplicações em escala industrial.

Este estudo preliminar reforça o potencial biotecnológico de *P. javanicum* como agente degradante de biomassa lignocelulósica, com especial aplicação em biocombustíveis. Estudos complementares devem focar na adaptação do processo para escalas maiores, visando eficiência e sustentabilidade, bem como na avaliação de possíveis sinergias com outros microrganismos e condições de cultivo para maximizar os resultados.

Com base nos dados apresentados, conclui-se que o fungo produz algumas das enzimas necessárias para a degradação da biomassa, incluindo CMCase e β-glicosidase. A partir do quarto dia, o fungo demonstrou produção estável dessas enzimas, abrindo a possibilidade de estudos para produção continuada em reatores.

Esta pesquisa preliminar avaliou a viabilidade do uso de *P. javanicum* como agente degradante, demonstrando seu potencial. No entanto, estudos complementares são necessários para avaliar sua viabilidade e eficiência em diferentes condições de pH e temperatura, além de investigar se o fungo pode produzir outras enzimas úteis no processo, como lacases.

A obtenção de resultados precisos na determinação da concentração inibitória mínima (CIM), da concentração fungicida mínima (CFM), da inibição de biofilme e da redução da biomassa do biofilme fúngico é fundamental no estudo de *Candida albicans*, devido à sua relevância clínica como patógeno oportunista. Esses parâmetros são essenciais para avaliar a eficácia dos tratamentos e desenvolver terapias mais eficazes, considerando a capacidade de *C. albicans* de formar biofilmes que dificultam o tratamento e promovem a resistência a antifúngicos convencionais.

Por fim, esta pesquisa destaca o papel dos fungos de origem vegetal como fontes promissoras de novos agentes antimicrobianos. Fungos associados a plantas são conhecidos por produzir metabólitos secundários com atividade antifúngica, oferecendo uma alternativa relevante para combater infecções fúngicas persistentes, como a candidíase. Estas descobertas são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes contra *C. albicans*, contribuindo para um manejo clínico mais seguro e eficiente no tratamento de infecções fúngicas.

BIBLIOGRAFIA

ARORA, A. et al. Nanobiotechnological advancements in lignocellulosic biomass pretreatment. **Materials Science for Energy Technologies**, 08 Janeiro 2020. 308-318.

ASIEDU, N. Y.; NEBA, F. A.; ADDO, A. Modeling the attainable regions for catalytic oxidation of renewable biomass to specialty chemicals: Waste biomass to carboxylic acids. **South African Journal of Chemical Engineering**, Outubro 2019. 1-14.

BADRAN, M. R. . E. A. Biofilm formation in microbial pathogenesis: Implications for clinical treatments. **Frontiers in Microbiology, 13, 822179. doi:10.3389/fmicb.2022.822179**, 2022.

BAZIOLI, J. M. E. A. Insights into Penicillium brasilianum Secondary Metabolism and Its Biotechnological Potential. **Molecules 2017**, 20 Junho 2017. 858.

BEG, M. S. et al. Status, supply chain and processing of Cocoa - A review. **Trends in Food Science & Technology**, Agosto 2017. 108-116.

BUSWELL, J. A.; CAI, Y.; CHANG, S.-T. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by Lentinula (Lentinus) edodes. **Federation of European Microbiological Societies**, 1995.

C., G. et al. Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. **Analytical Methods, v. 2**, 2010. 2046-2048.

CLSI—CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved M27-A3, CLSI: Wayne, PA, USA, 2012.

COSTA, J. S. D. et al. Relating features and combustion behavior of biomasses from the Amazonian agroforestry chain. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 04 Novembro 2020. 321-341.

DARMAYANTI, R. F. et al. LIGNOCELLULOSIC MATERIAL FROM MAIN INDONESIAN PLANTATION COMMODITY AS THE FEEDSTOCK FOR FERMENTABLE SUGAR IN BIOFUEL PRODUCTION. **ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences**, Outubro 2019. 3524-3534.

DHYANI, V.; BHASKAR, T. A comprehensive review on the pyrolysis of lignocellulosic biomass. **Renewable Energy**, Dezembro 2018. 695-716.

EIVAZI, F.; TABATABAI, M. A. Glucosidases and galactosidases in soils. **Soil Biology and Biochemistry, v. 20**, 1988. 601-606.

FIGUEROA, K. H. N.; GARCÍA, N. V. M.; VEGA, R. C. Cocoa By-products. **Food Wastes and By-products: Nutraceutical and Health Potential**, 15 Novembro 2019.

GOMEZ, R. . E. A. Sustainable production of natural fungal metabolites for therapeutic applications. **Environmental Sustainability, 5. doi:10.1016/j.envsus.2022.02.004**, 2022. 213-229.

HANDOJO, L.; TRIHARYOGI, H.; INDARTO, A. Cocoa bean shell waste as potential raw material for dietary fiber powder. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture**, 10 Maio 2019. 485-491.

HOUBRAKEN, J. E. A. Classification of Aspergillus, Penicillium, Talaromyces and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. **Studies in Mycology**, 1 Março 2020. 5-169.

JAMAL, M. . E. A. Inhibition of biofilm formation and reduction of biomass as key factors in combating microbial resistance. **Journal of Applied Microbiology, 133(1). doi:10.1111/jam.15502**, 2022.

KHAN, S. M. . E. A. Natural fungal metabolites with antimicrobial potential: A review of recent developments. **Frontiers in Microbiology, 787264. doi:10.3389/fmicb.2022.787264**, 2022. 13.

KUCHARSKA, K. et al. Pretreatment of Lignocellulosic Materials as Substrates for Fermentation Processes. **MDPI**, 10 Novembro 2018. 32.

KUMAR, B. et al. Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: An emerging biorefinery concept. **Fuel Processing Technology**, Março 2020. 24.

LEITE, R. S. R. et al. Productionand characteristics comparison of crude beta-glucosidases produced by microorganisms Thermoascus aurantiacus e Aureobasidium pullulans in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, 2008. 391-395.

LU, F. et al. Valorisation strategies for cocoa pod husk and its fractions. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, Dezembro 2018. 80-88.

MENDOZA-MENESES, C. J.; FEREGRINO-PÉREZ, A. A.; GUTIÉRREZ-ANTONIO, C. Potential Use of Industrial Cocoa Waste in Biofuel Production. **Journal of Chemistry**, 06 Dezembro 2021. 11.

MEZA-SEPÚLVEDA, D. C. et al. Bio-Based Value Chains Potential in the Management of Cacao Pod Waste in Colombia, a Case Study. **MDPI**, 5 Abril 2021.

MOURA, C. L. A.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. **Determinação da Atividade de Invertase em Extratos Enzimáticos**. Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza, CE, p. 17. 2007.

NAYAK, N. . E. A. Fungal secondary metabolites as antimicrobials: Potential and challenges. **Journal of Applied Microbiology, 132(3). doi:10.1111/jam.15025**, 2022. 939-953.

NUNES, E. V. D. S. **Investigação biológica e química dos fungos endofíticos isolados de Galianthe thalictroides com atividade antagônica frente ao fitopatógeno Sclerotinia sclerotiorum**. IQAr - UNESP. Araraquara, p. 131. 2023.

OLIVEIRA, A. H. et al. Anti-inflammatory activity of Vismia guianensis (Aubl.) Pers. extracts and antifungal activity against Sporothrix schenckii. **J. Ethnopharmacol, 195**, 2017. 266-274.

OLUGOSI O. A., A. J. O. . A. I. A. . O. G. E. A. A. O. A. Nutritional enhancement of cocoa pod husk meal through fermentation using Rhizopus stolonifer. **AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY**, 31 Outubro 2019. 901-908.

ORLANDELLI, R. C. et al. ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL: PRODUÇÃO POR FUNGOS E APLICAÇÕES. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, dez. 2012. 97-109.

OSTROSKY, E. A. et al. Methods for evaluation of the antimicrobial activity and determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of plant extracts. **Braz. J. Pharmacogn, 18.**, 2008. 301–307.

PAZUTTI, L. V. B.; CHAER, G. M. **Desenvolvimento de metodologia de baixo custo para análise de beta-glucosidase em solos**. Embrapa Agrobiologia. Seropédica, RJ, p. 28. 2012.

PEREIRA, J. D. C. et al. Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potencial use in sugarcane bagasse saccharification. **Journal of Applied Microbiology**, 11 Janeiro 2015.

PEREIRA, R. G. . E. A. Fungal secondary metabolites: A promising source for drug discovery. **Microorganisms, 1239. doi:10.3390/microorganisms11051239**, 2023. 11(5).

SHARMA, H. K.; XU, C.; QIN, W. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuels and Bioproducts: An Overview. **Waste and Biomass Valorization**, 28 Agosto 2017. 235-251.

SMITH, E. . E. A. Antifungal resistance and the importance of determining minimum inhibitory and fungicidal concentrations. **ournal of Fungal Biology, 10(2). doi:10.1016/j.jfugbi.2023.03.006**, 2023. 113-123.

SUMNER, J. B. Dinitrosalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. **The Journal of Biological Chemistry, v. 47**, 1921. 5-9.

SUMNER, J. B. The estimation of sugar in diabetic urine, using dinitrosalicylic acid. **The Journal of Biological Chemistry, v. 62**, 1924. 287-290.

SUMNER, J. B. A more specific reagent for the determination of sugar in urine. **The Journal of Biological Chemistry, v. 65**, 1925. 393-395.

SUMNER, J. B.; HOWEL, S. F. A method for determination of saccharase activity. **The Journal of Biological Chemistry, v. 108**, 1934. 51-54.

SURVAWANSHI, R. K. . E. A. Antimicrobial metabolites from fungi: recent advances and future perspectives. **Science Progress**, 2021. 104(3).

SUSANTI, R. F.; ALVIN, S.; KIM, J. Toward high-performance hard carbon as an anode for sodium-ion batteries: Demineralization of biomass as a critical step. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, Novembro 2020. 317-329.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. S. **Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos**. Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza, CE, p. 25. 2013.

ZAGO, C. E. et al. Dynamics of biofilm formation and the interaction between Candida albicans and methicillin-susceptible (MSSA) and -resistant Staphylococcus aureus (MRSA). **PLoS ONE, 13, e0123206.**, 2015.

ZAIDI, S. F. . E. A. Fungal-derived bioactive compounds in the fight against antibiotic resistance. **Fungal Biology Reviews, 38. doi:10.1016/j.fbr.2023.02.001**, 2023. 74-88.