



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS AGRÁRIAS
GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO



KARIANE CAVALCANTE VASCONCELOS DE LIMA

Produção de Celulases por Isolados de *Trichoderma* spp.

RIO LARGO – ALAGOAS

2021

KARIANE CAVALCANTE VASCONCELOS DE LIMA

Produção de Celulases por Isolados de *Trichoderma* spp

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Universidade Federal de Alagoas, como parte das exigências para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientadora: Prof.^a Dra. Tania Marta Carvalho Dos Santos

RIO LARGO – ALAGOAS

2021

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias
Bibliotecária Responsável: Myrtes Vieira do Nascimento

L732p Lima, Kariane Cavalcante Vasconcelos de
Produção de celulases por isoladores de *Trichoderma* spp. / Kariane
Cavalcante Vasconcelos de Lima – 2021.
34 f.; il.

Monografia de Graduação em Agronomia (Trabalho de Conclusão de
Curso) – Universidade Federal de Alagoas, Campus de Engenharias e
Ciências Agrárias. Rio Largo, 2021.

Orientação: Profa. Dra. Tania Marta Carvalho dos Santos

Inclui bibliografia

1. Avicelase. 2. Carboximetilcelulase. 3. Vermelho congo. I. Título.

CDU 57

FOLHA DE APROVAÇÃO

AUTOR: KARIANE CAVALCANTE VASCONCELOS DE LIMA

Produção de Celulases por Isolados de *Trichoderma spp*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Universidade Federal de Alagoas, como parte das exigências para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo e aprovada em 08 de Julho de 2021



Documento assinado digitalmente
Tania Marta Carvalho dos Santos
Data: 13/07/2021 11:08:35-0300
CPF: 110.008.178-06
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof.^a Dra. Tania Marta Carvalho Dos Santos

Orientadora

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Yamina Coentro Montaldo
Examinadora Interna

Msc. João Manoel da Silva

Examinador Interno

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha querida tia Osineide Cavalcante da Silva (*In memoriam*), que sempre foi um exemplo de mulher de batalhadora, esforçada, amorosa, carinhosa, fiel a Deus, protetora dos animais, inteligente, elegante e que deixou um lindo legado que servirá como exemplo para as minhas grandes conquistas futuras. Sempre estará em meus pensamentos e em meu coração!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter chegado até aqui, pois sem Ele eu nada conseguiria e pela sua infinita misericórdia em minha vida.

Agradeço aos meus pais, José Ivaldo Constante de Vasconcelos e Osileide Cavalcante Vasconcelos, por sempre estarem dispostos a me ajudar, apoiar e por me incentivarem a não desistir dos meus objetivos.

Agradeço a minha orientadora Prof.^a Dra. Tania Marta Carvalho Dos Santos por toda paciência e dedicação, foi uma das peças principais para essa conquista.

Agradeço ao meu companheiro, meu amigo, meu amor, meu esposo Wesley Gomes de Lima que esteve ao meu lado me ajudando, me encorajando e me incentivando ao longo da minha vida acadêmica.

Agradeço ao meu sobrinho Ryan Cavalcante Vasconcelos Lima, Minha irmã Kaline Cavalcante Vasconcelos, Meu irmão Kelvin Cavalcante Vasconcelos por serem pontos de apoio para mim, alívio para os dias nublados, eu não seria quem sou se eu não tivesse vocês. E ao meu cunhado e Engenheiro Agrônomo Dr. Nadielan da Silva Lima por ser um exemplo para mim.

Agradeço também aos meus amigos, em especial o Doutorando Mirandy Dias que sempre esteve disposto a me ajudar em todos os momentos.

RESUMO

DE LIMA, K. C. V. PRODUÇÃO DE CELULASES POR ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. 2021, 32p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia). Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo.

As celulases são um complexo de enzimas necessárias para a completa solubilização de celulose em açúcares, desempenhando assim um papel primordial no ciclo natural do carbono através da hidrólise das estruturas lignocelulósicas. Além de suas aplicações na indústria farmacêutica, as celulases também são utilizadas na indústria têxtil, na alimentação animal e humana; na indústria de celulose; assim como na produção de etanol. No entanto, o custo da preparação enzimática é um grande impedimento na sua comercialização e uso em diferentes processos industriais. Dentre os fungos filamentosos, os do gênero *Trichoderma* se destacam pela alta produção enzimática exibida. Diante do proposto, objetivou-se avaliar e selecionar isolados de *Trichoderma* capazes de produzir celulases. Assim, a partir de amostras de palha de cana-de-açúcar foram obtidos 25 isolados de *Trichoderma* spp. A primeira etapa de avaliação consistiu na observação do crescimento dos isolados a partir da degradação do substrato microcelulósico cristalino, Avicel, e o teste do vermelho congo, resumiu-se na determinação do halo de hidrólise e na medida do índice enzimático (diâmetro halo hidrólise. Diâmetro halo colônia⁻¹) de cada isolado. Posteriormente os isolados foram avaliadas para produção de Avicelase (exocelulase) e Carboximetilcelulase (endocelulase). A atividade da CMCase variou de 0,499 a 3,787 UI.MI⁻¹. Os isolados 24 e 25 apresentaram maior atividade (3,360 e 3,787 UI.MI⁻¹ respectivamente) diferindo estatisticamente dos demais, pelo teste de Scott-Knott (p<0,05). Nos resultados para atividade para avicelase, observou-se que cinco isolados 10, 11, 12, 13 e 16 destacadas dos demais alcançando 2,466, 2,238, 2,434, 2,265, 2,519 UI.ml⁻¹.

PALAVRAS CHAVE: Avicelase, carboximetilcelulase, vermelho congo

ABSTRACT

DE LIMA, K. C. V. **PRODUCTION OF CELULASES BY ISOLATES OF *Trichoderma* spp.** 2021, 32p. Monography. Campus of Engineering and Agrarian Sciences, Federal University of Alagoas, Rio Largo.

The Cellulases are a complex of enzymes necessary for the complete solubilization of cellulose in sugars, thus playing a key role in the natural carbon cycle through the hydrolysis of lignocellulosic structures. In addition to their applications in the pharmaceutical industry, cellulases are also used in the textile industry, in animal and human food; in the pulp industry; as well as in the production of ethanol. However, the cost of enzyme preparation is a major impediment to its commercialization and use in different industrial processes. Among the filamentous fungi, those of the *Trichoderma* genus stand out for their high enzyme production. In view of the proposal, the objective was to evaluate and select *Trichoderma* isolates capable of producing cellulases. Thus, from sugarcane straw samples, 25 *Trichoderma* spp. The first evaluation step consisted of observing the growth of the isolates from the degradation of the crystalline microcellulosic substrate, Avicel. and the Congo red test was summarized in the determination of the hydrolysis halo and the measurement of the enzymatic index (halo hydrolysis diameter, colony⁻¹ halo diameter) of each isolate. Afterwards, the isolates were evaluated for the production of Avicellase (exocellulase) and Carboxymethylcellulase (endocellulase). CMCase activity ranged from 0.499 to 3.787 UI.mL⁻¹. Isolates 24 and 25 showed higher activity (3.360 and 3.787 UI.mL⁻¹ respectively), differing statistically from the others, according to the Scott-Knott test ($p < 0.05$). In the results for activity for avicelase, it was observed that five isolates 10, 11, 12, 13 and 16 detached from the others reaching 2.466, 2.238, 2.434, 2.265, 2.519 UI.ml⁻¹.

KEY WORDS: Avilase, carboxymethylcellulase, Congo Red

SÚMARIO

RESUMO.....	7
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Enzimas Celulolíticas	11
2.1.1 Endoglucanases	13
2.1.2 Exoglucanases	14
2.1.3 β -glicosidasases.....	15
2.2 Micro-organismos Produtores de Celulases	15
2.2.1 FGênero <i>Trichoderma</i>	16
2.2.2 Gênero <i>Trichoderma</i> e a produção de celulase	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Local de Investigação	20
3.2 Isolamento dos micro-organismos.....	20
3.3 Seleção dos isolados celulolíticos.....	20
3.4 Obtenção dos extratos enzimáticos em Fermentação em Estado Sólido (FES)	21
3.5 Preparação e purificação de CMC (carboximetilcelulase) e Avicel marcado com Remazol Brilliant Blue R. (RBB) Fülöp & Ponyi, (1997).....	21
3.6 Ensaio para determinação da atividade enzimática	21
3.7 Delineamento Experimental e Análise estatística	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1 Seleção Qualitativa	23
4.2 Seleção Quantitativa	24
CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

Celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010).

As celulases desempenham um importante papel na bioconversão de materiais celulósicos em biocombustíveis. O grande gargalo para uma aplicação mais ampla de celulases na produção de etanol de segunda geração é o seu custo, especialmente porque grandes quantidades das enzimas são necessárias (DELABONA; FARINA; SILVA; AZZON; PRADELLA, 2012).

A busca por celulases eficientes e alta produtividade na síntese enzimática microbiana são fatores essenciais para aplicação dessas enzimas na produção de bioetanol. As celulases podem ser produzidas por diversos fungos e bactérias. A seleção de cepas fúngicas possuindo alta capacidade de expressão e uma diversidade de enzimas celulolíticas com elevada atividade específica é essencial, a fim de obter complexos enzimáticos capazes de hidrolisar biomassa vegetal a custo reduzido. Os fungos são os organismos mais estudados, devido à sua capacidade de produzir complexos celulolíticos completos e em grandes quantidades. A maior parte dos estudos é focada em fungos com capacidade superior de produzir celulases, como *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, sendo o gênero *Trichoderma* relatado como o mais eficiente na degradação da celulose (LYND; VAN, 2002).

Os extratos de fermentação do fungo *Trichoderma* apresentam vários tipos de atividades hidrolíticas, principalmente xilanase, β -glucanase, celulase, pectinase, lipase e amilase, portanto, seu efeito pode ser multifuncional na degradação de substratos aqueles que apresentam resistência a degradação (FERREIRA; DILLOM, 2004).

As celulases são utilizadas na fabricação de detergentes, na indústria têxtil para descolorimento, amaciamento e bioestonagem, indústria de papel, indústria de extração de óleos vegetais e na alimentação animal como aditivo para silagem e em dietas para monogástricos (DILLOM, 2004).

As enzimas microbianas são obtidas tanto por cultivo superficial em substratos sólidos, como por exemplo: farelo de trigo, milho, aveia, casca de algumas frutas, preparados à base de soja, farinha de trigo, cacau em pó, grãos de cereais, legumes, madeira e palha, como também

podem ser obtidas por cultivo submerso com emprego de substratos líquidos. O substrato deve conter uma fonte de carbono (fonte energética) e uma fonte de nitrogênio que permitam a proliferação celular. Além disso, pode ser necessário também nutrientes específicos e determinados minerais para crescimento (FELLOWS, 1994).

Diante do exposto, objetivou-se e avaliar isolados de *Trichoderma* quanto ao seu potencial para hidrólise da celulose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 .Enzimas Celulolíticas

A celulose é o mais abundante polímero orgânico no planeta, de acordo com a Indústria Brasileira de Árvores, foram produzidas 21 milhões de toneladas no ano de 2020 no País (IBA, 2021). O Brasil é hoje o maior exportador de celulose do mundo, ficando em segundo lugar apenas quanto à produção, perdendo para os Estados Unidos, além do mercado brasileiro, os maiores exportadores de celulose são a China, os EUA, o Japão e a Europa.

A celulose pode ser definida como um polímero de glicose formado por ligações β -1,4. O número de moléculas de glicose presentes em uma única molécula de celulose varia de 15 a 15.000, havendo, em média, 3.000 unidades. A celulose destaca-se por ser um carboidrato insolúvel e resistente a várias reações químicas. Além disso, é o principal componente da parede celular da célula vegetal, representando cerca de 30% da massa seca em paredes primárias e de 50% a 80% em secundárias (SANTOS, 2020).

O polímero composto por unidades de glicose, é o polissacarídeo responsável pela resistência mecânica da parede celular. Hemiceluloses e pectinas representam classes diversificadas de polissacarídeos, responsáveis por características dinâmicas da parede celular. A lignina, um complexo fenólico, é responsável pela hidrofobicidade e baixa reatividade da lignocelulose (ANDERSON; KIEBER, 2020).

As cadeias de celulose se encontram organizadas em arranjos ordenados, formando microfibrilas insolúveis, estabilizadas por ligações de hidrogênio entre as cadeias. Estas microfibrilas apresentam regiões com elevado grau de cristalinidade, apresentando cadeias de glicana fortemente ligadas em paralelo, denominadas regiões cristalinas e as regiões com menor grau de ordenação são denominadas regiões amorfas. Essas propriedades estruturais resultam em uma elevada resistência à hidrólise ácida ou enzimática (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

A complexidade estrutural da lignocelulose a torna um excelente indutor para a produção de coquetéis multienzimáticos por bactérias e fungos. A utilização de fontes lignocelulósicas para a produção de coquetéis enzimáticos tem sido abordada, e apresenta potencial para redução dos custos associados à etapa de sacarificação, uma vez que os coquetéis poderiam ser produzidos no mesmo local onde a sacarificação seria processada (on-site production) (SIQUEIRA et al., 2020).

Celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (CASTRO; PEREIRA JUNIOR 2010).

A produção de celulases em escala industrial começou em meados da década de 1980, visando sua aplicação como um aditivo para ração animal, de forma a aumentar a digestibilidade de rações por ruminantes e monogástricos. Em seguida, essas enzimas começaram a ser utilizadas como um insumo para a indústria de alimentos, com o objetivo de melhorar propriedades sensoriais de massas (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010).

Desde a década passada, a celulase é a terceira enzima mais utilizada na indústria em vários processos, atrás apenas das proteases e amilases, e é a segunda maior enzima industrial em volume de dólar, cuja demanda está aumentando por aplicações industriais, como indústria de detergentes, têxtil, de processamento de papel, de ração animal, de suco de frutas, alimentos e bebidas, biocombustíveis (GAETE; TEODORO; MARTINAZO, 2020).

Na indústria de alimentos, as celulases também passaram a ser utilizadas no processamento de bebidas, promovendo a clarificação de sucos de frutas e vinhos e a manutenção de uma reologia estável do produto final. Posteriormente, começaram a ser utilizadas em larga escala nas seguintes indústrias: têxtil, nos então implementados processos de biopolimento (desfibrilação de tecidos como algodão, linho, lã e viscose) e bioestonagem (amaciamiento e desbotamento do brim); de polpa e papel, para a modificação controlada de propriedades mecânicas da polpa e liberação de tintas da superfície das fibras a ser recicladas; e em lavanderia, de forma a aumentar o brilho, a remoção de sujeiras e a maciez dos tecidos. Já na década de 90, as celulases, juntamente com as hemicelulases, representavam mais de 20% do mercado mundial de enzimas (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010).

De acordo com o Relatório de Pesquisa de Mercado Global Cellulase (CAS 9012-54-8) publicado em 2018, a Ásia é o maior consumidor de celulase, com uma 30 participação de

mercado de receita de cerca de 32,84% em 2016. Além disso, os dados relatados mostraram 29,71% da demanda do mercado de celulase em rações animais, 26,37% em alimentos e bebidas, e 13,77% na indústria têxtil em 2016. Este mesmo relatório prevê que as aplicações de celulases chegarão a 2.300 milhões de dólares até o final de 2025, a uma taxa composta de crescimento anual de 5,5% durante o período 2018–2025. Esses dados sugerem que a aplicação de celulases nas indústrias está aumentando drasticamente a cada ano. Novozymes e DuPont, da Dinamarca, são os principais produtores de enzimas celulase, fornecendo essas enzimas ao mercado global para aplicações industriais (JAYASEKARA; RATNAYAKE, 2019).

O mercado global deve crescer de US\$ 16 bilhões, em 2018, para US\$ 24,8 bilhões, em 2023, com uma taxa de crescimento anual de 9,2% no período. O mercado mundial de enzimas para biocombustíveis foi avaliado em US\$ 623 milhões em 2014. Em 2020, esse valor de mercado deve chegar a quase US\$ 1 bilhão, com taxas de crescimento anuais de 10,4% (EMBRAPA, 2020).

Estima-se que, somente em 2019, quase 30 mil toneladas de enzimas ou preparações enzimáticas tenham sido importadas pelo Brasil, contra 9,3 mil toneladas exportadas. Vários mercados poderão ser beneficiados, em especial as empresas produtoras de enzimas e a agroindústria sucroalcooleira energética, que faz a conversão da biomassa lignocelulósica em combustíveis, eletricidade, calor e compostos químicos derivados (EMBRAPA, 2020).

A classificação das celulases, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, as divide em três grandes grupos: a) Endoglucanases (EGases), que clivam ligações internas da fibra celulósica; b) Exoglucanases (ExGases), que atuam na região externa da celulose; e c) β - glicosidasases (β Gases), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis a glicose (Figura 1).

2.1.1 Endoglucanases

As Endoglucanases (EC 3.2.1.4): tem como nome sistemático 1,4- b-D-glucana-4-glucano-hidrolase, são as enzimas do complexo celulolítico responsáveis por iniciar a hidrólise da molécula de celulose, e pela rápida solubilização do polímero celulósico, devido a liberação de oligossacarídeos com diversos graus de polimerização. Hidrolisam aleatoriamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, clivando ligações β -1,4 na região central da molécula e liberando açúcares e oligossacarídeos e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor e um não redutor (LYND, et al., 2002; CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010)A carboximetilcelulose (CMC) é utilizada como substrato preferencial para a

atividade dessas enzimas, devido ao seu alto grau de polimerização e baixa cristalinidade (SANTOS, 2014; FLORENCIO, 2017).

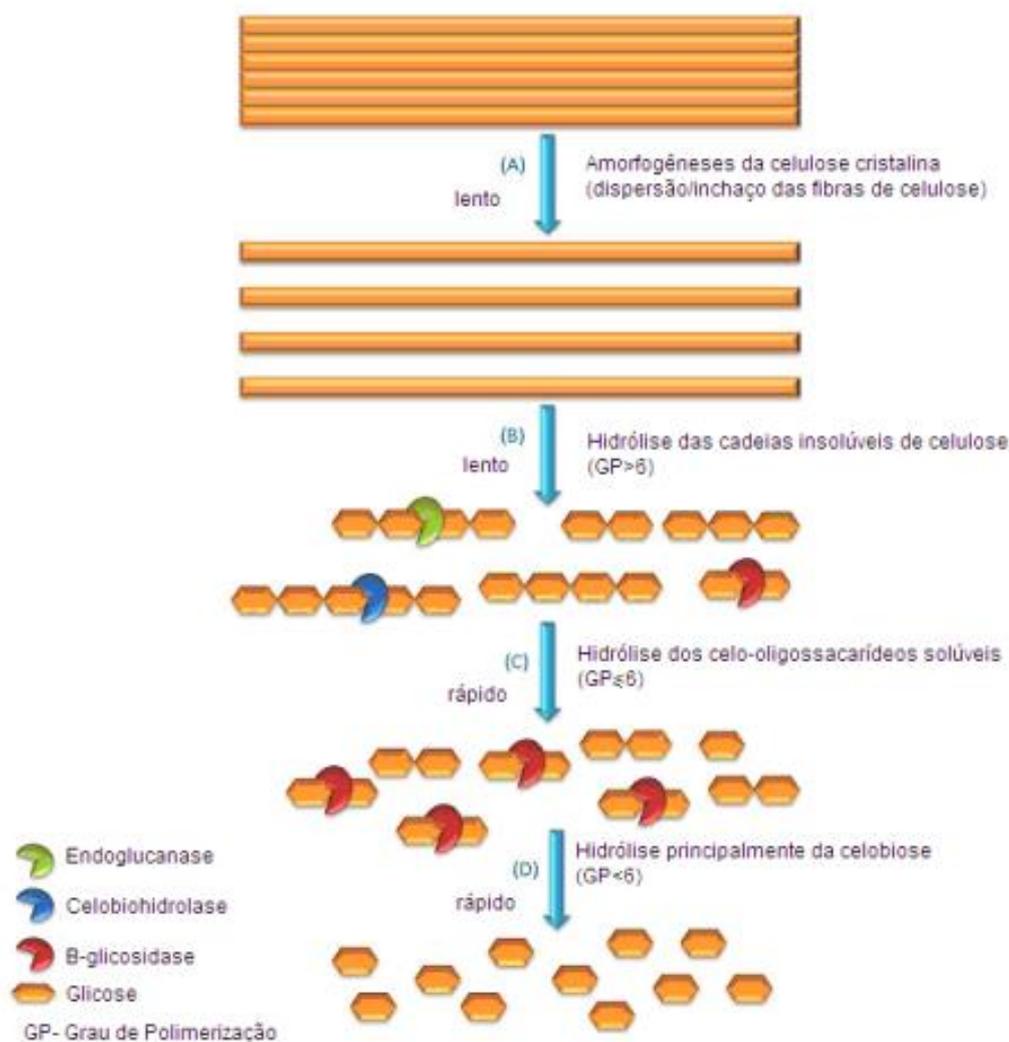


Figura 1 Ação sinérgica das celulasas (FLORENCIO, 2011; Adaptado de ARANTES; SADLER, 2010).

2.1.2 Exoglucanases

O grupo das exoglucanases é constituído pelas celobiohidrolases: β -1,4 celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) (CBHs) e glucanohidrolases (EC 3.2.1.74) (GHs). Essas enzimas hidrolisam a fibra celulásica de elevada importância, liberando glicose diretamente do polímero (LYND et al., 2002). Atuam nas extremidades da molécula de celulose microcristalina, liberando unidades de celobiose (CAO; TAN, 2002).

As CBHs participam da hidrólise primária da fibra e são responsáveis pela amorfogênese, que é um fenômeno ainda não elucidado completamente, porém sabe-se que envolve uma ruptura física do substrato, acarretando na desestratificação das fibras, pelo aumento das regiões

intersticiais. A amorfogênese promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar as regiões cristalinas mais expostas às celulases (ZHANG; LYND, 2004; FLORENCIO, 2011).

As exoglucanases atuam de maneira progressiva, em porções redutoras e não redutoras das cadeias da celulose, podendo liberar tantoglicose (glicanohidrolases) ou celobiose (celobiohidrolases) como produtos principais. Atuam nas extremidades da molécula de celulose em sua região cristalina, liberando unidades de celobiose, aumentando a taxa de hidrólise por tornar as regiões cristalinas mais expostas às celulases.

As celobiohidrolases podem ser de dois tipos: a tipo I, que hidrolisa terminais redutores, e as do tipo II, que hidrolisa terminais não redutores. As CBHs sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose, por isso é de grande importância a atuação de outras enzimas do complexo celulolítico – as β -glicosidades (BOM et al., 2008; PEREIRA, 2016). Para avaliação da exoglucanase, a celulose cristalina vem sendo usada por possuir baixas concentrações de fibra amorfa, tornando-se menos acessível às endoglucanases, por possuir baixo grau de polimerização (HARGREAVES, 2008).

2.1.3 β -glicosidases

Grupo representado pelas β -1,4-glicosidases (EC3.2.1.21), conhecidas também como celobiasas, catalisam a hidrólise da celobiose ou de celodextrinas solúveis em glicose. e alguns oligossacarídeos solúveis em glicose. As celobiasas reduzem a inibição das endoglucanases e exoglucanases por serem responsáveis pelo aumento do rendimento total dos açúcares fermentescíveis (PEREIRA, 2016). As celobiohidrolases, também sofrem inibição por seu produto de hidrólise (WILSON, 2008). Tomando-se vantagem do fato de que a celobiose não é hidrolisada por endoglucanase ou exoglucanase, esse substrato é utilizado para quantificação da atividade de β -glucosidase, quantificando a glicose liberada no ensaio (HARGREAVES, 2008).

2.2 Micro-organismos Produtores de Celulases

As celulases são produzidas por uma grande variedade micro-organismos incluindo bactérias anaeróbicas (*Clostridium*, *Ruminococcus*, etc) e aeróbicas (*Cellulomonas*, *Thermobifida* etc), actinomicetos (*Streptomyces*), fungos filamentosos (*Trichoderma*, *Bulgaria*, *Helotium*, *Poria*, *Aspergillus*, etc), plantas (*Fragaria*) e animais (moluscos e insetos) (LYND et al., 2002; PALOMER et al., 2004).

Dentre todos os micro-organismos produtores de celulases, os fungos filamentosos são os mais utilizados no processo industrial. Suas propriedades fisiológicas, enzimológicas e bioquímicas permitem seu crescimento em substratos sólidos e a bioconversão dos mesmos, aumentando assim a capacidade de hidrólise por estes micro-organismos (SOCCOL et al., 1994; SCHEFFER, 2018).

Os fungos representam um clado importante na filogenia dos seres vivos. São eucariontes e heterotróficos que se reproduzem por meio de esporos. A natureza única dos fungos, quando comparados a outros organismos, consiste em estratégias incomparavelmente diferentes para reprodução, que pode vir a ser sexuada e, ou assexuada, o que leva ao conceito da existência de uma variedade de espécies sobrepostas (ESPOSITO ;SILVA, 1998).

O crescimento dos fungos filamentosos, é uma combinação da extensão atípica das hifas associado à geração de novas hifas por ramificação do micélio, permite ao fungo penetrar no substrato sólido e formar uma estrutura sólida, o que confere uma vantagem sobre os micro-organismos unicelulares na colonização do substrato sólido e utilização dos nutrientes disponíveis. Além disso, as enzimas hidrolíticas são excretadas pelas hifas sem grande diluição como ocorre na fermentação submersa, o que faz com que sua ação seja muito mais eficiente, permitindo adentrar no substrato aumentando a acessibilidade de todos os nutrientes disponíveis nas partículas (RAIMBAULT, 1998).

2.2.1 Gênero *Trichoderma*

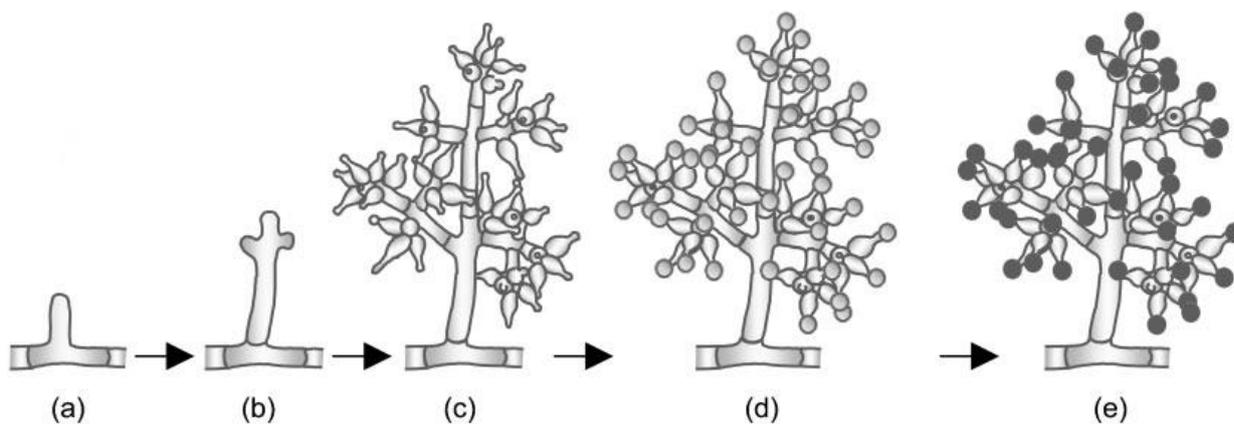
Os fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Trichoderma* foram descritos inicialmente por Persoon e Gray em 1801. Pertencem ao filo *Ascomycota*, subfilo *Pezizomycotina*, classe *Sordariomycetes*, subclasse *Hypocreomycetidae*, ordem *Hypocreales* e família *Hypocreaceae*. Mais de 250 espécies de *Trichoderma* são aceitas atualmente e podem ser identificadas por meio de filogenia molecular, e são agrupadas em cinco seções: a) *Longibrachiatum*, b) *Pachybasium*, c) *Trichoderma*, d) *Hypocreanum* e e) *Saturnisporum* (a qual foi incluída em *Longibrachiatum*) (ABREU & PFENNING, 2019; SOUZA, 2015).

Trichoderma pertence à classe *Sordariomycetes* do filo *Ascomycota* e, portanto, nas espécies onde a fase sexuada é conhecida, esta é caracterizada pela formação de corpos de frutificação do tipo peritécio, formados em estromas de coloração verde, amarelada, creme ou

marrom, produzidos sobre o substrato colonizado. Nos peritécios são formados ascos cilíndricos contendo oito ascósporos bicelulares, que se fragmentam em esporos esverdeados ou hialinos (JAKLITSCH, 2009).

Na fase assexuada, são formados, a partir do micélio vegetativo, conidióforos com um eixo central e ramificações laterais, que terminam em espirais divergentes de células conidiogênicas do tipo fiálide, com formato de garrafa ou alongadas. Na ponta das fiáldes são produzidos os típicos conídios unicelulares, esféricos, ovais ou alongados, de cor verde na maior parte das espécies. Os conidióforos são comumente agregados em pústulas ou ‘tufos’ espalhados pela colônia (Figura 2) (ABREU; PFENNING., 2019).

Figura 2. *Trichoderma* em suas fases de crescimento: a) hifa, b) conidióforo jovem, c) fiáldes mucronadas,



d) esporos imaturos, e) esporos maduros. (Adaptada de (STEYAERT, et al. 2010).

As espécies apresentam crescimento rápido de colônias, atingindo de dois a nove cm de diâmetro após quatro dias de cultivo em meio de cultura (ESPOSITO & SILVA, 1998). As colônias podem se apresentar dispersas e flocosas ou compactadas em tufos. O tamanho e o formato dos conídios são muito variáveis e de limitado valor taxonômico.

É observado eventualmente a existência de clamidósporos, os quais são esporos assexuais, originados pela modificação dos segmentos da hifa, podendo ser intercalados ou terminais. Os conídios podem ser verdes, amarelos ou em tons verdes amarelados. Fatores como temperatura, umidade, nutrientes, tipo de solo, microbiota, aeração, pH e teor de matéria orgânica influenciam na sobrevivência de *Trichoderma* no solo ou substrato (HOWELL, 2003).

O gênero *Trichoderma* possui uma distribuição bastante ampla ocorrendo no mundo inteiro em quase todos os tipos de solos e outros habitats naturais, especialmente naqueles que contém ou consistem de matéria orgânica, e suas espécies são componentes dominantes da microbiota do solo nos mais diversos ambientes (KARBOUNE, GERAERT, & KERMASHA, 2008).

Fungos do gênero *Trichoderma* são cosmopolitas e apresentam importantes funções ecológicas, pois participam da decomposição e mineralização de resíduos vegetais (MENEZES et al., 2009). Eles estão presentes com frequência em solos de regiões de clima temperado e tropical, podendo ser isolados das serapilheiras onde estão presentes com grande quantidade de micélio; também colonizam madeira, onde frequentemente é encontrada a fase sexual, teleomórfica (gênero *Hypocrea*) (MACHADO et al., 2012).

2.2.2 Gênero *Trichoderma* e a produção de celulase

A partir da década de 1960 descobriu-se que preparados fúngicos de enzimas extracelulares eram responsáveis pela ação hidrolítica, despertando o interesse por esses micro-organismos. A ideia de aproveitar essas enzimas na conversão de resíduos celulósicos em produtos de interesse alimentar e energético surgiu em 1973 e, em 1979 a equipe do Laboratório de Pesquisas em Natick, Massachussets, anunciou o isolamento de cepas mutantes de *Trichoderma reesei* com poder hidrolítico aproximadamente vinte vezes superior ao da cepa nativa (BORTOLLAZO, 2011).

T. reesei é o fungo mais bem estudado dentro desse gênero, conhecido pela alta capacidade de produzir e secretar enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, sendo amplamente utilizado na indústria na conversão da biomassa lignocelulósica em bioetanol (PAULA et al., 2018). Foi originalmente isolado das Ilhas Salomão durante a Segunda Guerra Mundial, nomeado como *T. reesei* QM6a. Mediante uma série de experimentos de mutagênese induzida dessa linhagem, originou-se a linhagem hipercelulolítica, conhecida como *T. reesei* RUT-C30 (BISCHOF et al., 2016; BORIN et al., 2017; PETERSON & NEVALAINEN, 2012). A maquinaria celulolítica de *T. reesei* é composta por duas celobiohidrolases (CBHs) (Cel7A e Cel6A), cinco endoglucanases (Cel7B, Cel5A, Cel12A, Cel61A e Cel45A), e duas β -glicosidases (BGLI e BGLII), além de inúmeras hemicelulases incluindo xilanases, mananases e galactosidases (SILVA et al., 2012).

Este fungo produz duas celobiohidrolases (CHB I e CHB II) e duas endoglucanases (EG1 e EG2), em proporção aproximada de 6:2:1:1, que juntas chegam a somar 90% do coquetel enzimático de celulases, enquanto β -glicosidases tipicamente secretadas por estes fungos juntas chegam a menos de 1% (MARGEOT, et al., 2009).

T. harzianum tem sido explorado, principalmente, no controle biológico de fungos causadores de doenças em plantas, reduzindo a aplicação de agrotóxicos e pesticidas em lavouras, com conseqüente redução de emissão de poluentes químicos. Estudos com esse fungo

têm demonstrado que este fungo é capaz de produzir um complexo celulolítico com maior atividade β -glicosidase quando comparado ao *T. reesei* (NEUREITER et al., 2002).

Além disso, *T. harzianum* secreta de um sistema enzimático eficiente e bem equilibrado das d celulases β -glicosidases, endoglucanases e exoglucanases, sendo capaz de hidrolisar eficientemente substratos celulolíticos (solúveis e insolúveis) em glicose (JEOH et al., 2008; CASTRO et al., 2010). Isso representa uma vantagem considerável sobre *T. reesei*, uma vez que o extrato enzimático do fungo exibe um baixo nível de atividade de β -glicosidase, o que dificulta um processo de completa hidrólise e a fermentação da celulose em etanol (ALVES et al., 2016; COLUSSI et al., 2012).

A enzima celobiohidrolase I de *T. harzianum* IOC-3844 foi caracterizada bioquímica e biofísicamente por Colussi et al. (2011) revelando um potencial para aplicações biotecnológicas, mostrando alta atividade contra Avicel. (GENEROSO, 2012) clonaram uma endoglucanase III (EGIII) de *T.harzianum* IOC3844 e obtiveram altas concentrações de enzima expressas, além de características apropriadas para uso em coquetéis enzimáticos. Horta (2014) delineou o perfil transcriptômico de *T. harzianum* IOC-3844 quando crescido em diferentes substratos (lactose, avicel e bagaço de cana delignificado), permitindo a identificação de sequências de genes com potencial aplicação à hidrólise enzimática. MELLO; POLIKARPOV (2014) clonou CBH1 de *Trichoderma harzianum* e verificou aumento da hidrólise da celulose quando suplementada em coquetel comercial.

DELABONA et al (2015) descreveram um isolado de *T. harzianum* coletado da floresta amazônica como candidata potencial para a formulação de misturas enzimáticas otimizadas para a sacarificação de biomassa vegetal. Suplementação do coquetel enzimático produzido por *T. harzianum* com pectinase e α -L-arabinofuranosidase teve efeito positivo na hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado. As atividades das duas enzimas operaram sinergicamente, e a suplementação resultou em maior liberação de açúcar. Os dados sugeriram papéis importantes para a pectinase e α -L-arabinofuranosidase nas sinergias enzimáticas inerentes ao bagaço de cana-de-açúcar hidrólise, tornando o processo mais eficaz e competitivo.

AL ROCHA et al. (2016) verificaram a produção de um coquetel enzimático ativo produzido pelo cultivo de *T. harzianum* no bagaço de cana-de-açúcar. As enzimas componentes foram identificadas por LCMS - MS. As glicosil hidrolases foram a classe de proteínas mais abundante, representando 67% do total de proteínas secretadas. Outras enzimas ativas de carboidratos envolvidas na desconstrução da parede celular incluíram monoxigenases polissacarídicas líticas (AA9), módulos de ligação de carboidratos, esterases de carboidratos e inchaço, todos presentes em níveis de 1%.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de Investigação

Os ensaios foram conduzidos no laboratório de Microbiologia do Centro de Engenharias e Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (CECA/UFAL).

3.2 Isolamento dos micro-organismos

Amostras da palha depositada no solo após a colheita da cultura, foram coletadas na área de cultivo de cana-de-açúcar do CECA/UFAL. Uma amostra de 10g foi homogeneizada com 90ml de solução de NaCl a 0,9%, e alíquotas foram plaqueadas em meio de cultura, com celulose como única fonte de carbono suplementado com tetraciclina (100 mg L^{-1}), e incubadas a $28 \text{ }^\circ\text{C}$. Após o crescimento em placas, os isolados foram coletados, tendo-se buscado a diversidade morfológica das colônias e repicados em BDA para purificação. Após crescimento a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ por 7 dias, discos de aproximadamente 1 cm de diâmetro da porção central da colônia, com micélio, foram recortados e armazenados à temperatura ambiente em vidros de cor âmbar com água esterilizada.

3.3 Seleção dos isolados celulolíticos

A seleção foi realizada pela medida do halo de degradação em profundidade da celulose. Os isolados foram inoculados em tubos de ensaio medindo $15 \times 25 \text{ cm}$ contendo meio sintético (MS) (NaNO_3 3,0, K_2HPO_4 1,0, MgSO_4 0,5, KCl 0,5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01, celulose 5,0 (Avicel), Agar 20,0, água destilada 1000ml) como única fonte de carbono. Os esporos utilizados para o teste do vermelho congo foram obtidos a partir da aplicação da técnica do ponto central, com a ajuda da agulha de platina. Uma quantidade mínima de esporos foi retirada da placa contendo o fungo cultivado em meio de triagem e aplicado no centro do tubo contendo MS. As culturas foram incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente foram feitas observações visuais aos 5, 7, 9, 11, 15 e 22 dias de crescimento.

Para observação da profundidade do halo de degradação, a cada tubo foram adicionados 3,0 mL de uma solução do corante vermelho congo ($2,5 \text{ g L}^{-1}$). Após 15 min, a solução foi descartada e as culturas lavadas com 10 mL de solução de NaCl 1 mol L^{-1} . Nos isolados produtores de celulasas observa-se um halo de cor clara com as bordas laranja, indicativo das áreas de hidrólise.

3.4 Obtenção dos extratos enzimáticos em Fermentação em Estado Sólido (FES)

Os isolados foram cultivados em erlenmeyers de 125 mL contendo 5 g de farelo de aveia e 5mL, de água de torneira. O teor de umidade inicial do substrato ($m:v^{-1}$) após a adição da água e do inóculo foi de 80% em base úmida. Conídios de células crescidas em meio de conservação, por 9-10 dias foram ressuspensos assepticamente com solução de NaCl 0,9% em uma concentração de 10^7 mL. Os meios inoculados foram mantidos a 28 ± 2 °C por 10 dias.

Para obtenção dos extratos enzimáticos, após o crescimento foram adicionados 30mL de água destilada esterilizada gelada aos isolados, em seguida foram mantidos em refrigeração por três horas a 4 °C, posteriormente o material foi filtrado e os sobrenadantes usados como fonte de celulase.

3.5 Preparação e purificação de CMC (carboximetilcelulase) e Avicel marcado com Remazol Brilliant Blue R. (RBB) Fülöp & Ponyi, (1997)

A uma solução 1 % de CMC em água destilada, foi adicionado 1,0 % de $NaCO_3$ lentamente e sob agitação por 5 minutos. A mistura foi então alcalinizada com 1,0% NaOH sólido sob agitação a 60 °C por 10 minutos. Após esse período foi adicionado 0,7% de RBB o qual foi mantido sob agitação a 60 °C por 2 horas, em seguida, ainda sob agitação, gotejou-se etanol:acetona 4:1(v/v). O produto precipitado foi coletado em filtro de náilon (0,2 mm) e lavado com etanol, absoluto. Em seguida o precipitado então diluído (1%) em água destilada sob agitação por 60 minutos. A solução foi precipitada novamente e conservada em refrigerador. A avicel também foi preparada conforme descrito acima.

3.6 Ensaio para determinação da atividade enzimática

A quantificação da atividade celulolítica foi realizada utilizando-se diferentes substratos, dependendo da atividade enzimática analisada. A atividade da CMCase (endo-1-4- β -D-glucanase) foi realizada utilizando-se o substrato CM-celulose. Avicelase (atividade exoglucanase 1,4- β -celobiohidrolase) foi determinada utilizando o Avicel Fluca 1%. A determinação ocorreu através da formação dos açúcares redutores durante a incubação da enzima com o substrato específico.

A atividade das enzimas foi determinada em tampão fosfato com pH 6,8, segundo metodologia descrita por FÜLÖP & PONYI (1997) a 0,5 ml de substrato corado foram adicionados 0,25 ml do extrato enzimático e 0,25 ml de tampão fosfato, que foi incubado por

60 minutos a 37 °C. Após incubação a mistura recebeu 2,0 ml de acetona:etanol 1:1 (v/v) quando foi centrifugada a 3000g por 2 minutos, a absorbância foi feita em espectrofotometro a 590nm, e a atividade expressa em U.mg⁻¹.

O método foi previamente padronizado por uma curva padrão de glicose (0,1 a 1,0 mg/mL), sendo a unidade de atividade (U) definida como a quantidade de enzima que hidrolisa um μmol de substrato por minuto, nas condições de ensaio. A atividade total (U total) = μmol/mL x volume do filtrado.

3.7 Delineamento Experimental e Análise estatística

Foi usado o delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições, os dados foram submetidos a análise de variância para verificar as diferenças entre as médias e, quando estas ocorreram, foi aplicado o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção Qualitativa

A primeira etapa de avaliação do potencial celulolítico isolados de fungos filamentosos do gênero *Trichoderma* consistiu na observação do crescimento dos fungos em placa de Petri contendo substrato celulósico, Avicel, como única fonte de carbono, o qual permitiu eliminar aqueles que não apresentaram crescimento neste tipo de celulose comercial.

Após o período de incubação dos isolados em meio Avicel (1%), as culturas em tubos foram coradas com vermelho congo e o halo de degradação revelado (Figura 3).

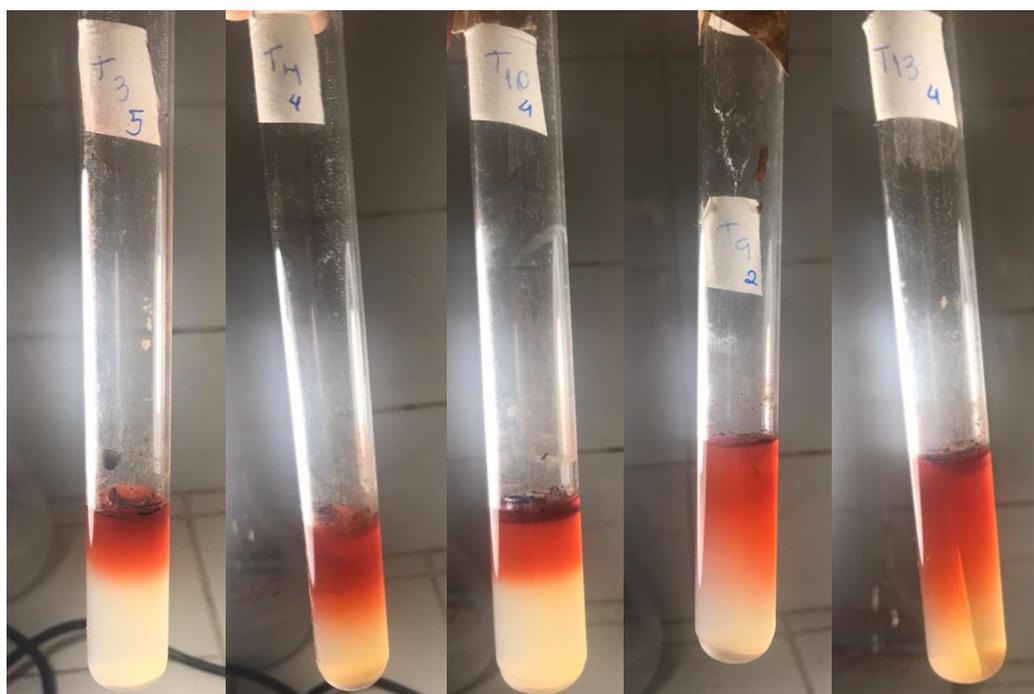


Figura 3. Observação de hidrólise após coloração com o vermelho Congo.

O halo evidenciado é formado pela ausência da ligação do corante com as ligações β -1,4 glicídicas, devido à clivagem do CMC em fragmentos menores, o corante vermelho congo não consegue se aderir (FLORENCIO, 2011). Este método é utilizado como ferramenta inicial, simples e rápida que auxilia na seleção de micro-organismos com potencial de produção de enzimas extracelulares (PANSA, 2017). Com base nesse método 25 isolados foram selecionados.

De acordo com a função catabólica dos fungos filamentosos, as enzimas deveriam ser produzidas na presença da celulose, porém a maioria dos fungos do gênero *Trichoderma* apresenta enzimas indutivas. Estas enzimas se formam durante o crescimento do fungo e na

presença de um indutor (KUBICEK, et al., 2009). Portanto, a presença de Avicel no meio de cultura desse experimento em placas de Petri, além de ser fonte de carbono para o crescimento das linhagens de *Trichoderma*, funcionou como um indutor na produção de celulases por esses fungos e permitiu a exclusão dos não produtores para a etapa seguinte do trabalho.

Apesar de alguns autores considerarem que na presença de Avicel as enzimas produzidas serão avicelases, para que essa enzima exerça sua função é necessária a presença de endoglucanases para iniciar o processo de hidrólise do substrato.

As exoglucanases ou celobiohidrolases são as enzimas que hidrolisam com maior eficiência a celulose microcristalina, liberando assim, unidades de celobiose. Quando puras, as celobiohidrolases são capazes de degradar Avicel, e em ação sinérgica com as endoglucanases hidrolisam também grande parte da celulose cristalina (CAO; TAN, 2002).

A presença de Avicel em determinadas concentrações como indutor podem favorecer a expressão celulásica. Segundo Rodrigues Zúñiga (2010) a atividade enzimática FPase foi efetivamente induzida com o acréscimo de Avicel na concentração de 0,2% (m/v), as melhores taxas de indução foram às 72h de FES e a atividade aumentou 2,5 vezes quando comparadas aos testes controles.

4.2 Seleção Quantitativa

As análises de variância detectaram diferenças significativas (Teste F $p < 0,01$) entre os isolados, para CMCase e avicelase. (Tabela 1).

Pode-se observar durante esse processo que 25 isolados apresentaram capacidade de hidrolisar o substrato celulósico, Avicel, caracterizando a presença de celulases, especificamente de exoglucanases e CMC caracterizando a presença de endoglucanases (Tabela 2).

A atividade da CMCcase variou de 0,499 a 3,787 UI.mL⁻¹. Os isolados 24 e 25 apresentaram maior atividade (3,360 e 3,787 UI.mL⁻¹ respectivamente) diferindo estatisticamente dos demais, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) (Tabela 2). Nos resultados para atividade para avicelase, observou-se que cinco isolados (10, 11, 12, 13 e 16) destacadas dos demais alcançando 2,466, 2,238, 2,434, 2,265, 2,519 UI.ml⁻¹(Tabela 2).

Tabela 1. Quadrados médios e coeficientes de variação Atividade enzimática de CMCase e Avicelase do extrato obtido de isolados de *Trichoderma sp* em UIg⁻¹ substrato.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio	
		CMCase	Avicelase
ISOLADOS	24	1,655837**	0,996511**
Erro	50	0,276110	0,107643
CV (%)		34,27	23,02

**Significativo Teste F $p < 0,01$.

Tabela 2 Atividade enzimática de CMCase e Avicelase do extrato obtido de isolados de *Trichoderma sp* em UIg⁻¹ substrato.

Isolados	CMCase	Avicelase
	UIg ⁻¹	
1	1,654 ± 0,566 b	1,103 ± 0,132 b
2	1,974 ± 0,282 b	1,156 ± 0,176 b
3	1,650 ± 0,750 b	1,178 ± 0,064 b
4	1,597 ± 0,249 b	0,612 ± 0,235 c
5	0,809 ± 0,196 c	1,333 ± 0,173 b
6	1,659 ± 0,449 b	0,932 ± 0,113 c
7	0,704 ± 0,454 c	0,828 ± 0,130 c
8	0,499 ± 0,103 c	1,836 ± 0,225 a
9	1,261 ± 0,294 b	1,309 ± 0,357 b
10	1,025 ± 0,514 c	2,466 ± 0,169 a
11	0,730 ± 0,547 c	2,238 ± 0,067 a
12	2,103 ± 0,354 b	2,434 ± 0,175 a
13	1,347 ± 0,582 b	2,265 ± 0,120 a
14	1,338 ± 0,318 b	1,457 ± 0,193 b
15	1,561 ± 0,179 b	1,326 ± 0,115 b
16	1,716 ± 0,285 b	2,519 ± 0,182 a
17	1,403 ± 0,178 b	1,578 ± 0,055 b
18	1,249 ± 0,316 b	0,513 ± 0,117 c
19	0,769 ± 0,590 b	1,314 ± 0,327 b
20	1,716 ± 0,230 b	0,907 ± 0,317 c
21	1,686 ± 0,493 b	0,787 ± 0,252 c
22	1,587 ± 0,263 b	1,197 ± 0,679 b
23	1,142 ± 0,431 c	1,505 ± 0,234 b
24	3,360 ± 0,044 a	1,477 ± 0,158 b
25	3,787 ± 0,107 a	1,355 ± 0,341 b

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

A atividade da CMCase variou de 0,499 a 3,787 UI.mL⁻¹. Os isolados 24 e 25 apresentaram maior atividade (3,360 e 3,787 UI.mL⁻¹ respectivamente) diferindo

estatisticamente dos demais, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) (Tabela 2). Nos resultados para atividade para avicelase, observou-se que cinco isolados 10, 11, 12, 13 e 16 destacadas dos demais alcançando 2,466, 2,238, 2,434, 2,265, 2,519 UI.ml⁻¹ (Tabela 2).

A exoglucanase é pouco relatada na literatura, no entanto possui estratégia de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, pois é capaz de liberar glicose diretamente do polímero. Embora a IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) defina essa enzima como catalisadora da hidrólise apenas dos terminais não-redutores da fibra celulósica em oligossacarídeos e celobiose, há relatos do ataque de terminais redutores por essa enzima (CASTRO, 2010).

Estudos realizados com linhagens de *Trichoderma* apresentam variação nos valores devido a algumas características do próprio fungo filamentoso ou bem como características do processo de FES. Segundo estudos realizados por SUN e colaboradores (2010), a produção enzimática de CMCase atingiu valores iguais a 6,2 UI.g⁻¹ em 120h, enquanto estudos realizados por Basso et al. (2010) obtiveram 5,4 UI.g⁻¹ em 216h de processo. Nota-se, portanto, que os valores máximos obtidos da cinética de produção são valores aproximados aos encontrados na literatura. Existe uma grande variação entre as atividades enzimáticas desta enzima, pois as condições do processo de FES se diferenciam em cada trabalho.

CONCLUSÃO

Constatou-se que todos os isolados obtidos apresentaram habilidades de expressar celulasas.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L. M.; PFENNING, L. O gênero *Trichoderma*. In: *trichoderma* uso na agricultura. Distrito Federal: **EMBRAPA**, p 163-179, 2019.
- ANDERSON, C. T.; KIEBER, J. J. Dynamic Construction, Perception, and Remodeling of Plant. Cell. Walls. **Annual Review of Plant Biology**, v. 71, p. 39–69, 2020.
- AL ROCHA, V. e. Characterization of the cellulolytic secretome of *Trichoderma harzianum* during growth on sugarcane bagasse and analysis of the activity boosting effects of swollenin. **Biotechnology progress**, v.32, p.327-336, 2016.
- ALVES, C. L. et al. Compatição entre *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei* na produção de celulase e endoglucanase em cultivo em estado sólido. XII Seminário Brasileiro de Tenologia Enzimática ENZITEC, 2016.
- ARANTES, V.; SADLER, J. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. 2009. 3 p. *Biotechnology for Biofuels*, DOI: 10.1186/1754-6834-3-4. Disponível em: <<https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-3-4>>. Acesso em 25 mar. 2021.
- BASSO, T.; GALLO, C.; BASSO, LC. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Revista Agropecuária Brasileira**, v. 45 p.1282-1289, 2010.
- BISCHOF, R.H.; RAMONI, J.; SEIBOTH, B. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. **Microbial cell. factories**, v, 15, p.106, 2016.
- BON, E. P.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. In: *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado*. **Interciência Brasil**. 1. ed. p. 241-271. 2008.
- BORIN, G.P. et al. Comparative transcriptome analysis reveals different strategies for degradation of steam-exploded sugarcane bagasse by *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*. **BMC Genomics**, v.18, p. 501-501, 2017.

BORTOLLAZO, N. G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. (Dissertação de Mestrado) - Universidade de São Paulo- Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz. São Paulo, 2011.

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1291 - 1296, 2002.

CASTRO, A.; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedade e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Quím. Nova**, v.33, p.181-188, 2010.

COLUSSI, F. Effect of pH and temperature on the global compactness, structure, and activity of cellobiohydrolase Cell. A from *Trichoderma harzianum*. **European Biophysics Journal**, v. 41, p. 89-98. 2012.

DANIELSON, R. M.; DAVEY, C. B. A abundância de propágulos de *Trichoderma* e a distribuição das espécies em solos florestais. **Biologia e Bioquímica do Solo**, 5. ed.. 458 - 494 p. 1973.

DELABONA, P. D. Produção de glicosil hidrolases por *Trichoderma harzianum* para o processo de sacarificação da biomassa vegetal. 2015.

DELABONA, P. S. et al. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. **Bioresource Technology** v. 107, p. 517-521, 2012.

DE PAULA, R.G. et al. New genomic approaches to enhance biomass degradation by the industrial fungus *Trichoderma reesei*. **International Journal of Genomics**, v. 2018, p. 1-17, 2018.

DILLOM, A. J. Enzimas como agentes biotecnológicos. *Legis Summa*, cap. 14, p.241-268. 2004.

EMBRAPA. Mistura de enzimas mostrou alto desempenho para gerar etanol a partir de bagaço de cana. 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/solos/sibcs/busca-de-noticias/-/noticia/52639673/mistura-de-enzimas-mostrou-alto-desempenho-para-gerar-etanol-a-partir-de-bagaco-de-cana?p_auth=JXEiU2dh>. Acesso em: 10 jul. 2021.

ESPOSITO, E.; SILVA, M. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 24, p. 89 - 98. 1998.

FELLOWS, P. Tecnologia del Procesado de Los Alimentos: Principios e Práticas. p.172-177. 1994.

FERREIRA, E. X. Enzimas como agentes biotecnológicos. Legis Summa, cap. 8, p.137-148. 2004.

FLORENCIO, C.; BANDIO, A. C.; FARINAS, C. S. Desafios relacionados à produção e aplicação das enzimas celulolíticas na hidrólise da biomassa lignocelulósica. **Química Nova**, v. 40, p. 1082–1093, 2017.

FLORENCIO, C. **Microrganismos produtores de celulases**: seleção de isolados de trichoderma spp.2011. Dissertação (Programa de Pós-graduação em biotecnologia) - Universidade de São Carlos, São Carlos, 2011.

FÜLÖP, L.; PONYI, T. Rapid screening for endo- β -1, 4-glucanase and endo- β -1,4-mannanase activities and specific measurement using soluble dye-labelled substrates. **Journal of microbiological methods**, v. 29, p. 15-21. 1997.

GAETE, A. V.; TEODORO, C. E. S.; MARTINAZO, A. P. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de celulase: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. 1-33, 2020.

GALDEANO, M. C. **Caracterização e aplicação de casca de aveia modificada por tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino associado à extrusão**. Dissertação (Mestrado Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2001.

GENEROSO, W. C. **Expressão recombinante e caracterização de uma endoxilânase não descrita de *Trichoderma harzianum***. 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

GOTTSCHALK, L. M.; OLIVEIRA, R. A.; BOM, E. P. Cellulases, xylanases, glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemi. Eng. J.**, p. 72-78, 2010.

HARGREAVES, P. I. **Bioprospecção de novas celulases de fungos provenientes da floresta Amazônica e otimização de sua produção sobre celulignina de bagaço de cana**. 2008. 75f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

HORTA, M. A. Transcriptome profile of *Trichoderma harzianum* IOC-3844 induced by sugarcane bagasse. **PloS one**, v. 9, 2014.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases; the history and evolution of current concepts. **Plant. Dis.**, v. 1, cap. 87, p. 4-10, 2003.

HUBBARD, K. G.; ROSENBERG, N. J.; NIELSEN, D. C. Automated weather data network for agriculture. **Journal of Water Resources Planning and Management**, p. 213-222, 1983.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. Cenários IBÁ. Disponível em:<<https://iba.org/datafiles/publicacoes/cenarios/65-cenarios.pdf>> Acesso em 09 de julho de 2021.

JAKLITSCH, W. M. European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. **Studies in Mycology**, v. 63, p. 1-91, 2009.

JAYASEKARA, S.; RATNAYAKE, R. Microbial Cellulases: Overview and Applications. Cellulose. In: PASCUAL, A.R.; MARTIN, M. E. E. Cellulose, Intechopen, Londres, p.83-104, 2019.

JEON, T. et al. Implication of cellobiohydrolase glycosylation for use in biomass conversion. **Biotechnol. Biofuels**, v. 1, 2008.

KARBOUNE, S.; GERAERT, P. A.; KERMASHA, S. Characterization of selected cellulolytic actives of multi-enzymatic complex system from *penicillium funiculosum*. **Journal of Agricultural and Food chemistry**. 2008.

KUBICEK, C. et al. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. **Biotechnol. Biofuels**, v. 2, p.19, 2009.

LIMA, U. A. Produção de Etanol. In: LIMA, U. A. et al. (E. Blücher, Ed.) **Biociencia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**, v. 3, p.1-43, 2001.

LYND, L. R.; ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell. concentration in studies of microbial cellulose utilization: analytical framework and methodological approach. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, p. 467 - 475, 2002.

MACHADO, D. F. M. et al. *Trichoderma* no Brasil: O fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, p. 274–288, 2012.

MANDELS, M.; REESE, E. T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. **J. BACTERIOL**, v. 73, n. 2, p.269-78, 1957.

MARGEOT LOPES, V. et al. Atividade da Xilanase em Cepas de *Colletotrichum* e *Trichoderma*. SINAFERM. 2009.

MELLO, B. L.; POLIKARPOV, I. Famile 1 carbohydrate binding-modules enhance saccharification rates. **AMB Express**, v. 4, p. 1-6, 2014.

MERCADO GLOBAL CELULASE (CAS 9012-54-8). Análise global do mercado 2018 celulase (CAS 9012-54-8), oportunidades, aplicações industriais, desenvolvimentos fundamentais e previsão para 2023. Disponível em:<<https://icrowdpt.com/2018/09/12/analise-global-do-mercado-2018-celulase-cas-9012-54-8-oportunidades-aplicacoes-industriais-desenvolvimentos-fundamentais-e-previsao-para-2023/>> Acesso em: 09 de julho de 2021.

NEUREITER, M. et al. Dillute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.98, p. 49-58, 2002.

PALOMER, X. et al. Study of the strawberry Cel 1endo- β -(1,4)-glucanase protein accumulation and characterization of its in vitro activity by heterologous expression in *Pichia pastoris*. **Plant Science**, v. 167, p. 509-518, 2004.

PANSA, C. C. ***Trichoderma* spp. de solos da Floresta Amazônica como fonte de enzimas celulolíticas**. 2017.97f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

PEREIRA, C. B. **Avaliação da produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por fungos isolados do Cerrado, Costa Marinha Brasileira e da Antártica, utilizando casca de soja como substrato**. 2016. 116f. Dissertação (Mestrado) - Programa de PósGraduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

PETERSON, R.; NEVALAINEN, H. *Trichoderma reesei* RUT-C30 – thirty years of strain improvement. **Microbiology**, v. 158, p. 58-68, 2012.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Journal of Biotechnology**. 1(3). 1998. Disponível

em<:http://www.ejbiotechnologyinfo/content/vol1/issue3/full/9/9.PDF.ISSN 0717-3458.>
Acesso em: 20 mar. 2021.

SANTOS, F. R. S. **Celulases e hemicelulases por linhagens fúngicas mesófila isoladas do cerrado sul-mato-grossense**. 2014. 84f. Dissertação (Mestrado) - Programa PósGraduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2014.

SANTOS, V. S. "O que é celulose?"; Brasil Escola. Disponível em:
<https://brasilecola.uol.com.br/o-que-e/biologia/o-que-e-celulose.htm>. Acesso em 18 de junho de 2020.

SCHEFFER, M. **Isolamento de fungos produtores de enzimas lignocelulósicas em depósito de resíduos de madeira de Pinus sp**. 2018. 52f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2018.

SILVA, A.J.D., et al.. Blue native-PAGE analysis of *Trichoderma harzianum* secretome reveals cellulases and hemicellulases working as multienzymatic complexes. **Proteomics**, v.12, p. 2729-2738, 2012.

SIQUEIRA, J. G. W. Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 132, p. 105419, 2020.

SOCCOL, C. R. Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid state fermentation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.41, p. 330-336, 1994.

SOUZA, K. P. **Avaliação de controle biológico de *Guignardia citricarpa* fitopatógeno de citros com isolados de *Trichoderma spp***. 2014.59f. Dissertação (Mestrado) (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia), Universidade de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, 2014.

STEYAERT, J. M. Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. **Microbiology**, v.156, p. 2887-2900, 2010.

SUN, H.; et al. Cellulase production by *Trichoderma sp*. On apple pomace under solid state fermentation. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 163-166, 2010.

WILSON, D. B. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1125, p. 289 - 297, 2008.

YEOMAN, C. e. Thermostable Enzymes as Biocatalysts in the Biofuel Industry. **Advances in applied microbiology**, cap. 1, v. 67, p. 1-55, 2010.

ZHANG, Y. H.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, p. 797 - 824, 2004.