

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

BIOTECNOLOGIA – FCBA

FÁTIMA TERMOS

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE ENDOGLUCANASE PRODUZIDA PELO  
FUNGO FILAMENTOSO *Pycnoporus sanguineus*

DOURADOS – MS

2019

FÁTIMA TERMOS

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE ENDOGLUCANASE PRODUZIDA POR  
FUNGO FILAMENTOSO *Pycnoporus sanguineus*

Trabalho apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Simões  
Ribeiro Leite

Área de concentração: Ciências Biológicas

DOURADOS – MS

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

T319c Termos, Fatima

Caracterização bioquímica de endoglucanase produzida por fungo filamentoso *Pycnoporus sanguineus* [recurso eletrônico] / Fatima Termos. -- 2019.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Rodrigo Simões Ribeiro Leite.

TCC (Graduação em Biotecnologia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2019.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Enzimas industriais. 2. Celulases. 3. Enzimas fúngicas. I. Leite, Rodrigo Simões Ribeiro. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

FÁTIMA TERMOS

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE ENDOGLUCANASE PRODUZIDA  
POR FUNGO FILAMENTOSO *Pycnoporus sanguineus***

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

Aprovado em: 5/12/2019

BANCA EXAMINADORA

Rodrigo Simões Ribeiro Leite

Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite

Universidade Federal da Grande Dourados

Gabriela Finoto Cavalheiro

Dra. Gabriela Finoto Cavalheiro

Alessandro Minillo

Dr. Alessandro Minillo

Dourados, 05 de dezembro de 2019

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho e conclusão do curso.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, pela saúde, disposição e todos os meios que permitiram a conclusão deste trabalho.

À minha família, por ter sonhado junto comigo com a minha formação.

Ao professor Rodrigo Simões, por ter feito mais do que sua obrigação como orientador, transmitindo além de conhecimento, sabedoria e experiência de vida.

À Geisa, por todos os conhecimentos transmitidos com muita dedicação, e pela paciência ao me atender mesmo tarde da noite.

Ao João Vitor, por ter compartilhado comigo todas as alegrias, tristezas e dificuldades da graduação.

Aos meus amigos, dos mais antigos aos recentes, por terem me acompanhado e torcido por mim em toda a minha trajetória.

Agradeço também a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*Não há*

*mais nada*

*que você possa temer*

*O Sol e suas flores chegaram*

*- Rupi Kaur*

## RESUMO

O complexo celulolítico é constituído por um conjunto de enzimas que atuam de forma sinérgica sobre a molécula de celulose, tendo como principal produto final monossacarídeos de glicose. A enzima endoglucanase, também conhecida como CMCase, cliva internamente a celulose, reduzindo o grau de polimerização dessa molécula e expondo extremidades reductoras e não reductoras. O maior interesse industrial dessas enzimas é a produção de etanol a partir da degradação de biomassa vegetal, denominado etanol de segunda geração. No entanto, há outras aplicações industriais destas enzimas, tais como na indústria de sucos, vinificação e alimentação animal. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a endoglucanase produzida pelo fungo filamentoso mesófilo *Pycnoporus sanguineus*. O pH ótimo de atividade da enzima foi 5,0. A enzima manteve mais de 80% da sua atividade catalítica na faixa de pH 3,0-8,0. A temperatura ótima da endoglucanase foi 70°C e a enzima manteve mais de 80% da sua atividade, após 1 hora de incubação a temperatura de 60°C. Elevada estabilidade estrutural não é frequentemente encontrada para endoglucanases produzidas por fungos mesófilos. Dessa forma, é possível inferir que a enzima analisada no presente trabalho apresenta características desejáveis para aplicação industrial, considerando sua capacidade de se manter estável em ampla faixa de pH e em elevadas temperaturas.

Palavras chave: Enzimas industriais. Celulases. Enzimas fúngicas.



## ABSTRACT

The cellulolytic complex is made up by enzymes that act synergistically on the cellulose molecule, having as its end product glucose monosaccharides. The endoglucanase enzyme, also known as CMCase, internally cleaves cellulose reducing the grade of polymerization of this molecule and exposing reducing and non-reducing ends. The major industrial interest of these enzymes is the production of ethanol from the degradation of plant biomass, called second generation ethanol. However, there are other industrial applications in these enzymes, such as in the juice, winemaking and animal feed industry. The aim of this work was to characterize the endoglucanase produced by the mesophyll filamentous fungus *Pycnoporus sanguineus*. Optimum pH of enzyme activity was 5.0. The enzyme maintained more than 80% of its original activity and structural stability in the pH range 3.0-8.0. The optimal endoglucanase temperature was 70°C, and after 1 hour of incubation, more than 80% of its activity and structural stability after incubation for 1 hour at 60°C. High structural stability is not often found for endoglucanases produced by mesophilic fungi. Thus, it is possible to infer that the enzyme analyzed in the present work presents desirable characteristics for industrial application, considering its ability to remain stable over a wide pH range and at high temperatures.

Keywords: Industrial enzymes. Cellulases. Fungal enzymes.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – pH ótimo da endoglucanase produzida por <i>P. sanguineus</i> .....	15
FIGURA 2 – Estabilidade ao pH da endoglucanase produzida por <i>P. sanguineus</i> .....	16
FIGURA 3 – Temperatura ótima para endoglucanase produzida por <i>P. sanguineus</i> .....	17
FIGURA 4 – Termoestabilidade de endoglucanase produzida por <i>P. sanguineus</i> .....	17

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>2</b>
2.1. OBJETIVOS GERAIS .....	2
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>2</b>
3.1. CELULASES E SUAS APLICAÇÕES INDUSTRIAIS .....	2
3.2. CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO (CES).....	3
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>4</b>
4.1. MICRORGANISMO .....	4
4.2. INÓCULO .....	4
4.3. CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO .....	5
4.4. EXTRAÇÃO DA ENZIMA .....	5
4.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENDOGLUCANASE .....	5
4.6. CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA.....	5
4.6.1. EFEITOS DO PH SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	5
4.6.2. EFEITOS DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	6
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>6</b>
5.1. pH ÓTIMO.....	6
5.2. pH DE ESTABILIDADE.....	7
5.3. TEMPERATURA ÓTIMA.....	7
5.4. TERMOESTABILIDADE.....	8
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>10</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As celulasas formam uma classe de enzimas que atuam em sinergia na degradação de celulose, até sua total degradação em moléculas de glicose. O principal interesse econômico é a conversão da celulose em etanol por hidrólise enzimática de material vegetal seguida de fermentação alcoólica, que se apresenta como uma alternativa energética viável para a substituição gradativa do uso de petróleo (RIBEIRO et al., 2019).

A viabilidade comercial de uma enzima está relacionada com alta especificidade, alta eficiência de conversão a baixos custos de produção, baixa inibição pelos próprios produtos da hidrólise, extração simples, hidrólise do substrato em condições replicáveis, alta estabilidade estrutural, e produto final facilmente isolado. Além disso, devem ser isoladas de microrganismos que também apresentem características desejáveis, como a facilidade e baixo custo de isolamento, cultivo e manipulação (SANTA-ROSA et al., 2018).

Inúmeros microrganismos produzem enzimas celulolíticas, principalmente entre os fungos e bactérias, sendo os fungos filamentosos os produtores mais eficientes. A espécie fúngica *Trichoderma reesei* é a primeira espécie fúngica descrita que produz celulase, sendo utilizada como principal modelo comparativo para as demais, que passaram a ser estudadas posteriormente (DELABONA et al., 2012).

Além do *T. reesei*, outras espécies do gênero *Thricoderma* são comumente estudadas para a produção de celulasas, como os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, sendo que vários dentre eles apresentaram produção similar ou superior à espécie modelo, especialmente entre os *Penicillium*. Algumas espécies de bactérias são produtoras de enzimas celulolíticas, porém a possibilidade de produzir enzimas em condições aeróbicas, extracelulares e em maiores quantidades fazem com que as celulasas fúngicas sejam mais convenientes para a indústria. (SANTA-ROSA et al., 2018)

A bioprospecção de espécies fúngicas produtoras de celulasas é de extrema importância para a indústria, na busca de microrganismos que possam atender cada vez mais a demanda global de produção de biocombustível, no que se refere a maior produção e custo-benefício. Neste contexto, um microrganismo ainda pouco estudado quanto à sua produção de enzimas celulíticas é o fungo endofítico *Pycnoporus sanguineus*, espécie encontrada em madeira, conhecido como orelha-de-pau ou urupê. Este fungo filamentoso apresenta cor característica, e possui propriedades medicinais, sendo utilizado, por exemplo, no tratamento

de úlceras, dor-de-dente, febres e hemorragias. Visto que é encontrado em troncos de árvores, apresenta em seu metabolismo, produção de celulasas e hemicelulasas com grande potencial de utilização em escala industrial (SMÂNIA et al., 1995).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVOS GERAIS**

- Caracterização da enzima endoglucanase produzida pelo cultivo em estado sólido do fungo filamentoso *Pycnoporus sanguineus*.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar pH ótimo de atividade da enzima endoglucanase;
- Determinar temperatura ótima de atividade da enzima endoglucanase;
- Determinar pH de estabilidade da enzima endoglucanase;
- Determinar temperatura de estabilidade da enzima endoglucanase.

## **3. REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1. CELULASES E SUAS APLICAÇÕES INDUSTRIAIS**

As celulasas, de modo geral, são enzimas que catalisam a hidrólise de materiais celulósicos, resultando na liberação de açúcares, sendo o de maior interesse, glicose. Estas enzimas podem ser classificadas em três grandes grupos, de acordo com o local em que atuam no substrato, sendo eles: endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases (CASTRO et al., 2010).

A celulose é clivada por enzimas celulolíticas que se classificam da seguinte forma: as endoglucanases (endo 1,4  $\beta$ -D- glucanase EC 3.2.1.14), que promovem cortes no polímero de celulose, expondo as extremidades redutoras e não redutoras. As exoglucanases (exo 1,4  $\beta$ -D- glicanase EC 3.2.1.91), também chamadas de celobiohidrolases, agem nas extremidades redutoras e não redutoras deste polissacarídeo liberando oligossacarídeos, dentre esses, unidades de celobiose. As  $\beta$ -glicosidases (1,4  $\beta$ -D-glicosidase EC 3.2.1.21) clivam a celobiose, liberando duas unidades de glicose. Após a ação sinérgica deste sistema celulolítico se tem a completa hidrólise da celulose (PENTTILA et al., 2013).

As celulasas possuem outras utilizações industriais, seja na indústria de bebidas, em que estas enzimas facilitam a extração de sucos e maceração para produção de néctares de frutas digerindo a rede de celulose que ajuda a reter o líquido nas células vegetais, ou no processo de vinificação, em que as  $\beta$ -glicosidases melhoram a extração de pigmentos e substâncias aromatizantes presentes na casca da uva e degradam compostos de sabor desagradável, liberando substâncias flavorizantes, melhorando o aroma e o sabor do vinho (ZANCHETTA et al., 2019).

Ainda segundo Zanchetta, A. (2019), “As celulasas também exercem papel importante na nutrição animal. Ao serem incorporadas à ração, essas enzimas, juntamente com as celulasas produzidas pelos microrganismos presentes no rúmen do animal, aumentam a digestibilidade das fibras da parede celular vegetal, melhorando a conversão do alimento ingerido (pastagem) em carne e leite. Na fabricação de detergentes, proporcionam maior limpeza e menor degradação dos tecidos”.

Neste contexto, a produção de etanol de segunda geração torna-se atrativa para o setor sucroenergético, uma vez que a biomassa lignocelulósica é um dos recursos mais abundantes em todo o planeta (FERREIRA, 2018; RIBEIRO, 2019). O etanol de segunda geração é o álcool etílico obtido a partir de biomassas lignocelulósicas, as quais são compostas por celulose, hemicelulose e lignina, formando estruturas fibrosas altamente estáveis (FERREIRA, 2018). A hidrólise do material lignocelulósico é uma etapa fundamental no processo de produção de etanol, em que a celulose e a hemicelulose são hidrolisadas e convertidas a monossacarídeos fermentescíveis que serão convertidos em álcool pela ação de leveduras (TEIXEIRA et al., 2019).

Apesar destas potencialidades, o emprego destas enzimas em processos industriais ainda é limitado devido a fatores como o elevado custo de produção e à baixa estabilidade estrutural. Deste modo, é necessário que haja a prospecção de linhagens com potencial para a produção destas enzimas em meio de baixo custo, como os resíduos agroindustriais, e com elevada estabilidade estrutural.

### 3.2. CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO (CES)

A produção industrial de enzimas depende do controle dos parâmetros de crescimento e capacidade produtiva, como a seleção do substrato, temperatura, pH, umidade inicial e tempo de cultivo (SANTOS, 2014).

O CES consiste no crescimento de microrganismos em substratos sólidos, na ausência ou próximo da ausência de água livre entre as partículas do substrato. O uso de CES apresenta uma série de características favoráveis quando comparado aos cultivos submersos, como por exemplo: possibilita a utilização de resíduos agroindustriais como fonte de carbono, nitrogênio e demais nutrientes, simulando o habitat natural do microrganismo, fazendo com que o microrganismo produza enzimas adequadas à produção industrial, já que fornece um ambiente favorável à produção de metabólitos de interesse (PALMA, 2003).

Além das citadas, o CES possui ainda outras vantagens biotecnológicas quando comparado aos cultivos convencionais, como: apresenta maior produção dos extratos enzimáticos, menor susceptibilidade à inibição, maior estabilidade estrutural das enzimas, maior concentração final de produtos, menor repressão catabólica, e menor risco de contaminação devido à baixa atividade de água usada no CES. (SINGHANIA et al., 2009).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. MICRORGANISMO**

O microrganismo utilizado neste trabalho foi o fungo filamentoso mesófilo *Pycnoporus sanguineus*, isolado de troncos de árvore localizados em área de cerrado na região de Dourados, Mato Grosso do Sul (22°10'49.2"S-54°56'57.4"W), e identificado pela micoteca URM da UFPE (Universidade Federal de Pernambuco). A linhagem foi armazenada na Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), no Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos (LEPFER). O meio de cultura utilizado foi o *Sabouraud dextrose ágar*, e o crescimento ocorreu a uma temperatura de 28°C durante 96 horas, seguido de armazenamento a 4°C.

### **4.2. INÓCULO**

O fungo *P. sanguineus* foi cultivado em três frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 40 mL do meio *ágar Sabouraud Dextrose* inclinado, durante 48 horas a 28°C. A suspensão do microrganismo foi obtida por raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 25 mL de solução nutriente (0,1% de sulfato de amônio, 0,1% e sulfato de magnésio heptahidratado e 0,1% de nitrato de amônio m/v). O fungo foi inoculado no farelo de trigo pela transferência de 5 mL desta suspensão, totalizando ~5 mg de massa micelial seca por grama de substrato seco (GARCIA et al., 2015).

### 4.3. CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO

Todo o material utilizado foi autoclavado por 20 minutos a 121°C. O fungo foi cultivado em três frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g de farelo de trigo, com umidade ajustada para 70% com solução nutriente (item 4.2.). A solução enzimática foi extraída após 120 horas de cultivo a 25°C.

### 4.4. EXTRAÇÃO DA ENZIMA

A extração da enzima dos resíduos fermentados foi realizada pela adição de 50 mL de água destilada, mantidos em agitação de 100 rpm durante 1 hora. A amostra foi filtrada em tecido de nylon centrifugada a 1500 g durante 5 minutos. O sobrenadante foi considerado extrato enzimático, que foi utilizado nas etapas seguintes (GARCIA et al., 2015).

### 4.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENDOGLUCANASE

A atividade de endoglucanase foi quantificada utilizando, como substrato, a Carboximetilcelulose 3% (m/v) (C5678 Sigma) em solução tampão acetato de sódio a 0,1M em pH 4.5. A determinação da atividade enzimática foi realizada com 900 µL de solução tampão com substrato e 100 µL de extrato enzimático, reagindo por 10 minutos à 50°C. A reação foi paralisada por meio de adição de 1 mL de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) e colocado em banho de ebulição a 100°C durante 10 minutos e posteriormente foi adicionado 8 mL de água destilada. O açúcar redutor liberado foi quantificado por espectrofotômetro a 540 nm (MILLER, 1959). A atividade da endoglucanase foi expressa como quantidade de enzima que produz 1 µmol de produto por minuto de reação. (ALVES-PRADO et al, 2010).

## 4.6. CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA

### 4.6.1. EFEITOS DO PH SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O pH ótimo da endoglucanase foi determinado através da medida da atividade da enzima a 50°C em diferentes valores de pH, variando entre 3,0 e 8,0, utilizando tampão McIlvane a 0,1M. A estabilidade da enzima ao pH foi determinada após incubação por 24 horas a 25°C em diferentes valores de pH, variando entre 3,0 e 10,5. Os tampões utilizados foram McIlvane a 0,1M (pH 3,0 a 8,0) e Glicina-NaOH 0,1M (8,5 a 10,5). A atividade residual foi medida nas condições ótimas da enzima (LEITE et al, 2008).



#### 4.6.2. EFEITOS DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

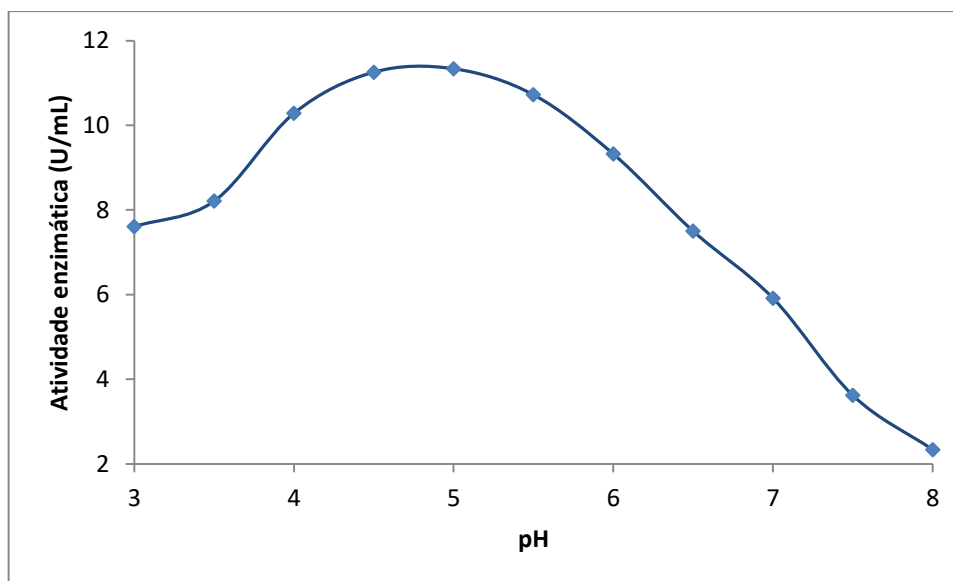
A temperatura ótima da endoglucanase foi determinada pela dosagem da atividade enzimática em diferentes temperaturas, variando de 30 a 85°C, no pH ótimo da enzima. A termoestabilidade foi determinada incubando a enzima durante 1 hora, sob diferentes temperaturas, variando também entre 30 a 85°C. a atividade residual foi medida nas condições ótimas da enzima (LEITE et al, 2008).

### 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1. pH ÓTIMO

A endoglucanase produzida pelo fungo filamentoso *P. sanguineus* apresenta maior atividade catalítica em pH 5,0 (Figura 1).

**Figura 1** – pH ótimo da endoglucanase produzida por *P. sanguineus*

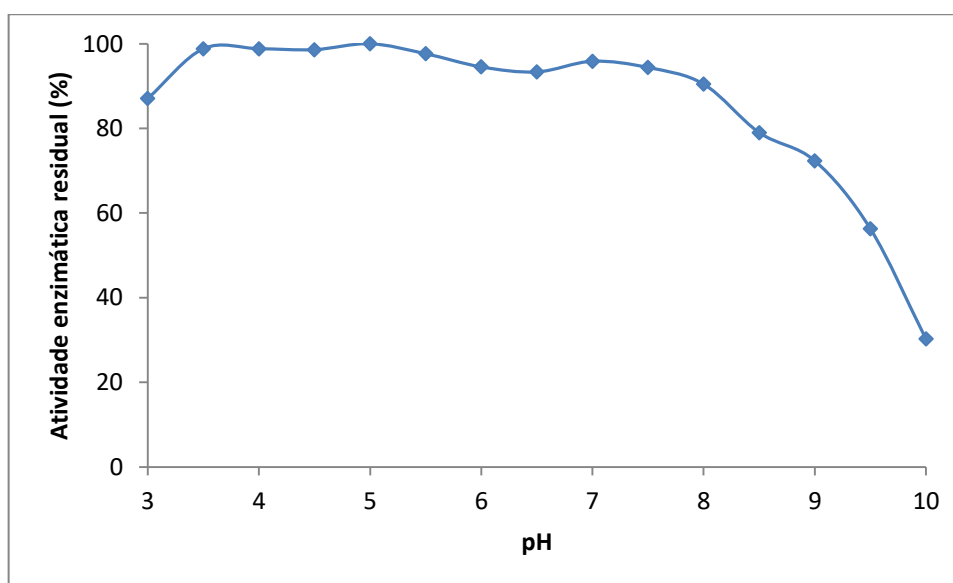


Trabalhos anteriores apresentam valores de pH ótimo para endoglucanases fúngicas similares ou próximos ao obtido no presente trabalho. Qaisar et al. (2014) e Santa-Rosa et al. (2018) relataram endoglucanases produzidas pelos fungos *Aspergillus versicolor* e *Penicillium sp* LMI01 com atividade ótima em pH 4,0 e 4,2 respectivamente. Garcia et al. (2018), em seus experimentos com o fungo *Lichteimia ramosa*, encontrou endoglucanase com atividade enzimática ótima em pH 5,0, similar ao do presente trabalho

## 5.2. pH DE ESTABILIDADE

A enzima produzida pelo fungo *P. sanguineus* apresentou estabilidade estrutural, mantendo mais de 80% de sua atividade original após 24 horas de incubação em uma faixa de pH entre 3,0-8,0(Figura 2). A faixa de estabilidade desta enzima foi superior às encontradas nos trabalhos de Qaisar et al. (2014) e Santa-Rosa et al. (2018), que obtiveram faixas de estabilidade de 3,5-4,5 e 3,6-5,0, respectivamente.

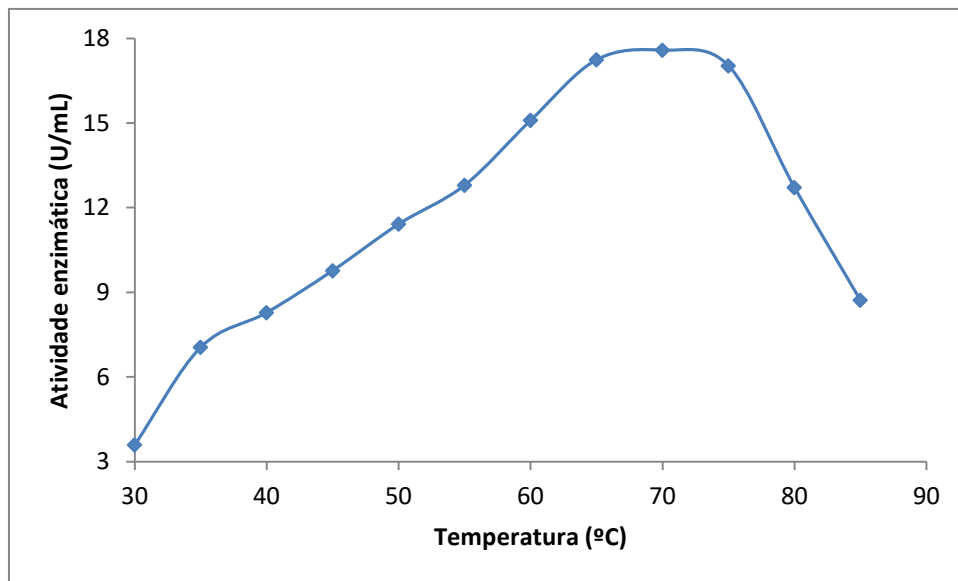
**Figura 2** – Estabilidade ao pH da endoglucanase produzida por *P. sanguineus*



## 5.3. TEMPERATURA ÓTIMA

A endoglucanase produzida por *P. sanguineus* apresentou máxima atividade na temperatura de 70°C e reduziu consideravelmente seu potencial catalítico a partir da temperatura de 80°C (Figura 3). A temperatura ótima foi superior à grande parte dos trabalhos realizados com fungos mesófilos, por exemplo, a endoglucanase produzida pela espécie *Aspergillus versicolor* teve sua atividade máxima na temperatura de 30°C (QAISAR et al., 2014). No entanto, outros experimentos realizados por Santa-Rosa et al. (2018) e Garcia et al. (2018) relatam enzimas com temperatura ótima (60°C) próxima à produzida pelo *P. sanguineus*.

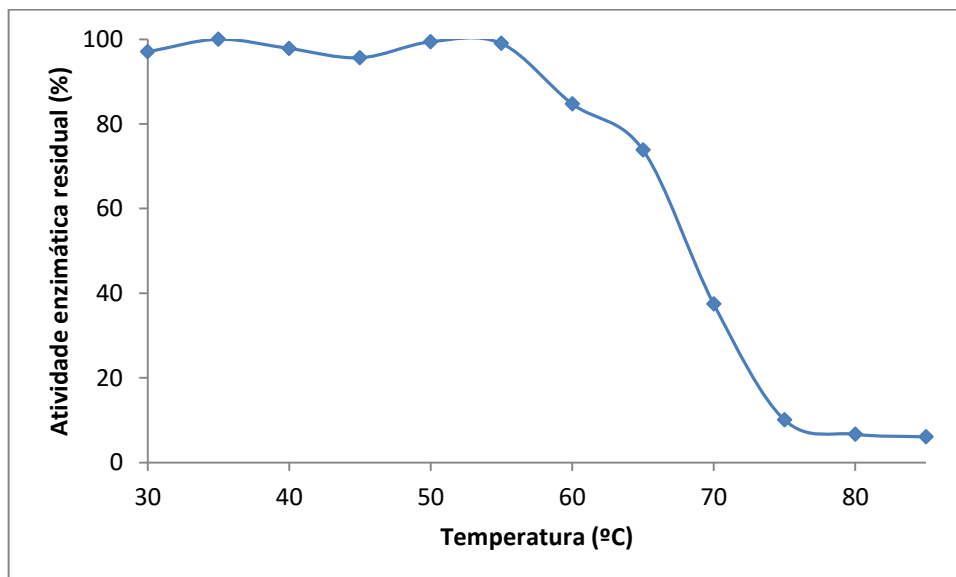
**Figura 3** – Temperatura ótima para endoglucanase produzida por *P. sanguineus*



#### 5.4. TERMOESTABILIDADE

A endoglucanase produzida pelo fungo mesófilo *P. sanguineus* apresentou mais de 80% da atividade enzimática original após 1 hora de incubação a temperatura de 60°C (Figura 4).

**Figura 4** – Termoestabilidade de endoglucanase produzida por *P. sanguineus*



Esta temperatura de estabilidade foi maior do que a aferida no trabalho de Qaisar et al. (2014), cerca de 40°C, e ligeiramente próxima das encontradas por Santa-Rosa et al. (2018) e Garcia et al. (2018), sendo estas 60°C e 55°C, respectivamente. Enzimas celulolíticas com

temperaturas de estabilidade altas são desejáveis em processos industriais, e incomuns em celulasas produzidas por fungos mesófilos (GARCIA et al., 2015).

## **6. CONCLUSÃO**

A endoglucanase produzida pelo fungo *P. sanguineus* apresenta estabilidade e propriedades estruturais extremamente interessantes para aplicação em processos industriais, uma vez que se mantém estável em pH ácido e em altas temperaturas, o que contribuiria para uma redução nos riscos de contaminação microbiana sem perder sua estabilidade estrutural e funcionalidade.

## 7. REFERÊNCIAS

ALVES-PRADO, H. F.; PAVEZZI, F. C.; LEITE, R. S. R.; OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; DASILVA, R. Screening and Production Study of Microbial Xylanase Producers from Brazilian Cerrado. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 161, p. 333–346, 2010.

CASTRO, A.M., JUNIOR, N.P. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Quim. Nova*, v. 33, p. 181-188, 2010.

FERREIRA, J.P.L. Avaliação do pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração. 2018. 50p. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

FILHO, S.R., JULIANI, A.J. Sustentabilidade da produção de etanol de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo. *Estudos avançados*, v. 27, p. 195-212, 2013.

GARCIA, N.F.L., SANTOS, F.R.S., BOCCHINI, D.A., PAZ, M.F., FONSECA, G.G., LEITE, R.S.R. Catalytic properties of cellulases and hemicellulases produced by *Lichtheimia ramosa*: Potential for sugarcane bagasse saccharification. *Industrial Crops & Products*, v. 122, p. 49-56, 2018.

GARCIA, N.F.L., SANTOS, F.R.S., GONÇALVES, F.A., PAZ, M.F., FONSECA, G.G., LEITE, R.S.R. Production of  $\beta$ -glucosidase on solid-state fermentation by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial residues: Characterization and catalytic properties of the enzymatic extract. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 18, p. 314-319, 2015.

LEITE, R.S.R., ALVES-PRADO, H.F., CABRAL, H., PAGNOCCA, F.C., GOMES, E., SILVA, R.. Production and characteristics comparison of crude  $\beta$ -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. *Enzyme Microb. Technol.* v. 43, p. 391–395, 2018.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428, 1959.

PALMA, M.B. Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido. 2003. 189p. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PENTTILÄ, P.A., VÁRNAI, A., PERE, J., TAMMELIN, T., SALMÉN, L., SIIKA-AHO, M., VIKARI, L., SERIMAA, R. Xylan as limiting factor in enzymatic hydrolysis of nanocellulose. *Bioresource Technology*, v. 129, p. 135-141, 2013.

QAISAR, S., ZOHRA, R.R., AMAN, A., UL QADER, S.A. Enhanced production of cellulose degrading CMCase by newly isolated strain of *Aspergillus versicolor*. *Carbohydrate Polymers*, v. 104, p. 199-203, 2014.

RIBEIRO, N.N., FREITA, L.A., TRALLI, L.F., SILVA, A.F., FREITA, C.M., MENDESA, F.Q., TEIXEIRA, V., JUNIOR, C.N. S., MUTTON, M.J. R. Otimização das condições fermentativas de *Pichia membranifaciens* para produção de etanol de segunda geração. *Quim. Nova*, v. 42, p. 720-728, 2019.

SANTA-ROSA, P.S., SOUZA, A.L., ROQUE, R.A., ANDRADE, E.V., ASTOLFI-FILHO, S., MOTA, A.J., NUNES-SILVA, C.G. Production of thermostable  $\beta$ -glucosidase and CMCase by *Penicillium* sp. LMI01 isolated from the Amazon region. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 31, p. 84-92, 2018.

SANTOS, F.R.S. produção e caracterização de celulasas e hemicelulasas por linhagens fúngicas mesófilas isoladas do cerrado sul-mato-grossense. 2014. 84p. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados.

SINGHANIA, R.R., PATEL, A.K., SOCCOL, C.R., PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 44, p. 13-18, 2009.

SMÂNIA, A., MONACHE, F. D., SMÂNIA, E. F. A., GIL, M. L., BENCHETRIT, L. C., & CRUZ, F. S. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 45, p. 177–181, 1995.

TEIXEIRA, D. A., SANTOS, A. S., PANTOJA, L. A., BRITO, P. L., COSTA, A. S. V. Produção de Etanol de Segunda Geração a Partir de Aguapé: Uma Revisão. *Rev. Virtual Quim.*, v. 11, p. 1, 2019.

ZANCHETTA, A. 2013. Celulases e suas aplicações. Disponível em: <http://www.rc.unesp.br/ib/ceis/mundoleveduras/2013/Celulases.pdf>. Acesso em: 20 set. 2019.