

DÉBORA CRISTINA PIMENTEL

**AVALIAÇÃO DE COQUETÉIS ENZIMÁTICOS FÚNGICOS PARA DEGRADAÇÃO
DE MADEIRA DE EUCALIPTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Gabriela Piccolo Maitan-Alfenas

Coorientadores: Valéria Monteze Guimarães
Rafael Ferreira Alfenas

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

P644d Pimentel, Débora Cristina, 1997-
2023 Avaliação de coquetéis enzimáticos fúngicos para
degradação de madeira de eucalipto / Débora Cristina Pimentel.
– Viçosa, MG, 2023.
1 dissertação eletrônica (97 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Gabriela Píccolo Maitan-Alfenas.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2023.
Referências bibliográficas: f. 86-97.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.030>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Fungos - Cultura e meios de cultura. 2. Enzimas de
fungos. 3. Lignocelulose. 4. Hidrólise. I. Maitan-Alfenas,
Gabriela Píccolo, 1986-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 579.5

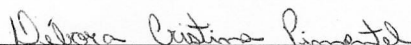
DÉBORA CRISTINA PIMENTEL

**AVALIAÇÃO DE COQUETÉIS ENZIMÁTICOS FÚNGICOS PARA DEGRADAÇÃO
DE MADEIRA DE EUCALIPTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

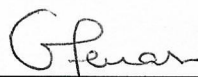
APROVADA: 23 de fevereiro de 2023.

Assentimento:



Débora Cristina Pimentel

Autora



Gabriela Piccolo Maitan-Alfenas

Orientadora

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Virgem Maria, pela saúde, fortaleza e providências ao longo desta etapa.

À Universidade Federal de Viçosa, por proporcionar a oportunidade da pós-graduação.

A toda minha família, em especial aos meus pais Teresa e Ilson Pimentel, juntamente com minha irmã Olga Maria Pimentel, por todo amor, amparo e apoio.

Ao meu noivo e melhor amigo Mauricio, pelo apoio e incentivo em minha jornada.

À minha orientadora, professora Gabriela Alfenas, por todo inestimável suporte profissional compartilhado generosamente em conhecimento, atenção e disposição em todos os momentos do mestrado.

Aos meus coorientadores, professora Valéria Monteze e professor Rafael Alfenas, por toda solicitude, ensinamentos e acolhimento em seus laboratórios para contribuição deste trabalho.

A todos do Laboratório de Análises Bioquímicas (LABQ), pelos auxílios, ensinamentos compartilhados, amizades e momentos de descontração essenciais durante esse tempo. Em especial, ao João e Micael por toda ajuda e disposição nos períodos de estágio.

A todos do Laboratório de Patologia Florestal (LPF) da Universidade Federal de Viçosa, pela concessão dos isolados fúngicos, pelos ensinamentos, acolhimento e por terem sido um grande suporte em muitas etapas. Em especial, à Rosiane, Fernando, Elenice, Gislaine e Mara.

Às professoras Iara, Ana Márcia, Leila e demais técnicos dos Laboratórios de Celulose e Papel (LCP) e Painéis de Madeira e Energia da Madeira (LAPEM), por toda ajuda e concessão quanto as amostras de madeira.

Ao professor Edgar Picoli, por toda sua generosa contribuição intelectual e prática no campo da microscopia e ao Laboratório de Anatomia Vegetal e Morfogênese de Plantas da Universidade Federal de Viçosa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada da Universidade Federal de Viçosa.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa e às agências financiadoras dos equipamentos (FAPEMIG, FINEP, CNPq, CAPES), pela oportunidade de realização das análises microscópicas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, e às agências de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

PIMENTEL, Débora Cristina, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2023. **Avaliação de coquetéis enzimáticos fúngicos para degradação de madeira de eucalipto.** Orientadora: Gabriela Piccolo Maitan-Alfenas. Coorientadores: Valéria Monteze Guimarães e Rafael Ferreira Alfenas.

O Brasil é um dos maiores produtores de florestas plantadas no mundo, que consistem em áreas de cultivo madeireiro destinadas principalmente para indústrias de papel e celulose, móveis e pisos laminados, carvão vegetal e etanol celulósico. Considerando o grande impacto do setor florestal na economia brasileira, um dos grandes desafios para o setor é a presença de tocos e raízes remanescentes. Após o plantio e a colheita da madeira no campo, permanecem os troncos de árvores abatidas, conhecidos como tocos, os quais constituem um entrave para a passagem de máquinas e implementos para um novo ciclo de manejo cultural. O recurso utilizado para remoção dos tocos é a destoca mecânica, sendo relatado como um dos processos mais onerosos do cultivo. Por essa razão, uma busca de métodos alternativos para a destoca passou a ser realizada, utilizando fungos causadores de podridão de madeira para a deterioração dos tocos, o qual foi chamado de destoca biológica. Esses estudos em campo, por sua vez, indicaram ausência de estabilidade dos fungos devido a variações edafoclimáticas. Portanto, o presente estudo teve como finalidade prospectar enzimas lignocelulolíticas de 11 fungos de madeira para avaliar o potencial de coquetéis enzimáticos na degradação de cavacos de eucalipto *in vitro*. Os fungos foram cultivados em meio de cultura semissólido, com ausência de pré-inóculo, em 5 biomassas vegetais: madeira de eucalipto, madeira de pinus, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo. As biomassas foram caracterizadas quimicamente, sendo as biomassas lenhosas constituídas de elevados teores de carboidratos totais e lignina, enquanto as demais apresentaram melhor distribuição entre as frações. Os teores de proteínas e minerais do farelo de trigo foram os maiores. As maiores atividades das enzimas lignocelulolíticas foram observadas para o isolado *Chrysosporthe cubensis* crescido em farelo de trigo por 8 dias. O isolado LPF2180 crescido em pinus por 8 dias e LPF2473 cultivado em farelo de trigo por 5 dias apresentaram atividades enzimáticas complementares, sendo também selecionados e identificados a nível molecular por meio da região ITS como *Hypoxylon* sp. e *Aspergillus sydowii*, respectivamente. O extrato enzimático de *C. cubensis*, concentrado por liofilização, foi utilizado para hidrólise dos cavacos de eucalipto a 40 °C, 250 rpm, durante 10 dias para avaliação do potencial de hidrólise da madeira em uma proporção de 10 e 20 Unidades de FPase

por grama de cavaco (FPU/g). Ensaios com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e celulases comerciais (Multifect® CL) foram utilizados para comparação. Também foi avaliado o potencial de um *blend* formado por 10 FPU/g do extrato de *C. cubensis* e 5 FPU/g dos extratos de *Hypoxylon* sp. e *Aspergillus sydowii*. Aliquotas de 0, 5 e 10 dias da reação de hidrólise foram coletadas e submetidas à quantificação de açúcares redutores por ensaio do ácido 3,5-dinitrosalicílico e quantificação de glicose e xilose por cromatografia líquida de alta eficiência. Após 10 dias de hidrólise, amostras de cavacos dos tratamentos foram analisadas qualitativamente por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e microscopia óptica. O extrato enzimático de *C. cubensis*, na concentração de 20 FPU/g de cavaco, promoveu a maior liberação de açúcares redutores totais (67,67 mmol/L e 160,29 mmol/L após 5 e 10 dias, respectivamente), glicose (8,68 e 17,61 g/L após 5 e 10 dias, respectivamente) e xilose (3,89 g/L após 5 dias e 7,62 g/L após 10 dias). Para o mesmo tratamento, micrografias obtidas por MEV sugeriram uma evidência das lamelas médias das paredes vegetais do cavaco, enquanto a microscopia óptica sugeriu variações de celulose e lignina no tratamento com enzimas por coloração diferenciada, inferindo uma degradação inicial da madeira por enzimas lignocelulolíticas.

Palavras-chave: Fungos. Enzimas lignocelulolíticas. Hidrólise. Destoca biológica.

ABSTRACT

PIMENTEL, Débora Cristina, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2023. **Evaluation of fungal enzymatic cocktails for eucalyptus wood degradation.** Adviser: Gabriela Piccolo Maitan-Alfenas. Co-advisers: Valéria Monteze Guimarães and Rafael Ferreira Alfenas

Brazil is one of the largest producers of planted forests in the world, which consist of wood cultivation areas destined mainly for the pulp and paper industries, furniture and laminated floors, charcoal and cellulosic ethanol. Considering the great impact of the forest sector on the Brazilian economy, one of the great challenges for this sector is the presence of remaining stumps and roots. After planting and harvesting wood in the field, the remained trunks of felled trees, known as stumps, constitute an obstacle to the passage of machines and implements to a new cycle of cultural management. The resource used to remove the stumps is mechanical stump removal, which is reported as one of the costliest processes in cultivation. For this reason, a search for alternative methods for stump removal began to be carried out, using fungi that cause wood rot to degrade the stumps, which was called biological stump removal. These field studies, in turn, indicated the absence of fungal stability due to edaphoclimatic variations. Therefore, the present study aimed to prospect lignocellulolytic enzymes from 11 wood fungi to evaluate the potential of the enzymatic cocktails in the degradation of eucalyptus chips *in vitro*. The fungi were cultivated by semi-solid fermentation, without pre-inoculum, in 5 plant biomasses: eucalyptus wood, pine wood, sugarcane bagasse, corn cob and wheat bran. The biomasses were chemically characterized, being the woody biomass constituted of high levels of total carbohydrates and lignin, while the others showed better distribution among the fractions. The protein and mineral contents of wheat bran stood out. The highest activities of lignocellulolytic enzymes were observed for the isolate *Chrysosporthe cubensis* grown on wheat bran for 8 days. The isolate LPF2180 grown on pine for 8 days and LPF2473 grown on wheat bran for 5 days showed complementary enzymatic activities, being also selected and identified at the molecular level through the ITS region as *Hypoxylon* sp. and *Aspergillus sydowii*, respectively. The enzymatic extract of *C. cubensis*, concentrated by lyophilization, was incubated with eucalyptus wood chips at 40 °C, 250 rpm, for 10 days to evaluate the hydrolysis potential of the wood in a proportion of 10 and 20 FPase Units per gram of wood chip (FPU/g). Assays with 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 and commercial cellulases (Multifect® CL) were used for comparison. The potential of a blend formed by 10 FPU/g of the *C. cubensis*

extract and 5 FPU/g of the extracts of *Hypoxylon* sp. e *Aspergillus sydowii* was also evaluated. Aliquots from 0, 5 and 10 days of the hydrolysis reaction were collected and submitted to quantification of reducing sugars by 3,5-dinitrosalicylic acid assay and quantification of glucose and xylose by high performance liquid chromatography. After 10 days of hydrolysis, chip samples from treatments were analyzed qualitatively by Scanning Electron Microscopy (SEM) and optical microscopy. The enzymatic extract of *C. cubensis*, at a concentration of 20 FPU/g of chip, promoted the highest release of total reducing sugars (67.67 mmol/L and 160.29 mmol/L after 5 and 10 days, respectively), glucose (8.68 and 17.61 g/L after 5 and 10 days, respectively) and xylose (3.89 g/L after 5 days and 7.62 g/L after 10 days). For the same treatment, micrographs obtained by SEM suggested evidence of the middle lamellae of the wood chip walls, while optical microscopy suggested cellulose and lignin variations in the treatment with enzymes by different staining, inferring an initial degradation of the wood by lignocellulolytic enzymes.

Keywords: Fungi. Lignocellulolytic enzymes. Hydrolysis. Biological stump removal.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição dos gêneros de árvores plantadas no Brasil	16
Figura 2 – Estrutura macroscópica da madeira e estrutura celular da parede vegetal	20
Figura 3 – Organização estrutural do complexo lignocelulósico composto pelos biopolímeros celulose, hemicelulose e lignina	22
Figura 4 – Mecanismo de hidrólise das celulasas	25
Figura 5 – Mecanismo de hidrólise das hemicelulasas	26
Figura 6 – Mecanismo de ação de isoenzimas de lacase no processo de deslignificação	27
Figura 7 – Morfologia do isolado LPF2177	53
Figura 8 – Morfologia do isolado LPF2180	55
Figura 9 – Características morfológicas do isolado LPF2471	57
Figura 10 – Características morfológicas do isolado LPF2472	59
Figura 11 – Características morfológicas do isolado LPF2473	62
Figura 12 – Características morfológicas do isolado J2-01	64
Figura 13 – Características morfológicas do isolado J2-02	66
Figura 14 – Produto de amplificação por PCR da região ITS em eletroforese de agarose 1,5% dos isolados LPF2180 e LPF2473	70
Figura 15 – Concentração de açúcares redutores totais após hidrólise enzimática de cavacos de madeira utilizando o extrato enzimático de <i>C. cubensis</i> , o coquetel comercial Multifect® CL, todos na concentração de 10 FPU/g de cavaco, e o tampão	73
Figura 16 – Concentração de açúcares redutores totais após hidrólise enzimática de cavacos de madeira utilizando o extrato enzimático de <i>C. cubensis</i> , o coquetel comercial Multifect® CL, todos na concentração de 20 FPU/g de cavaco, e o tampão	74
Figura 17 – Concentração de açúcares redutores totais após hidrólise enzimática de cavacos de madeira utilizando a mistura enzimática de <i>C. cubensis</i> , <i>Hypoxylon</i> sp. e <i>A. sydowii</i> (10:5:5 FPU/g de cavaco), o coquetel comercial Multifect® CL (20 FPU/g de cavaco), e o tampão	75

Figura 18 – Concentrações de glicose (A) e xilose (B) obtidas após hidrólise enzimática de cavacos de madeira pelas enzimas ativas do extrato bruto de *C. cubensis*, pelo coquetel comercial Multifect® CL, todos na concentração de 10 FPU/g de cavaco, e pelo tampão 76

Figura 19 – Concentrações de glicose (A) e xilose (B) obtidas após hidrólise enzimática de cavacos de madeira pelas enzimas ativas do extrato bruto de *C. cubensis*, pelo coquetel comercial Multifect® CL, todos na concentração de 20 FPU/g de cavaco, e pelo tampão 77

Figura 20 – Concentrações de glicose (A) e xilose (B) obtidas após ensaio de hidrólise enzimática de cavacos de madeira pela mistura enzimática de *C. cubensis*, *Hypoxylon* sp. e *A. sydowii* (10:5:5 FPU/g de cavaco), o coquetel comercial Multifect® CL (20 FPU/g de cavaco), e o tampão 78

Figura 21 – Imagens obtidas por MEV do plano transversal dos cavacos de madeira após 10 dias de hidrólise enzimática com tampão (A1, A2, A3), sem tratamento (B1, B2, B3), pelo extrato de *C. cubensis* (C1, C2, C3) e pelo Multifect® CL (D1, D2, D3), na concentração de 10 FPU/g de cavaco 80

Figura 22 – Imagens obtidas por MEV do plano transversal dos cavacos de madeira após 10 dias de hidrólise enzimática com tampão (A1, A2, A3), sem tratamento (B1, B2, B3), pelo extrato de *C. cubensis* (C1, C2, C3) e pelo Multifect® CL (D1, D2, D3), na concentração de 20 FPU/g de cavaco 81

Figura 23 – Imagens obtidas por MEV do plano transversal dos cavacos de madeira após 10 dias de hidrólise enzimática com tampão (A1, A2, A3), sem tratamento (B1, B2, B3), pela mistura de *C. cubensis*, *Hypoxylon* sp. e *A. sydowii* (concentração de 10:5:5 FPU/g de cavaco) (C1, C2, C3) e pelo Multifect® CL, na concentração de 20 FPU/g de cavaco (D1, D2, D3) 82

Figura 24 – Imagens obtidas por microscopia óptica do plano transversal dos cavacos de madeira após 10 dias de hidrólise enzimática com tampão (A1, A2, A3, A4), sem tratamento (B1, B2, B3, B4), pelo extrato de *C. cubensis* (C1, C2, C3, C4) e pelo Multifect® CL (D1, D2, D3, D4), na concentração de 20 FPU/g de cavaco. De cima para baixo, as ampliações são de 10X, 20X, 40X e 80X referentes à mesma região. Barras de escala: 500 µm, 100 µm, 50 µm e 25 µm respectivamente 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de enzimas comerciais de origem fúngica utilizadas em diversas aplicações biotecnológicas	28
Tabela 2 – Isolados fúngicos provenientes do Laboratório de Patologia Florestal utilizados no estudo	35
Tabela 3 – Composição química das biomassas in natura em base seca	43
Tabela 4 – Atividades enzimáticas (U/mL) e concentração de proteínas (mg/mL) do extrato bruto de <i>Chrysosporthe cubensis</i> crescido em eucalipto, pinus, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo	46
Tabela 5 – Atividades enzimáticas (U/mL) e concentração de proteínas (mg/mL) do extrato bruto de <i>Kretzschmaria zonata</i> crescido em eucalipto, pinus, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo	48
Tabela 6 – Atividades enzimáticas (U/mL) e concentração de proteínas (mg/mL) do extrato bruto de <i>Bartalinia pondoensis</i> crescido em eucalipto, pinus, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo	50
Tabela 7 – Atividades enzimáticas (U/mL) e concentração de proteínas (mg/mL) do extrato bruto de <i>Cytospora austromontana</i> crescido em eucalipto, pinus, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo	52
Tabela 8 – Atividades enzimáticas (U/mL) e concentração de proteínas (mg/mL) do extrato bruto de LPF2177 crescido em eucalipto, pinus, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo	54
Tabela 9 – Atividades enzimáticas (U/mL) e concentração de proteínas (mg/mL) do extrato bruto de LPF2180 crescido em eucalipto, pinus, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo	56
Tabela 10 – Atividades enzimáticas (U/mL) e concentração de proteínas (mg/mL) do extrato bruto de LPF2471 crescido em eucalipto, pinus, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo	58
Tabela 11 – Atividades enzimáticas (U/mL) e concentração de proteínas (mg/mL) do extrato bruto de LPF2472 crescido em eucalipto, pinus, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo	61
Tabela 12 – Atividades enzimáticas (U/mL) e concentração de proteínas (mg/mL) do extrato bruto de LPF2473 crescido em eucalipto, pinus, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo	63

Tabela 13 – Atividades enzimáticas (U/mL) e concentração de proteínas (mg/mL) do extrato bruto de J2-01 crescido em eucalipto, pinus, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo 65

Tabela 14 – Atividades enzimáticas (U/mL) e concentração de proteínas (mg/mL) do extrato bruto de J2-02 crescido em eucalipto, pinus, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo 67

Tabela 15 – Maiores atividades enzimáticas (U/mL) com as respectivas biomassas e tempo de crescimento dos isolados fúngicos 69

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Setor florestal brasileiro.....	16
2.2 Destoca mecânica e destoca biológica.....	17
2.3 Estrutura e composição da madeira.....	19
2.3.1 Celulose.....	20
2.3.2 Hemicelulose.....	20
2.3.3 Lignina.....	21
2.3.4 Pectina.....	22
2.3.5 Extrativos.....	22
2.4 Fungos colonizadores de madeira.....	23
2.5 Enzimas lignocelulolíticas.....	24
2.5.1 Celulases.....	25
2.5.2 Hemicelulases.....	25
2.5.3 Ligninases.....	26
2.5.4 Pectinases.....	27
2.6 Coquetéis enzimáticos obtidos a partir de subprodutos lignocelulósicos.....	27
3 OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo Geral.....	30
3.2 Objetivos Específicos.....	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 Composição química das biomassas.....	31
4.1.1 Extrativos.....	31
4.1.2 Carboidratos totais.....	32
4.1.3 Lignina solúvel e insolúvel.....	32
4.1.4 Proteínas.....	33
4.1.5 Cinzas.....	34
4.2 Obtenção e manutenção dos microrganismos.....	35
4.3 Produção dos extratos brutos enzimáticos.....	35
4.4 Atividades enzimáticas.....	36
4.5 Concentração de proteínas.....	38
4.6 Identificação morfológica dos isolados fúngicos.....	38
4.7 Extração de DNA total dos fungos selecionados.....	39

4.8 Identificação molecular dos fungos selecionados.....	39
4.9 Hidrólise enzimática <i>in vitro</i> dos cavacos de madeira.....	40
4.9.1 Quantificação de açúcares redutores totais	40
4.9.2 Quantificação de glicose e xilose	41
4.9.3 Análise estrutural dos cavacos de madeira por Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Óptica	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Composição química das biomassas.....	43
5.2 Atividades enzimáticas após crescimento em meio semissólido dos isolados fúngicos	44
5.2.1 LPF2470 - <i>Chrysosporthe cubensis</i>	45
5.2.2 GPF132 - <i>Kretzschmaria zonata</i>	47
5.2.3 31-37-E - <i>Bartalinia pondoensis</i>	49
5.2.4 21-37-1 - <i>Cytospora austromontana</i>	51
5.2.5 LPF2177	53
5.2.6 LPF2180	55
5.2.7 LPF2471	57
5.2.8 LPF2472	59
5.2.9 LPF2473	62
5.2.10 J2-01	64
5.2.11 J2-02	66
5.2.12 Seleção das atividades enzimáticas fúngicas	68
5.3 Identificação molecular dos isolados LPF2180 e LPF2473	70
5.4 Hidrólise enzimática <i>in vitro</i> dos cavacos de madeira.....	72
5.4.1 Determinação de açúcares redutores totais	72
5.4.2 Determinação de glicose e xilose	75
5.4.3 Avaliação estrutural dos cavacos de madeira após hidrólise enzimática	79
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

1 INTRODUÇÃO

O setor florestal apresenta grande impacto na economia brasileira, com receita bruta de R\$ 244,6 bilhões em 2021, segundo a Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ, 2022). O Brasil é um dos maiores produtores de florestas plantadas do mundo, ocupando uma área de 9,93 milhões de hectares (ha) para cultivos industriais, como produção de papel e celulose, painéis de madeira, pisos laminados, produção energética e biomassa. Essas áreas são constituídas em sua maior parte por espécies de eucalipto, representando 75,8 % dos plantios; seguido pelo cultivo de pinus, estimado em 19,4 %; e o percentual restante, 4,8 %, corresponde a outras espécies, como teca, seringueira, acácia e paricá (IBÁ, 2022).

Eucalyptus spp. é o principal contribuinte para o setor florestal brasileiro e o tempo médio de crescimento da madeira é de sete anos. Após a colheita da madeira, os detritos florestais, como folhas, galhos e tocos permanecem na área plantada. Os tocos e raízes remanescentes são resquícios das árvores abatidas e constituem um grande entrave, uma vez que dificultam o trânsito de máquinas e implementos em atividades de plantio e adubação para um novo ciclo de cultura (NEGRÃO *et al.*, 2014).

A alternativa utilizada para esse problema ainda é a remoção mecânica dos tocos, também denominada de destoca mecânica. Esse procedimento é realizado por maquinários como tratores de esteiras com lâminas frontais e escavadeiras (SAAD, 1984; WALMSLEY; GODBOLD, 2010). No entanto, essa prática apresenta muitas desvantagens, como danos na estrutura do solo durante o deslocamento da serrapilheira, o que acarreta em compactação e perda de matéria orgânica e nutrientes, podendo afetar a produtividade nas culturas subsequentes (HOPE, 2007), além de ser uma operação difícil e onerosa.

A deterioração natural da madeira é um processo lento, no qual os tocos permanecem inalterados por muitos anos após o corte (DE ALONSO *et al.*, 2007). Desse modo, o emprego de fungos degradadores de madeira tem sido estudado como alternativa para acelerar o processo de decomposição dos tocos, sendo este processo definido por Alfenas (2003) como destoca biológica.

Por essa técnica objetivar a aplicação dos fungos de modo direto nos tocos para sua degradação, os fungos promotores de podridão de madeira são os mais requisitados, por apresentarem capacidade de degradação dos polímeros da parede celular vegetal. Os fungos de podridão podem ser divididos em fungos de podridão mole, que degradam celulose e hemicelulose; fungos de podridão parda, que degradam celulose, hemicelulose e parcialmente lignina; e fungos de podridão branca, que degradam celulose e hemicelulose e lignina de forma mais efetiva (COSTA, 2014; DE ALONSO *et al.*, 2007).

Essa seletividade de degradação ocorre principalmente em função do complexo enzimático produzido pelos fungos (DE ALONSO *et al.*, 2007; MACHUCA; FERRAZ, 2001). O complexo é formado por um conjunto de enzimas lignocelulolíticas que atuam de forma sinérgica. A primeira camada da madeira, constituída de lignina, é degradada pelas ligninases, como lacases, lignina peroxidases, manganês peroxidases e peroxidases versáteis. A hemicelulose é degradada pelas hemicelulases como endoxilanasas, arabinofuranosidasas, β -xilosidasas, feruloil esterases e outras enzimas acessórias. A celulose é degradada pelas celulases, compostas por endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidasas (SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020).

Apesar de determinados isolados fúngicos apresentarem potencial para essa aplicação, tal estratégia tem se mostrado limitada em decorrência da variação de condições ambientais para o estabelecimento dos fungos nas diferentes áreas florestais, como umidade e nitrogênio, para seu crescimento e ação decompositora. Visto que mais estudos para a problemática dos tocos remanescentes em plantios florestais são necessários, o presente trabalho sugere uma nova abordagem biotecnológica, tendo como objetivo prospectar enzimas lignocelulolíticas, derivadas de fungos isolados de madeira, para avaliar o potencial de coquetéis enzimáticos na degradação de cavacos de eucalipto *in vitro*.

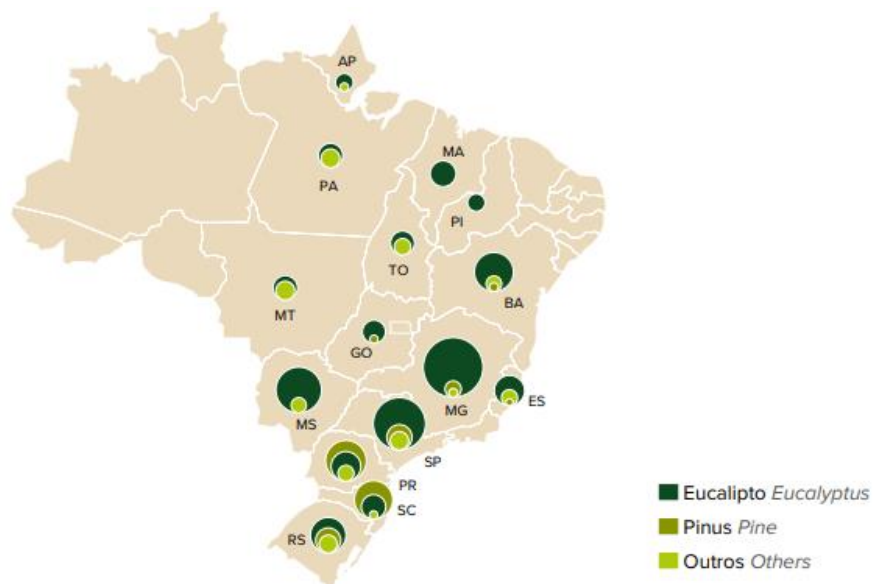
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Setor florestal brasileiro

A atividade florestal compreende toda a cadeia produtiva da madeira, desde o preparo do plantio até a colheita. O Brasil apresenta 9,93 milhões de hectares de florestas plantadas para produção de madeira para atender principalmente as indústrias de papel e celulose, siderurgia, carvão vegetal, painéis de madeira e pisos laminados. Por ser um recurso natural renovável, a maior parte da produção madeireira proveniente das florestas plantadas, consistem em áreas reflorestadas com manejo silvicultural de espécies exóticas como eucalipto, pinus, teca ou espécies nativas, como araucária e paricá (IBÁ, 2022).

Devido à adaptação favorável de espécies do gênero *Eucalyptus* perante as condições edafoclimáticas do Brasil, o gênero se sobressaiu como espécie mais cultivada em território nacional, principalmente nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul, enquanto o plantio de pinus ocorre em segundo lugar e se destaca nos estados do Paraná e Santa Catarina (Figura 1)(IBÁ, 2019, 2022).

Figura 1 – Distribuição dos gêneros de árvores plantadas no Brasil.



Fonte: IBÁ e PÖYRY (2018).

Cerca de 75 % das áreas plantadas correspondem ao plantio de eucalipto que se diversifica em mais de 700 espécies. O estabelecimento da eucaliptocultura para fins comerciais é explicado principalmente pelo menor tempo de cultivo, alta produtividade, capacidade de

adaptação em diferentes regiões e versatilidade de aplicação (OLIVEIRA; PINTO JUNIOR, 2021; SIMETTI *et al.*, 2018).

Segundo dados do relatório anual da Indústria Brasileira de Árvores referentes ao ano de 2021, o setor florestal representou 2,7 % do PIB Nacional. Além da importância para o mercado interno, as exportações somaram em torno de US\$ 11,8 bilhões, representando 4,2 % das exportações brasileiras para o mesmo ano. Não obstante, o impacto econômico tende a crescer ainda mais em decorrência de investimentos da ordem de R\$ 60,4 bilhões que estão projetados entre 2022 e 2028 para o aumento de áreas de plantio, pesquisa e desenvolvimento e unidades fabris.

2.2 Destoca mecânica e destoca biológica

Considerando o *Eucalyptus* spp. como o gênero majoritário de plantio para uso comercial da madeira no Brasil, estima-se de 6 a 7 anos para o seu corte. Após esse tempo, a madeira é coletada e os tocos remanescentes permanecem ancorados no solo por grandes raízes, sendo apenas cortados o mais rente possível ao solo. A degradação natural desses tocos ocorre de forma lenta, requerendo, em média, cerca de 25 anos (ONOFRE *et al.*, 2001). Além disso, a presença dos tocos sempre foi considerada como entrave para o manejo, visto que dificulta o trânsito de máquinas e implementos para adubação e colheita (ANDRADE, 2003; NEGRÃO *et al.*, 2014).

Como o primeiro e o segundo ciclo de plantio são realizados alternando o espaçamento entre linhas, a presença dos tocos torna a área inviável para novos plantios a partir do terceiro ciclo, em que se faz necessário a retirada dos mesmos (NEGRÃO *et al.*, 2014). O processo de retirada dos tocos por meio de maquinários é conhecido como destoca mecânica e promove o arranque do toco e suas raízes, permitindo o acesso posterior de máquinas para preparo do solo e semeadura. No Brasil, a operação convencional de destoca é realizada por maquinários pesados, como tratores de esteiras com lâmina frontal, lâminas cortadoras e escavadeiras equipadas com cabeçote (SAAD, 1984; WALMSLEY; GODBOLD, 2010).

Embora exista diferentes opções no mercado atualmente, devido à modernização dos equipamentos, a destoca mecânica continua apresentando desvantagens significativas, como perdas de características físico-químicas e biológicas do solo, provocadas pelo revolvimento e compactação do mesmo durante a operação. Tais aspectos facilitam processos de erosão que, por sua vez, podem acarretar em perda de produtividade (HOPE, 2007).

Maquinários e implementos também ficam suscetíveis a danos em peças e pneus (DE ALONSO *et al.*, 2007). Além disso, o processo possui elevado custo de mão de obra e

maquinário, sendo indicado no estudo de Pavan *et al.* (2010) como a operação de maior custo dentro do ciclo de manejo.

Walmsley e Godbold (2010) abrangem ainda outros aspectos negativos: além dos efeitos de redução na ciclagem de nutrientes, compactação e cisalhamento do solo, a retirada da biomassa enraizada pode levar à redução no estoque de carbono, aumento das emissões de CO₂, eliminação de microrganismos e invertebrados locais e propagação de vegetação invasora. Quanto aos reservatórios de carbono e nitrogênio, Egnell *et al.* (2015) relatam que, em curto prazo, o desenraizamento gera decaimento desses elementos no solo, e os efeitos a longo prazo requerem pesquisas. As consequências dessa prática podem promover impactos desconhecidos na produtividade das áreas florestais (EUFRADE-JUNIOR *et al.*, 2020).

Tendo em vista o alto custo que a destoca mecânica apresenta e as séries de problemas decorrentes para as atividades florestais, a abordagem de degradação biológica dos tocos por fungos degradadores de madeira foi estudada como alternativa para redução dos efeitos negativos da remoção de tocos, denominada como destoca biológica (ALFENAS, 2003; DE ALONSO *et al.*, 2007). Como a degradação natural da madeira ocorre lentamente, a inoculação de fungos capazes de colonizar esse ecossistema sugere que o processo possa ser acelerado como forma de prevenir ou reduzir as perturbações do solo (DE ALONSO *et al.*, 2007; NEGRÃO *et al.*, 2014).

Segundo Negrão e colaboradores (2014), para tal aplicação é preciso considerar aspectos importantes, como: seleção dos fungos condizentes com o habitat, inoculação dos fungos em períodos climáticos que proporcionem temperatura e umidade favoráveis e confirmação da não patogenicidade do microrganismo. Dessa forma, os fungos predominantemente estudados para aplicação no campo são basidiomicetos e ascomicetos apodrecedores de madeira, classificados em podridão branca, podridão marrom e podridão mole (COSTA *et al.*, 2017)

Andrade e colaboradores (2012) observaram perda de peso semelhantes ou superiores a 14 % em blocos de *Eucalyptus grandis* após 8 semanas inoculados com isolados de podridão. No entanto, o teste destes isolados nos tocos em campo mostrou que a perda de massa ocorre de forma significativa após inserção de uma câmara de umidade. Esses resultados indicaram que a biodegradação por fungos é influenciada pelas condições ambientais do local, sobretudo pelo fator umidade.

Em um estudo mais recente (COSTA *et al.*, 2017), os isolados *Acremonium* sp., *Phanerochaete chrysosporium* e *Cladosporium* sp., mostraram potencial de decaimento acelerado para madeira em laboratório. Quanto à deterioração de tocos em testes de campo

durante quatro meses, os isolados não apresentaram resultados significativos quando comparados ao controle. De acordo com os autores, a ineficiência de decomposição pode estar atrelada ao vigor fisiológico da madeira, tempo de exposição e condições edafoclimáticas, que influenciam a resistência da cepa madeireira frente aos fungos. Além disso, a baixa disponibilidade de nitrogênio e a presença de compostos fungitóxicos na madeira são fatores limitantes para o crescimento fúngico (ALONSO *et al.*, 2007; SCHWARZE, 2007).

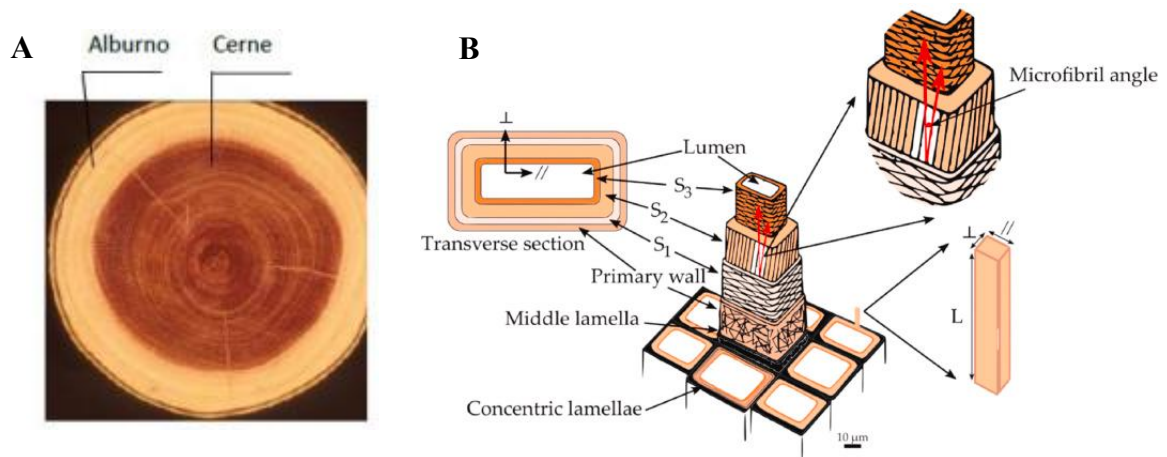
Dessa forma, as variações de temperatura, umidade, nutrientes e condições de exposição nas áreas locais têm dificultado a degradação eficiente dos tocos pelos fungos. Além disso, a instalação de fungos na biomassa requer tempos relativamente longos (VASCO-CORREA; SHAH, 2019). Por tais motivos, se faz necessário a investigação de outros artefatos para acelerar a degradação de tocos enraizados, como abordagens biotecnológicas por meio da aplicação direta de biocatalisadores enzimáticos.

2.3 Estrutura e composição da madeira

A madeira é uma matéria-prima renovável aplicada em ampla variedade de materiais, energia e produtos químicos. Madeiras provenientes de Gimnosperma são consideradas madeiras macias, enquanto espécies de Angiosperma são consideradas madeiras duras, como o eucalipto. Macroscopicamente, a madeira é dividida em alburno e cerne, sendo o alburno a parte adjacente à casca, responsável pela condução de seiva e síntese de bioquímicos; e o cerne, a parte interna, contendo compostos fenólicos e pigmentos, responsável pela sustentação (Figura 2A) (BEIMS *et al.*, 2022).

Em escala microscópica, as células vegetais da madeira são ordenadas por camadas e sua composição química é formada por um complexo de celulose, hemicelulose, lignina, pectina e extrativos. Externamente encontra-se a lamela média (LM), seguido da parede primária (P) e secundárias (S1, S2 e S3) até se chegar ao lúmen (Figura 2B). A lamela média é altamente lignificada contendo substâncias pécticas, responsável por unir as células. A parede primária é formada por microfibrilas de celulose, associadas à hemicelulose e pectina. A parede primária juntamente com a lamela média constitui a lamela média composta. As paredes secundárias são formadas por microfibrilas de celulose cristalina, envolvidas em uma matriz de hemicelulose/lignina, sendo a camada S2 a mais significativa (BEIMS *et al.*, 2022; SCHWARZE, 2007; WALSH-KORBS; AVÉROUS, 2019).

Figura 2 – Estrutura macroscópica da madeira (A) e estrutura celular da parede vegetal (B).



Fonte: A – Adaptado de BESSA, 2018; B – BEIMS *et al.*, 2022.

2.3.1 Celulose

A celulose ($C_6H_{10}O_5$)_n é o polissacarídeo majoritário encontrado principalmente na parede primária das células vegetais e é formado por ligações glicosídicas β(1→4) de D-glicose. O polímero constituído por essas ligações forma longas cadeias lineares e paralelas, o que confere alta resistência e rigidez para a madeira e outras biomassas. Essas características advêm da estrutura cíclica e das interações intra e intermoleculares que os grupos hidroxilas dos resíduos de D-glicose realizam através de ligações de hidrogênio (HOWELL *et al.*, 2009; SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020). Na madeira, a fração de celulose compreende de 40 a 50 % da massa seca (LE FLOCH; JOURDES; TEISSEDRE, 2015).

2.3.2 Hemicelulose

As hemiceluloses, no geral, correspondem à segunda maior parcela da biomassa. Diferentemente da celulose, a hemicelulose é um polissacarídeo heterogêneo, podendo ser formada por cadeias e ramificações de pentoses (xilose e arabinose), hexoses (glicose, galactose, manose) e/ou ácidos urônicos (glucurônico, metilgalacturônico e galacturônico). O papel da hemicelulose é estabilizar e fortalecer a parede celular vegetal, uma vez que esse polissacarídeo complexo estabelece ligações de hidrogênio com a celulose e ligações covalentes com a lignina (JAKOB *et al.*, 2022; SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020; TRIBOT *et al.*, 2019). Em madeira dura, a hemicelulose é formada principalmente por xilanas e, em madeira macia, por galactoglucomanas. A hemicelulose representa cerca de 25-35 % da massa seca da madeira (LE FLOCH; JOURDES; TEISSEDRE, 2015).

2.3.3 Lignina

O terceiro componente da parede vegetal é a lignina. A lignina é um polímero complexo formado pelos compostos fenólicos: álcoois p-cumarílicos, coniferílicos e sinapílicos. A polimerização desses três compostos forma três unidades fenilpropanóides, respectivamente: p-hidroxifenil, que não possui grupos OCH₃; guaiacil, que possui um grupo aril-OCH₃; e siringil, que possui dois grupos aril-OCH₃. Madeiras duras apresentam maior incidência de siringil e guaiacil, enquanto madeiras macias possuem mais unidades guaiacil (LE FLOCH; JOURDES; TEISSEDRE, 2015; TRIBOT *et al.*, 2019).

A lignina associada à hemicelulose apresenta aspecto de matriz amorfa, que confere resistência às fibrilas organizadas de celulose (BEIMS *et al.*, 2022; SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020). A resistência mecânica da madeira está diretamente ligada ao alto teor de lignina (23-33 % em madeiras macias e 16-25 % em madeiras duras), uma vez que esse polímero apresenta aspecto incrustante e de difícil degradação (LE FLOCH; JOURDES; TEISSEDRE, 2015).

Deste modo, a associação entre os polissacarídeos e a lignina formam o complexo lignocelulósico (Figura 3), de alta resistência, com o intuito de proteger as células vegetais contra ameaças de patógenos e intempéries (DE FREITAS *et al.*, 2021). Apesar da organização do complexo ser a mesma entre diferentes tecidos vegetais, a fração e a composição química podem variar, o que determina as características anatômicas e mecânicas de cada biomassa.

2.4 Fungos colonizadores de madeira

Os fungos são os principais organismos heterotróficos que decompõem material vegetal hidrolisando substratos em moléculas simples para obtenção de energia (TROIANO; ORSAT; DUMONT, 2020). Devido à estrutura lignocelulósica e ao estoque abundante de carbono da madeira, esta consiste em um grande habitat para a diversidade de espécies fúngicas (FUKASAWA; MATSUKURA, 2021; LEPINAY *et al.*, 2022).

Os fungos endofíticos se alojam internamente nos tecidos vegetais fisiologicamente ativos, sem causar danos à planta e podem apresentar uma relação de simbiose com as culturas, tornando-as suas hospedeiras e beneficiando-as através da obtenção de antioxidantes, absorção de nutrientes, controle biológico e outras estratégias contra estresses bióticos e abióticos (AMIRZAKARIYA; SHAKERI, 2022; FONTANA *et al.*, 2021; MISHRA *et al.*, 2021).

A madeira também é suscetível a ocorrência de fungos fitopatogênicos que, assim como os endofíticos, colonizam os tecidos vegetais internos. Contudo, o mecanismo de infecção e colonização desses fungos acarreta em danos para a planta, desenvolvendo sintomas de doenças que podem levar à sua morte (PONTES *et al.*, 2020). Por essa razão, os fitopatógenos desenvolveram diferentes estratégias de infecção para romper as defesas físicas da planta e obter nutrientes. Uma dessas estratégias consiste na secreção de enzimas lignocelulolíticas, capazes de degradar a parede celular (BROWN; RIES; GOLDMAN, 2014; GIBSON *et al.*, 2011).

Os primeiros colonizadores da madeira que iniciam o processo de decomposição geralmente são os fungos endofíticos estabelecidos nos troncos, folhas e galhos, previamente presentes após o abate das árvores (FUKASAWA; MATSUKURA, 2021; SONG *et al.*, 2017). Devido às suas adaptações evolutivas como colonizadores primários, podem apresentar atividades específicas para iniciar a degradação de substratos lignocelulósicos (MARTÍN-SAMPEDRO *et al.*, 2015). Estes moldam a dinâmica de transição de endófitos para saprófitos, ou seja, aqueles que se alimentam de matéria orgânica em decomposição (CLINE *et al.*, 2018).

A sucessão fúngica ocorre por esporos transportados pelo ar, estabelecendo os colonizadores secundários e mantendo a hidrólise da lignocelulose. Os colonizadores tardios intensificam essa atividade, completando a decomposição da madeira (FUKASAWA; MATSUKURA, 2021). Dentre esses saprófitos, estão os fungos que causam podridão branca, podridão parda e podridão mole (CHAI *et al.*, 2022; HUANG *et al.*, 2022). Por utilizarem os componentes da madeira como fonte de nutrição, compõem o grupo dos xilófagos (ACOSTA *et al.*, 2021). Esses fungos secretam um arsenal enzimático lignocelulolítico capaz de degradar de modo mais efetivo os polissacarídeos e de modo seletivo a lignina da parede celular vegetal,

intensificando os estágios de decomposição (ANDRADE *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2017; DE ALONSO *et al.*, 2007; WALSH-KORBS; AVÉROUS, 2019).

Os fungos da podridão branca apresentam a capacidade de degradar todos os componentes da parede vegetal: celulose, hemicelulose e lignina. A degradação pode ocorrer primeiramente pela lignina ou simultaneamente entre a lignina e os polissacarídeos (SINGH; SINGH, 2014; WALSH-KORBS; AVÉROUS, 2019). Por apresentarem a vantagem de degradar lignina, os fungos pertencentes a esse grupo são os mais visados para aplicação de destoca biológica e biopolpação, uma vez que a remoção da lignina facilita o acesso aos polissacarídeos para degradação e favorece o branqueamento da madeira, respectivamente (DE ALONSO *et al.*, 2007; TIAN *et al.*, 2010).

Os fungos da podridão parda ou marrom causam maior rapidez na redução da resistência mecânica da madeira, pois possuem a capacidade de degradar celulose e hemicelulose sem despolimerizar totalmente a lignina (GREEN; HIGHLEY, 1997; JENSEN *et al.*, 2001; MONRROY *et al.*, 2011; WALSH-KORBS; AVÉROUS, 2019). Os fungos da podridão mole, por sua vez, apresentam maior limitação quanto à degradação da lignina. Desse modo, conseguem degradar mais eficientemente a fração celulose/hemicelulose e se distinguem como produtores de cavidade (tipo 1) e erosão (tipo 2) na parede celular secundária (SINGH; SINGH, 2014; WALSH-KORBS; AVÉROUS, 2019).

2.5 Enzimas lignocelulolíticas

A capacidade de degradação do material vegetal pelos fungos é conferida pelo complexo enzimático produzido. Esse complexo utiliza os biopolímeros como substratos, exercendo uma ação catalítica capaz de hidrolisá-los. Atualmente, os fungos filamentosos são os microrganismos de maior interesse pela indústria para produção de enzimas lignocelulolíticas, devido aos seus altos níveis de produção e variabilidade de enzimas extracelulares (LIU; QU, 2019; SAINI; SHARMA, 2021; TROIANO; ORSAT; DUMONT, 2020).

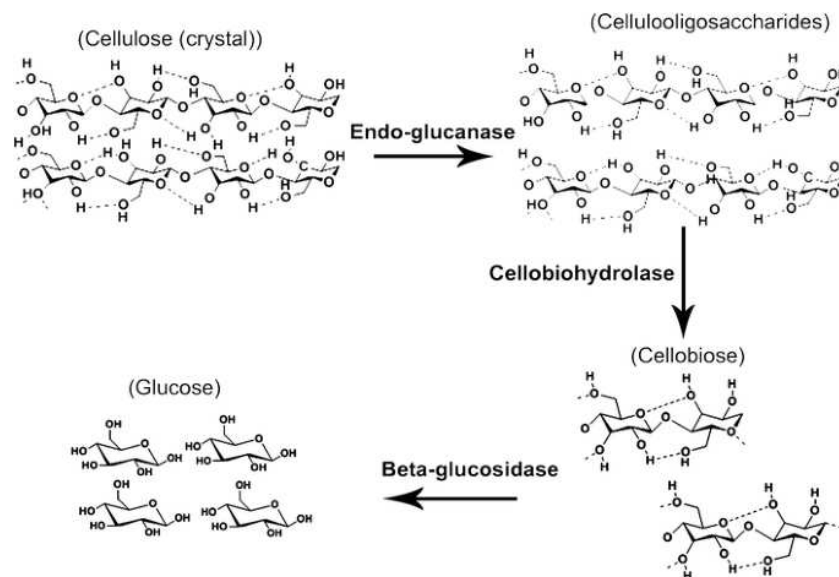
As enzimas ativas em carboidratos – classificadas como CAZymes – constituem as hidrolases do complexo, enquanto as enzimas responsáveis pela deslignificação constituem as enzimas oxidativas (MANAVALAN; MANAVALAN; HEESE, 2015). Desse modo, o conjunto de enzimas que atua sobre a estrutura lignocelulósica de maneira sinérgica pode ser subdividido em (1) celulasas, (2) hemicelulasas e (3) ligninases (SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020).

2.5.1 Celulases

As enzimas capazes de clivar o polímero celulósico correspondem à classe das celulases (Figura 4). As exo-1,4- β -D-glucanases (EC. 3.2.1.91) e endo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.4) são as primeiras enzimas a atuarem na celulose, promovendo a hidrólise de modo externo e interno, respectivamente, das cadeias de celulose em fragmentos menores. As endo-1,4- β -D-glucanases clivam somente regiões amorfas internas β -1,4, liberando oligômeros. As exo-1,4- β -D-glucanases, também conhecidas como celobiohidrolases, clivam tanto as extremidades redutoras quanto não redutoras, liberando dissacarídeos. Por fim, os dissacarídeos, denominados celobiose, sofrem ação das β -glicosidases (EC 3.2.1.21), liberando os monossacarídeos de glicose (SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020; TROIANO; ORSAT; DUMONT, 2020).

Para contribuir na hidrólise da celulose, ainda podem atuar enzimas de atividades auxiliares, como as monooxigenases polissacarídicas líticas (LPMO) (EC 1.14.99.54) e as celobiose-desidrogenases (EC 1.1.99.18), que podem apresentar ação sinérgica com base em mecanismos de oxirredução e transferência de elétrons (SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020).

Figura 4 – Mecanismo de hidrólise das celulases.



Fonte: MANAVALAN; MANAVALAN; HEESE, 2015.

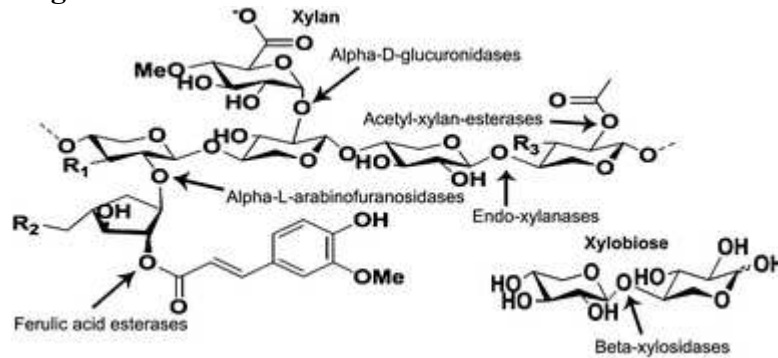
2.5.2 Hemicelulases

Visto que a hemicelulose é um complexo composto por diferentes carboidratos, as hemicelulases constituem um conjunto de enzimas hidrolíticas variadas que precisam agir de

forma sinérgica e paralela às celulases (Figura 5). Uma parte considerável dessas enzimas é responsável pela degradação do sistema xilanolítico, cujas cadeias de xilanas são clivadas por endo-1,4-beta-xilanases (EC 3.2.1.8) e endo-1,3-beta-xilanases (EC 3.2.1.32), liberando xilooligossacarídeos. Os oligômeros gerados são hidrolisados à xilose por β -xilosidases (EC 3.2.1.37), por meio da extremidade não redutora (SAINI; SHARMA, 2021).

Outro grupo hemicelulolítico é formado pelas α -L-arabinofuranosidas (EC 3.2.1.55) e endo- α -L-arabinanases (EC 3.2.1.99) que atuam sobre as cadeias ramificadas de arabinose ligadas à cadeia principal de xilana. Também pode haver ação das esterases (EC 3.1.1.72) que catalisam a hidrólise de grupos acetil presentes na xilana, além de α -glicuronidas (EC 3.2.1.139) e β -mananases (EC 3.2.1.78), que clivam resíduos de ácido glicurônico e mananas, respectivamente (MANAVALAN; MANAVALAN; HEESE, 2015; SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020).

Figura 5 – Mecanismo de hidrólise das hemicelulases.



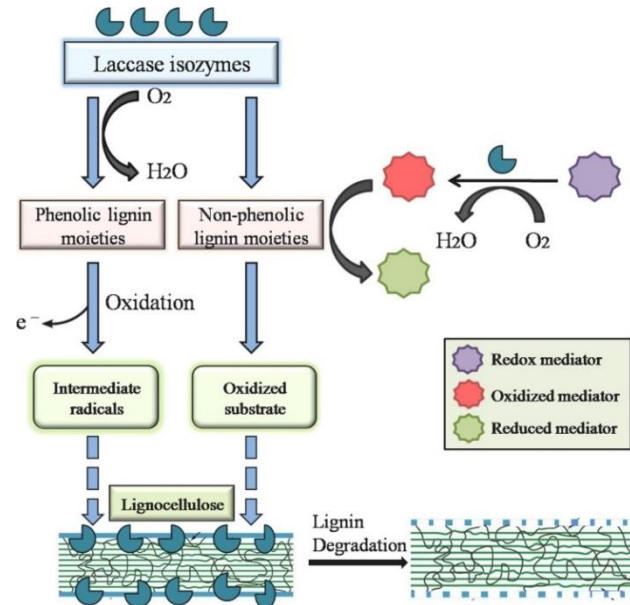
Fonte: MANAVALAN; MANAVALAN; HEESE, 2015.

2.5.3 Ligninases

Ao contrário das celulases e hemicelulases, as enzimas do sistema ligninolítico utilizam o mecanismo de oxi-redução para despolimerização da lignina. A principal classe de enzimas desse sistema se refere às lacases (EC 1.10.3.2), também classificadas como polifenoloxidas multicobre (Figura 6). As lacases degradam a lignina reduzindo o oxigênio molecular e oxidando as unidades fenólicas e não fenólicas. Outras enzimas também operam no processo de deslignificação, como as peroxidases de manganês (MnP) (EC 1.11.1.13), ligninas peroxidases (LiP) (EC 1.11.1.14), peroxidases versáteis (VP) (EC 1.11.1.16), peroxidases descolorantes (DyPs) (EC 1.11.1.19), além de enzimas acessórias como aril-álcool oxidas (EC 1.1. 3.13), glioxal-oxidas (EC 1.2.3.15), aril-álcool-desidrogenases (EC 1.1.1.90) e

quinona redutases (EC 1.6.5.5) (GONZÁLEZ *et al.*, 2021; SAINI; SHARMA, 2021; ZHUO; FAN, 2021).

Figura 6 – Mecanismo de ação de isoenzimas de lacase no processo de deslignificação.



Fonte: SAINI; SHARMA, 2021.

2.5.4 Pectinases

Em razão das diferentes estruturas de pectina entre os materiais vegetais, as enzimas pectinolíticas compreendem três categorias principais: desesterificantes, despolimerizantes e protopectinases. A pectina esterase (desesterificante) (3.1.1.11), hidrolisa os grupos metil éster, transformando a pectina em pectato; a pectina liase (4.2.2.2) e a pectina hidrolase (3.2.1.15), como as poligalacturonases (despolimerizantes), realizam clivagem das ligações glicosídicas de modo transeliminativo e hidrolítico, respectivamente; as protopectinases (3.2.1.99) formam pectina solúvel polimerizada (JOHN *et al.*, 2020; UENOJO; PASTORE, 2007).

2.6 Coquetéis enzimáticos obtidos a partir de subprodutos lignocelulósicos

A utilização de enzimas tem crescido cada vez mais conforme os avanços no setor de biotecnologia. De acordo com a *Business Communication Company Research* (BCC), o mercado global de enzimas aplicadas industrialmente deve crescer de US\$ 6,4 bilhões em 2021 para US\$ 8,7 bilhões até 2026, a uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 6,3 % para o período de 2021-2026 (BBC, 2021). Desse mercado, mais de 20 % correspondem à vendas de enzimas lignocelulolíticas (LEITE *et al.*, 2021).

Atualmente, as enzimas lignocelulolíticas apresentam uma grande variedade de aplicações comerciais, tanto de maneira individual quanto combinada, ascendendo o conceito de coquetel enzimático. Os coquetéis comerciais formulados são consórcios de enzimas centrais e acessórias que atuam na desintegração do polímero de forma sinérgica (MORRISON; ELSHAHED; YOUSSEF, 2016). Os coquetéis são majoritariamente obtidos de origem fúngica em razão de maior rendimento e variedade catalítica, além de produção rápida e econômica (MCKELVEY; MURPHY, 2017). Suas aplicações estão presentes na produção de biocombustíveis, suplementação alimentar animal, biopolpação e branqueamento de celulose, indústria de bebidas e alimentos, tratamento de efluentes, biorremediação do solo, dentre outros (FILIAU-CHASTEL *et al.*, 2021; SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020). A Tabela 1 mostra diferentes coquetéis enzimáticos lignocelulolíticos comercializados atualmente para diferentes aplicações.

Tabela 1 – Exemplos de enzimas comerciais de origem fúngica utilizadas em diversas aplicações biotecnológicas.

Aplicações	Nome	Fungo	Enzimas	Empresa
Nutrição	Allzyme®	<i>Aspergillus niger</i>	Endo-1,4-xilanase	Alltech
	Rovabio®	<i>Talaromyces versatilis</i>	Endo-1,4-xilanase β-1,4-xilosidase Arabinofuranosidase Alfa-galactosidase Celobiohidrolase Poligalacturonase	Adisseo
Têxtil	Amilase fúngica	<i>Aspergillus oryzae</i>	Alfa-amilase	American Biosystems
	Primafast®	<i>Trichoderma reesei</i>	Endoglucanase	Genencor
Lavanderia	Celluzyme®	<i>Trichoderma reesei</i>	Celulase	Novozymes
			Hemicelulase	
Bebidas	Rapidase®	<i>Aspergillus niger</i>	Poligalacturonase Alfa-arabinofuranosidase	DSM
	Pectinex® UltraSP	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Poligalacturonase	Novozymes
	Rohapect® 10L	<i>Aspergillus niger</i>	Poligalacturonase Pectina Metil esterase Arabinase	Enzimas AB
	Rohament® PL		Poligalacturonase	Enzimas AB
Alimentação	Multifect® XL	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Xilanase	Genencor
Polpa e papel	Spezyme® CP	<i>Trichoderma reesei</i>	Celulase	Genencor
Biocombustíveis	Accelerase® 1500	<i>Trichoderma reesei</i>	Celobiohidrolase endoglucanase	Genencor
	Cellic Ctec®	<i>Trichoderma reesei</i>	Celulase	Novozymes

			β -glicosidase Xilanase	
Biotecnologia	Glucanex®	<i>Trichoderma harzianum</i>	β -1,3-glucanase	Novozymes

Fonte: Adaptado de FILIATRAULT-CHASTEL *et al.* (2021).

A obtenção de coquetéis enzimáticos de modo convencional ocorre por meio de Fermentação Submersa (FS) ou Fermentação Semissólida (FSS). A FS é realizada em meio líquido, enquanto a FSS é realizada em pouca presença de água livre (CHILAKAMARRY *et al.*, 2022). Por essa característica, estudos recentes indicam vantagens da FSS comparada à FS, como mais econômica e ecológica, culminando em maior rendimento de enzimas, menor tempo de fermentação e menores riscos de proteólise e contaminação bacteriana (INTASIT *et al.*, 2021; LEITE *et al.*, 2021; ROSSO; BERRIN; LOMASCOLO, 2022).

A FSS permite a utilização de biomassas residuais, agrícolas, agroindustriais e silviculturais, como fontes de carbono para o desenvolvimento fúngico, visto que são substratos lignocelulósicos de baixo valor econômico. O cultivo de fungos utilizando resíduos lignocelulósicos confere valor agregado aos produtos enzimáticos, contribuindo para a sustentabilidade e bioeconomia, sobretudo em países dependentes da economia agrícola (FILIATRAULT-CHASTEL *et al.*, 2021; ROJAS; ZAPATA; RUIZ-TIRADO, 2022; WIKANDARI; HASNIAH; TAHERZADEH, 2022).

Por conterem açúcares, proteínas e minerais, as biomassas agroindustriais/florestais servem como fonte de nutrição e suporte para o crescimento fúngico, podendo ser palhas, cascas, farelos, bagaços, polpas, dentre outros (YAFETTO, 2022). Cada tipo de substrato apresenta frações lignocelulósicas diferentes e essa composição se relaciona diretamente com a indução das enzimas. Dessa forma, substratos diferentes induzem um arsenal enzimático próprio, baseado nas necessidades de crescimento do fungo em determinado meio (LEITE *et al.*, 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o arsenal enzimático lignocelulolítico de fungos isolados de madeira após crescimento em meio semissólido em diferentes biomassas para análise do potencial de degradação de cavacos de madeira *in vitro* por coquetéis enzimáticos.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil de 11 isolados fúngicos para a produção de enzimas lignocelulolíticas após crescimento em 5 fontes de carbono diferentes em meios de cultivo semissólidos;
- Selecionar os microrganismos e as condições de cultivo que proporcionam os extratos com as maiores atividades enzimáticas;
- Realizar a identificação molecular de fungos produtores de extratos enzimáticos selecionados;
- Avaliar a ação enzimática, *in vitro*, de extratos selecionados como coquetéis enzimáticos na hidrólise de cavacos de madeira.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Composição química das biomassas

Cada biomassa testada como fonte de carbono para o cultivo fúngico – eucalipto, pinus, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo – foi quantificada quanto aos teores químicos de sua estrutura lignocelulósica: celulose, hemicelulose, lignina e demais composições: proteínas, cinzas e extrativos, com base na metodologia descrita pelo *National Renewable Energy Laboratory* (NREL). Para todas as análises, as biomassas *in natura* foram moídas em moinho de facas, padronizadas na granulometria de 20 mesh, secas em estufa a 45 °C e analisadas com umidade abaixo de 10 %, aferida pelo analisador de umidade Ohaus (Cheeselab, São Paulo). Antes de cada procedimento, as massas secas foram pesadas com base na correção de umidade mensurada.

4.1.1 Extrativos

A primeira etapa da composição consiste na eliminação de extrativos, a fim de remover substâncias que interferem na análise de carboidratos e lignina, como ceras, pigmentos, gorduras e resinas, sendo executada conforme NREL (2008). Pesou-se 2 g de peso seco da biomassa em cartucho de papel de filtro (11 x 5 cm), registrando a massa exata dos cartuchos e das amostras.

Os cartuchos foram acondicionados no extrator de Soxhlet em sistema de refluxo com 200 mL de água quente por 6 h, seguido de 200 mL de álcool etílico 95 % por 20 h. Ao final do processo, as amostras foram secas em estufa 45 °C por 24 h e suas massas novamente registradas. A análise foi realizada em triplicata e quantificada pelo cálculo mostrado na equação 1.

$$\text{Extrativos (\%)} = \frac{(P2) - (P1) \times \% \text{ sólidos totais}}{100} \quad \text{eq. 1}$$

Em que:

P1 = Peso do cartucho + amostra inicial;

P2= Peso do cartucho + amostra final;

% Sólido totais = Obtido pelo analisador de umidade.

As biomassas livres de extrativos foram utilizadas para a quantificação de carboidratos totais e lignina solúvel e insolúvel.

4.1.2 Carboidratos totais

A determinação de carboidratos totais foi executada por hidrólise ácida das biomassas, de acordo com NREL (2012). Foi pesado 0,3 g de massa seca das biomassas livres de extrativos e adicionado 3 mL de H₂SO₄ 72 % em tubos de ensaio. A hidrólise foi realizada em banho-maria 30 °C, por 1 hora, com homogeneização em intervalos de 10 min. Posteriormente, as amostras foram transferidas quantitativamente para Erlenmeyers de 250 mL por meio de diluição com água deionizada para 4 % de H₂SO₄. Os frascos foram vedados e autoclavados por 1 hora a 121 °C.

Os hidrolisados foram filtrados à vácuo em cadinhos de vidro, pesados previamente. Os sólidos retidos nos cadinhos e as soluções filtradas foram utilizadas para determinação de lignina insolúvel e solúvel, respectivamente. Os filtrados também foram utilizados na quantificação dos carboidratos totais.

Para a quantificação dos monossacarídeos hidrolisados foi empregado o procedimento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), de acordo com a *American Society for Testing and Materials* (ASTM). Alíquotas dos hidrolisados, em triplicata, foram filtradas em seringa 0,45 µm e aplicadas no cromatógrafo CBM-20A/20Alite (Shimadzu) com detector de índice de refração RID - 20A (Shimadzu).

A curva de calibração de glicose, xilose, arabinose, galactose, manose e celobiose foi determinada com base nos padrões de açúcares em concentrações de 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0 e 10,0 g/L, utilizando a coluna Aminex7 HPX-87H (BioRad) a 65 °C, com eluição isocrática com solução de ácido sulfúrico 0,005 mol/L e fluxo de 0,6 mL/min (Ferraz *et al.*, 2000). Os valores de glicose foram convertidos para teores de celulose pelo fator 0,9, enquanto xilose e arabinose foram convertidos para hemicelulose pelo fator de 0,88.

4.1.3 Lignina solúvel e insolúvel

A quantificação de lignina solúvel em ácido foi realizada por método espectrofotométrico em cubeta de quartzo utilizando comprimento de onda de 215 e 280 nm. As soluções foram diluídas em 5, 10 ou 20x para obter absorbâncias em faixa linear (caminho ótico de 1 cm), quando necessário. As absorbâncias foram convertidas em teor de lignina solúvel pela equação 2, e corrigidas para o volume total do hidrolisado, em triplicata.

$$\text{Lignina Solúvel (\%)} = \frac{(4,53 \times A_{215}) - A_{280}}{300} \quad \text{eq. 2}$$

Em que:

A280 = valores de absorvância da solução a 280 nm

A215 = valores de absorvância da solução a 215 nm

Os sólidos retidos correspondentes à lignina insolúvel, também denominados de lignina de Klason, foram secos em estufa 105 °C por 24 h e pesados após resfriamento em dessecador. As massas registradas foram convertidas em teor de lignina insolúvel pela equação 3, fazendo-se a correção para cinzas.

$$\text{Lignina Insolúvel (\%)} = \frac{m1}{m2} \times 100 \quad \text{eq. 3}$$

Em que:

m1 = massa, em gramas, de lignina Klason insolúvel seca;

m2 = massa, em gramas de biomassa inicial previamente seca em estufa 105 °C.

4.1.4 Proteínas

O teor de proteínas foi determinado pelo método de Kjeldahl através das etapas de digestão, destilação e titulação (BRADSTREET, 1954), tradicionalmente empregado em análises composicionais (SÁEZ-PLAZA *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2016; YANU; JAKMUNEE, 2017). O método se baseia na quantificação total de nitrogênio e é estimado pelo fator de conversão de nitrogênio proteico da amostra. No presente trabalho foi adotado o fator de conversão de 5,75, recomendado pela RDC nº 360/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para proteínas de origem vegetal.

Em tubos de Kjeldahl foram acondicionados 0,3 g de base seca em papel livre de nitrogênio e 10 mL de solução catalisadora para a etapa de digestão. Os tubos foram colocados em bloco digestor e aquecidos gradualmente até a temperatura de 340 °C por 2 h. Após o resfriamento da amostra, adicionou-se 1 mL de peróxido de hidrogênio e a reação foi mantida a 340 °C por 40 minutos. Posteriormente ao resfriamento, foi adicionado 10 mL de água destilada.

As amostras digeridas seguiram para a etapa de destilação, na qual cada tubo é acoplado ao destilador de nitrogênio, modelo TE-036E (Tecnal), recebendo dosadamente a solução de hidróxido de sódio 50 % até que a reação fosse neutralizada e escurecesse. Nesta etapa, o nitrogênio presente na forma de sal amoniacal (sulfato de amônio) é convertido a hidróxido de amônio e liberado em estado gasoso, o qual passa pelo sistema de destilação e condensa dentro do Erlenmeyer contendo 25 mL de solução indicadora e ácido bórico 4 %. A destilação foi

finalizada após o aparecimento da tonalidade verde na solução final até a marca de 100 a 125 mL de volume.

O borato de amônio formado após destilação foi passado para a etapa de titulação com ácido clorídrico 0,05 N até atingir o ponto de viragem através da mudança de coloração da reação. O procedimento foi realizado em triplicata e o teor de proteínas nas amostras foi calculado através da equação 4.

$$\text{Proteínas totais (\%)} = \frac{V \times f \times N \times 0,0014 \times \text{Fator}}{mA} \times 100 \quad \text{eq. 4}$$

Em que:

V = volume, em mL, gasto de HCl 0,05 N

f = fator de correção do HCl 0,05 N

N = normalidade da solução

Fator = fator de conversão do nitrogênio em proteína

mA = massa, em gramas, da amostra.

4.1.5 Cinzas

De acordo com NREL (2008) o teor de cinzas corresponde à matéria inorgânica estrutural da biomassa. Para a quantificação de cinzas, cadinhos de porcelana foram colocados na mufla por 4 h, resfriados em dessecador por 1 h e pesados. Adicionou-se 0,1 g de cada biomassa nos cadinhos calcinados, em triplicata, colocando-os novamente na mufla em aquecimento a 300 °C por 1 h, seguido de 575 ± 25 °C por 4 h. Posteriormente, os cadinhos foram resfriados em dessecador novamente por 1 h e pesados. O teor de cinzas foi calculado pela equação 5.

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{\text{Cadinho final} - \text{Cadinho inicial}}{mA} \times 100 \quad \text{eq. 5}$$

Em que:

Cadinho final = massa, em gramas, do cadinho com resíduo da amostra após mufla.

Cadinho inicial = massa, em gramas, do cadinho vazio após mufla.

mA = massa, em gramas, da amostra.

4.2 Obtenção e manutenção dos microrganismos

Um total de onze isolados fúngicos obtidos de diferentes regiões geográficas do Brasil foram cedidos gentilmente pela micoteca do Laboratório de Patologia Florestal, da Universidade Federal de Viçosa (Tabela 2). Esses indivíduos foram escolhidos por terem sido isolados de troncos e tocos remanescentes de árvores, sendo potenciais produtores de enzimas lignocelulolíticas direcionadas à degradação de madeira. Quatro fungos apresentavam identificação molecular: *Chrysosporthe cubensis* (LPF2470), *Kretzschmaria zonata* (GPF132), *Bartalinia pondoensis* (31-37-E), *Cytospora austromontana* (21-37-1) e outros sete isolados fúngicos com identificação desconhecida: LPF2177, LPF2180, LPF2471, LPF2472, LPF2473, J2-01 e J2-02. Os fungos obtidos foram cultivados e mantidos em placas de BDA (Batata Dextrose Ágar) a 28 °C.

Tabela 2 – Isolados fúngicos provenientes do Laboratório de Patologia Florestal utilizados no estudo.

Isolado	Espécie	Hospedeiro	Substrato	Local de origem
LPF2470	<i>Chrysosporthe cubensis</i>	<i>Eucalyptus</i> sp.	Toco	Belo Oriente, MG
LPF2471	-	<i>Eucalyptus</i> sp.	Toco	Belo Oriente, MG
LPF2472	-	<i>Eucalyptus</i> sp.	Toco	Monte Dourado, PA
LPF2473	-	<i>Eucalyptus</i> sp.	Toco	Belo Oriente, MG
GPF132	<i>Kretzschmaria zonata</i>	<i>Tectona grandis</i>	Tronco	São José dos Quatro Marcos, MT
31-37-E	<i>Bartalinia pondoensis</i>	<i>Eucalyptus</i> sp.	Tronco	Três Lagoas, MS
21-37-1	<i>Cytospora austromontana</i>	<i>Eucalyptus</i> sp.	Tronco	Três Lagoas, MS
LPF2177	-	<i>Eucalyptus</i> sp.	Toco	Rosário do Sul, RS
LPF2180	-	<i>Eucalyptus</i> sp.	Toco	Rosário do Sul, RS
J2-01	-	<i>Eucalyptus</i> sp.	Toco	Monte Dourado, PA
J2-02	-	<i>Eucalyptus</i> sp.	Toco	Monte Dourado, PA

Fonte: Laboratório de Patologia Florestal/UFV.

4.3 Produção dos extratos brutos enzimáticos

Para produção das enzimas em meio semissólido, foram selecionadas cinco diferentes fontes de carbono: eucalipto, pinus, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo. As biomassas foram secas em estufa, moídas em moinho de facas e peneiradas em granulometria

de 20 mesh. Para se obter uma mistura final de 60 % de umidade, foram pesados 5 g de cada biomassa em Erlenmeyers e adicionado 12 mL de meio mineral contendo a seguinte composição: NH_4NO_3 1,0 g/L; KH_2PO_4 1,5 g/L; MgSO_4 0,5 g/L; CuSO_4 0,25 g/L e extrato de levedura 2,0 g/L. Além disso, o meio foi acrescido com elementos traços contendo: MnCl_2 0,1 mg/L; H_3BO_3 0,075 mg/L; Na_2MoO_4 0,02 mg/L; FeCl_3 1,0 mg/L e ZnSO_4 3,5 mg/L. Os frascos foram autoclavados por 20 minutos a 121 °C e inoculados a partir da transferência de 10 discos de ágar dos fungos plaqueados. O processo de indução das enzimas foi realizado a 28 °C, em duplicata biológica, sendo testados dois tempos de crescimento, 5 e 8 dias, para análise da melhor produção enzimática.

Após 5 e 8 dias de crescimento dos fungos, passou-se para a etapa de extração das enzimas secretadas. Os frascos foram agitados a 150 rpm durante 60 minutos em temperatura ambiente, contendo tampão acetato de sódio, 50 mM, pH 5,0, na proporção de 10:1 (tampão: massa de substrato seco). O conteúdo de cada Erlenmeyer foi submetido a um processo de filtração em tecido organza e centrifugado a 10.000 x g, 4 °C, por 15 minutos. Por fim, os sobrenadantes coletados como extratos brutos foram armazenados a -20 °C para posteriores análises enzimáticas.

4.4 Atividades enzimáticas

Os extratos brutos obtidos foram submetidos a diferentes ensaios para determinação das atividades enzimáticas. Para os ensaios baseados na quantificação de açúcares redutores totais, foi utilizado o método colorimétrico do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), descrito por Miller (1959). A atividade de FPase (Filter Paper activity - celulases totais) foi determinada utilizando como substrato o papel de filtro Whatman nº 1 (1 x 6 cm) e o tempo de reação de 60 minutos. Para os ensaios de endoglucanase, mananase e pectinase, o tempo de reação foi de 30 minutos, utilizando como substratos carboximetilcelulose (CMC) 1,25 % (p/v), locust bean gum (0,4 % p/v) e ácido poligalacturônico (0,25 % p/v), respectivamente. A atividade de xilanase foi determinada com o substrato xilana *beechwood* (1,25 % p/v) e um tempo de reação de 15 minutos. A composição da mistura reacional foi dada por 200 µL do substrato diluído em tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5,0, 50 µL de extrato enzimático diluído. A mistura reacional foi colocada em banho-maria a 50 °C, no seu respectivo tempo, paralisada com 250 µL do reagente DNS, seguida de banho fervente por 5 minutos e completada com 500 µL de água destilada, exceto para o ensaio de FPase. Os produtos foram quantificados através da leitura das absorbâncias por espectrofotômetro a 540 nm. Os valores foram aplicados na

equação da reta obtida por curvas-padrão com concentrações de 0 a 0,8 mg/mL de glicose, construídas a partir de solução estoque de glicose a 1 mg/mL.

Os ensaios colorimétricos utilizando os substratos sintéticos ρ -nitrofenil α -D-glicopiranosídeo (ρ -NP α Glc), ρ -nitrofenil β -D-glicopiranosídeo (ρ -NP β Glc), ρ -nitrofenil β -D-xilopiranosídeo (ρ -NP β GXil), ρ -nitrofenil α -D-galactopiranosídeo (ρ -NP α Gal), ρ -nitrofenil β -D-galactopiranosídeo (ρ -NP β Gal), ρ -nitrofenil β -D-arabinopiranosídeo (ρ -NP α Ara) e ρ -nitrofenil β -D-celobipiranosídeo (ρ NP β Cel) foram empregados para determinação da atividade de α -glicosidase, β -glicosidase, β -xilosidase, α -galactosidase, β -galactosidase, α -arabinofuranosidase e β -celobiohidrolase, respectivamente (VISSER *et al.*, 2013). A reação foi composta por 35 μ L de tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5,0, 50 μ L do substrato sintético (ρ -NP) na concentração de 2 mM e 15 μ L do extrato enzimático diluído. Os ensaios foram realizados por 15 minutos em banho-maria, a 50 °C, e as reações interrompidas por 100 μ L de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 0,5 M. As absorbâncias foram lidas por meio de espectrofotômetro a 410 nm e os produtos ρ -Nitrofenol foram quantificados pela equação da reta obtida por curva-padrão com concentrações de 0 a 0,064 μ mol/mL, construída a partir de solução estoque de ρ -Nitrofenol a 2 μ mol/mL.

Para a determinação de atividade de lacase foi utilizado o substrato ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)), com base em Wolfenden & Willson (1982). A mistura reacional foi composta por 800 μ L de tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5,0, 100 μ L de ABTS, 10 mM, e 100 μ L de extrato enzimático diluído. A reação ocorreu a 50 °C, em banho-maria, por 15 minutos, e as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 420 nm. Para quantificação de ABTS oxidado, os valores das absorbâncias foram aplicados na equação combinada (equação 8) de Lambert-Beer (equação 6) e concentração molar (equação 7), utilizando $\varepsilon = 3,6 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$, referente ao composto.

$$A = \varepsilon \times C \times l \quad \text{eq. 6}$$

Em que:

A = Absorbância.

ε = Coeficiente de absorvidade molar.

l = Caminha óptico (1 cm).

$$C = \frac{n}{V} \quad \text{eq. 7}$$

Em que:

C = Concentração molar.

n = Número de mol.

V = Volume da reação.

Substituindo a concentração molar da equação 6 pela equação 7, tem-se a equação 8 para determinação do número de mol do produto.

$$n = \frac{A \times V}{\epsilon \times l} \quad \text{eq. 8}$$

Os ensaios foram realizados em triplicatas para o cálculo das médias e do desvio padrão. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol do produto por minuto nas condições do ensaio.

4.5 Concentração de proteínas

A determinação da concentração proteica dos diferentes extratos foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). O reagente de Bradford foi preparado de modo concentrado (5X), utilizando 100 mg de *Coomassie Brilliant Blue* G-250, 100 mL de ácido fosfórico (H₃PO₄) 85 % (v/v) e 50 mL de etanol 95 % (v/v). Após completa solubilização, o volume foi completado para 200 mL, agitado por 30 minutos e filtrado em papel de filtro Whatman n°1.

O ensaio foi realizado utilizando 600 a 750 µL de água destilada, 50 a 200 µL de extrato enzimático e 200 µL de reagente de Bradford 5X. A mistura reacional foi deixada em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 15 minutos. A leitura da absorbância foi feita no comprimento de onda de 595 nm, e os valores foram aplicados na equação da reta obtida pela curva-padrão previamente realizada com concentração de albumina sérica bovina (BSA) de 0 a 0,035 mg/mL, construída a partir de solução estoque de 0,2 mg/mL.

4.6 Identificação morfológica dos isolados fúngicos

Para identificação morfológica em nível de gênero dos isolados fúngicos, estes foram crescidos por meio de microcultivo no Laboratório de Patologia Florestal, da Universidade Federal de Viçosa. Sob lâminas assépticas foram colocados blocos de aproximadamente 1 cm² de meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), com a lamínula fixada por cima do meio de cultura. Em cada lateral do bloco de BDA foram adicionados fragmentos miceliais do fungo. Em seguida, as lâminas foram colocadas dentro de placa de Petri com algodão embebido em

água autoclavada para fornecer umidade. As placas fechadas foram levadas para sala de crescimento a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 12h sob $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ por, no mínimo, 7 dias. As lâminas e lamínulas, contendo as estruturas fúngicas, foram avaliadas utilizando lactoglicerol como meio de preparo e observadas em microscópio Olympus BX53 (ALFENAS; MAFIA, 2016).

4.7 Extração de DNA total dos fungos selecionados

A partir da seleção dos extratos de maiores atividades enzimáticas, foi realizada a identificação molecular dos respectivos isolados fúngicos. Os isolados foram cultivados em placas contendo meio de cultura BDA e levadas para sala de crescimento a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 12h sob $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. A extração de DNA de culturas de 15 dias foi realizada conforme descrito por Specht *et al.* (1982), com modificações (TEIXEIRA *et al.*, 2011). A qualidade e concentração de DNA total ($\text{ng}/\mu\text{L}$) foram avaliadas usando um espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific).

4.8 Identificação molecular dos fungos selecionados

As amostras de DNA extraídas foram submetidas à PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para amplificação da sequência parcial da região interna transcrita do gene ribossomal (ITS/rRNA), utilizando os primers ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (WHITE *et al.*, 1990). A reação de PCR foi preparada em um volume total de 15 μL contendo 7,5 μL de GoTaq Colorless Master Mix (Promega), 1,5 μL de cada primer 10 mM (Sigma Aldrich), 2 μL de DNA genômico (15 $\text{ng}/\mu\text{L}$) e 2,5 μL de água livre de nuclease. A PCR foi realizada em termociclador Veriti 96 (Applied Biosystems) por meio das seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C por 5 min; 30 ciclos a 94°C por 30 s, 50°C por 30 s, e 72°C por 30 s; e extensão final a 72°C por 4 min.

Para confirmação da amplificação da região ITS, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5 % (p/v) em tampão TAE 1X (Tris-base 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). A eletroforese foi realizada por 1 hora sob tensão elétrica de 80 V, utilizando solução TAE 1X como tampão de corrida. O gel passou para a etapa de revelação, utilizando brometo de etídio (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 15 minutos. As bandas foram visualizadas por meio de fotodocumentador para gel L-PIX (Locus Biotechnology). O tamanho dos fragmentos amplificados foi determinado por comparação com o marcador de peso 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, CA, USA).

Após a confirmação do DNA amplificado, os produtos de PCR foram purificados, utilizando 1 μL do reagente ExoSAP-IT diluído (Applied Biosystems) e 10 μL do DNA amplificado. O tratamento ocorreu a 37 °C por 15 minutos para degradação de primers e nucleotídeos excedentes, e 80 °C por 15 minutos para inativação do reagente, utilizando o termociclador Veriti 96 (Applied Biosystems).

As amostras purificadas foram sequenciadas, utilizando o sequenciador ABI3500 (Applied Biosystems) com base no método de Sanger. Os reagentes e equipamentos utilizados para sequenciamento de DNA foram da Applied Biosystems. As sequências obtidas, por sua vez, passaram por curadoria manual pelo software SeqAssem (HEPPERLE, 2004) e foram submetidas ao megaBLASTn do banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) para identificação preliminar dos fungos.

4.9 Hidrólise enzimática *in vitro* dos cavacos de madeira

Após a análise do perfil enzimático de cada fungo, foram selecionados os extratos cujas atividades enzimáticas se mostraram mais promissoras. Para a avaliação do potencial de hidrólise da madeira pelas enzimas lignocelulolíticas, os melhores extratos foram testados *in vitro* com a presença de cavacos de madeira de *Eucalyptus* spp., cedidos gentilmente pelo Laboratório de Celulose e Papel, da Universidade Federal de Viçosa.

Os ensaios de hidrólise enzimática dos extratos com os cavacos de madeira foram realizados em *shaker* a 40 °C, 250 rpm, durante período de 10 dias. Os cavacos secos foram pesados na proporção de 10 % de biomassa para a reação de hidrólise. Os extratos selecionados foram liofilizados para aumentar a concentração de enzima. O volume reacional foi composto do extrato fúngico contendo 10 ou 20 unidades de FPase para cada grama de biomassa (FPU/g), acrescido de azida de sódio 10 mM e tetraciclina 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a fim de impedir contaminação microbiana, e completado com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Para efeito de comparação, foi realizado o tratamento com o coquetel comercial Multifect® CL (*Genencor Intl.*, USA), contendo celulasas e o tratamento com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, como controle negativo, nas mesmas proporções do extrato fúngico. Cada uma das reações foi realizada em triplicata.

4.9.1 Quantificação de açúcares redutores totais

Alíquotas referentes ao tempo de 0, 5 e 10 dias foram retiradas do meio reacional descrito anteriormente para monitoramento de possíveis produtos da hidrólise enzimática. Para a determinação de açúcares redutores foi realizado ensaio colorimétrico com 3,5-

dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), nas proporções de 250 µL de amostra diluída em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e 250 µL de DNS. O ensaio foi submetido a banho fervente por 5 minutos, resfriado e completado com 500 µL de água destilada e lido em espectrofotômetro a 540 nm. A quantificação dos açúcares redutores foi realizada por meio dos valores das absorbâncias na equação da reta obtida por curva-padrão com concentrações de 0 a 0,8 mg/mL, construída a partir de solução estoque de glicose 1 mg/mL.

4.9.2 Quantificação de glicose e xilose

As alíquotas referentes ao tempo de 0, 5 e 10 dias de reação foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para avaliação dos principais monossacarídeos como produtos finais da ação enzimática, glicose e xilose. As amostras foram filtradas em seringa 0,45 µm e aplicadas no cromatógrafo CBM-20A/20Alite (Shimadzu) com coluna Aminex7 HPX-87H (BioRad), fluxo 0,6 mL/min com solução de ácido sulfúrico 0,005 mol/L para eluição isocrática, temperatura de forno de 65 °C e detecção por índice de refração RID – 20^a (Shimadzu). A concentração dos monossacarídeos foi determinada através da equação da reta obtida pelas curvas analíticas com padrões de D-glicose e D-xilose em concentrações de 0 a 50 g/L, eluídas nas mesmas condições.

4.9.3 Análise estrutural dos cavacos de madeira por Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Óptica

Amostras dos cavacos de *Eucalyptus* sp. secas em estufa 45 °C, após o tratamento, foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), no Núcleo de Microscopia e Microanálise, da Universidade Federal de Viçosa. As amostras foram aderidas aos porta-amostras no plano transversal, originalmente exposto à ação das enzimas, com fita e cola de carbono para transmitir condutividade ao material. A metalização foi realizada com banho de ouro no metalizador Quorum Q150RS e analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura Leo 1430VP com ampliações de 1500, 3000 e 5000X.

Além da microscopia eletrônica, as amostras também foram analisadas por microscopia óptica no Laboratório de Anatomia Vegetal e Morfogênese de Plantas, do Departamento de Biologia Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa. As amostras de cada tratamento foram seccionadas a partir dos cavacos brutos, desidratadas e armazenadas em álcool etílico 70 %. As amostras foram subamostradas resguardando-se a superfície do próprio cavaco, exposta à ação das enzimas.

Em seguida, foram passadas por etapas de desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico e infiltradas em metacrilato (Historesina, Leica Biosystems, EUA), mantidas em refrigeração a 8 °C, por aproximadamente um mês. Os planos de corte foram orientados no momento do emblocamento e seccionados em 8 µm de espessura no plano transversal em micrótomo de arraste (Leica Biosystems, EUA). As lâminas, montadas em triplicata, foram coradas com azul de toluidina por 5 min (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964) e analisadas em microscópio Olympus AX70 acoplado ao sistema U-Photo, organizadas pelo programa Image-Pro Plus em ampliações de 10, 20, 40 e 80X.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição química das biomassas

Os substratos lignocelulósicos podem servir de base orgânica para o cultivo microbiológico de forma econômica e sustentável, produzindo enzimas e metabólitos. Cada fonte de carbono influencia o metabolismo fúngico de modo diferente, haja vista a variação química das biomassas devido à espécie, condições de cultivo, entre outros fatores (DE FREITAS *et al.*, 2021).

O eucalipto e pinus, por serem substratos familiares aos isolados, foram utilizados com o intuito de fomentar a indução de enzimas mais direcionadas à hidrólise da madeira. Bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo também foram avaliados, pois têm demonstrado retornos interessantes na produção de enzimas lignocelulolíticas (ALIYAH *et al.*, 2017; ISMAIL; NOUR; HASSAN, 2022; MORAN-AGUILAR *et al.*, 2021; PAPADAKI *et al.*, 2020; VERMA; KUMAR, 2020).

Dessa forma, a Tabela 3 descreve as frações químicas encontradas nas biomassas utilizadas como fontes de crescimento para os isolados: madeira de eucalipto, madeira de pinus, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo.

Tabela 3 – Composição química das biomassas *in natura* em base seca.

%	Biomassas <i>in natura</i>									
	Eucalipto		Pinus		Bagaço de cana		Sabugo de milho		Farelo de trigo	
Carboidratos totais	56,89	-	56,53	-	49,88	-	35,83	-	32,79	-
Celulose	37,03	±4,65	36,97	±2,18	29,03	±3,53	19,71	±2,03	16,89	±1,66
Hemicelulose	19,86	±0,28	19,56	±0,19	20,85	±2,01	16,12	±1,45	15,90	±1,50
Lignina total	40,86	±1,75	43,05	±0,30	26,22	±0,93	19,88	±0,11	17,13	±0,50
Lignina solúvel	3,39	±0,20	0,15	±0,01	1,31	±0,03	3,07	±0,16	4,14	±0,02
Lignina insolúvel	37,46	±1,86	42,91	±0,30	24,90	±0,92	16,72	±0,09	12,99	±0,51
Proteínas	0,94	±0,14	1,03	±0,01	2,70	±0,01	15,38	±0,36	29,19	±1,68
Cinzas totais	0,93	±0,01	0,41	±0,01	1,83	±0,01	3,40	±0,07	5,72	±0,04
Cinzas na lignina Klason	0,00	±0,00	0,00	±0,00	0,34	±0,00	0,28	±0,05	0,16	±0,13
Balanco de massa	99,62		101,02		80,62		74,48		84,83	

Fonte: A Autora.

Uma vez que as biomassas vegetais serviram como nutrientes para o crescimento fúngico e indução de enzimas, os extrativos foram contabilizados separadamente. Extrativos

são compostos não estruturais que podem ser removidos em sistema de refluxo exaustivo, como resinas, pigmentos, agrotóxicos, proteínas, ceras e gorduras (CHIRAT, 2017; NREL, 2008). A maior fração de extrativos foi encontrada em farelo de trigo, 24,05 %, seguido pelo sabugo de milho, 21,90 %, e bagaço de cana, 20,72 %, enquanto baixos teores, 2,56 % e 1,05 %, foram encontrados em eucalipto e pinus, respectivamente. Como as proteínas são removidas na etapa de extrativos, as frações altas de extrativos do farelo de trigo e sabugo de milho, bem como as baixas frações de extrativos das biomassas lenhosas, podem estar relacionadas às proporções proteicas presentes nas respectivas biomassas.

Frações expressivas de carboidratos totais e lignina foram encontradas em eucalipto e pinus de forma semelhante, o que condiz com o aspecto recalcitrante da madeira em relação às demais biomassas. Em contrapartida, os teores proteicos foram pouco significativos. A fração de proteínas, por sua vez, corresponde a um dos fatores mais colaborativos para o crescimento microbiano, por ser fonte de nitrogênio para os processos anabólicos e catabólicos (YANKOV, 2022). Nesse sentido, o alto teor proteico do farelo de trigo e do sabugo de milho tendem a fomentar maior crescimento fúngico.

As cinzas compõem os elementos inorgânicos da biomassa, compreendendo minerais favoráveis ao metabolismo microbiano, sobretudo como cofatores. O maior teor de cinzas foi encontrado no farelo de trigo, seguido por sabugo de milho e bagaço de cana. As biomassas lenhosas apresentaram teor de cinzas inferior a 1 %, condizente com o teor médio de cinzas para madeiras em geral (FENGEL; WEGENER, 1989).

De forma geral, as biomassas lenhosas se mostraram constituídas majoritariamente do complexo recalcitrante de celulose, hemicelulose e lignina, com valores próximos aos relatados na literatura (BALLONI, 2009; PENÍN *et al.*, 2020; ZANUNCIO *et al.*, 2013). O bagaço de cana apresentou frações equilibradas de celulose e hemicelulose, bem como baixos teores de proteínas e minerais, como relatado por Pimentel *et al.* (2015). O sabugo de milho e o farelo de trigo apresentaram composições distribuídas com boas proporções de proteínas e minerais, já esperado principalmente para o farelo de trigo (SAINI *et al.*, 2022; VERMA; KUMAR, 2020). Associando a composição com o crescimento fúngico e a indução enzimática, o farelo de trigo apresentou os maiores teores de proteína e cinzas, além de menor teor de lignina, proporcionando maior acessibilidade às demais frações estruturais para os microrganismos.

5.2 Atividades enzimáticas após crescimento em meio semissólido dos isolados fúngicos

Por meio dos extratos brutos fúngicos obtidos após cultivo em meio semissólido foi estabelecido o perfil de enzimas lignocelulolíticas secretadas por cada microrganismo,

induzidas por cada fonte de carbono. Para os tempos de crescimento, foi aplicado o Test t de Student ($p < 0,05$), sendo escolhido o menor tempo (5 dias) quando as médias se apresentassem estatisticamente iguais. A partir da definição do tempo de crescimento, foi realizada a comparação entre as fontes de cultivo por meio da análise de variância (ANOVA) com Teste de Tukey a 95 % de probabilidade.

5.2.1 LPF2470 - *Chrysosporthe cubensis*

A Tabela 4 mostra as atividades enzimáticas do fungo *Chrysosporthe cubensis*, um ascomiceto fitopatogênico encontrado em árvores de regiões tropicais e subtropicais, sendo relatado no Brasil como o principal causador da doença do cancro em plantações comerciais de *Eucalyptus* spp. (GRYZENHOUT *et al.*, 2006; GUIMARÃES *et al.*, 2010; MAUSSE-SITOE *et al.*, 2016). Os fungos fitopatogênicos estão associados com alto número de cópias de genes que codificam CAZymes, uma vez que eles precisam de maquinaria extracelular para degradar os componentes da parede celular de plantas (KIKOT; HOURS; ALCONADA, 2009; ZANNE *et al.*, 2020).

Entre as biomassas testadas, o cultivo em farelo de trigo em 8 dias se sobressaiu de modo unânime na indução das maiores atividades enzimáticas e concentração de proteínas do fungo, concordando com trabalhos anteriores do grupo de pesquisa, em que a mesma biomassa também se sobressaiu quando comparada com polpa Kraft e sabugo de milho em condições de cultivo semelhantes (FALKOSKI *et al.*, 2013). O diferencial mostrado pelo farelo de trigo pode estar relacionado com o alto teor de proteínas nesse substrato, que por sua vez, serve como fonte de nitrogênio para o metabolismo do fungo.

Neste trabalho, a etapa de pré-inóculo foi omitida como forma de reduzir etapas e custos para a aplicação e, ainda assim, foi possível notar uma alta produção enzimática: celulases totais (FPase – 1,246 U/mL), endoglucanase (CMCases – 2,779 U/mL), xilanase (24,644 U/mL), β -glicosidase (1,547 U/mL), β -celobiohidrolase (0,846 U/mL), lacase ($3,0 \cdot 10^{-4}$ U/mL) e 0,346 mg/mL de proteínas.

No estudo sobre o secretoma do fungo *C. cubensis*, realizado por Tavares e colaboradores (2021), a etapa do pré-inóculo antes do cultivo em meio semissólido foi realizada e atividades de 4,75 U/mL de endoglucanase, 42,61 U/mL de xilanase, 1,71 U/mL de β -glicosidase, 1,11 U/mL de β -celobiohidrolase e 0,03 U/mL de lacase foram detectadas. Em contrapartida, ainda com a presença de pré-inóculo, Visser e colegas (2013) encontraram valores próximos de proteína (0,390 mg/mL), e atividades de endoglucanase (2,95 U/mL) e xilanase (19,77 U/mL). Dessa forma, considera-se que o inóculo direto de *C. cubensis* em meio

semissólido, sem a etapa de pré-inóculo, foi capaz de induzir uma produção hemicelulolítica considerável.

Tabela 4 – Atividades enzimáticas (U/mL) e concentração de proteínas (mg/mL) do extrato bruto de *Chrysosporthe cubensis* crescido em eucalipto, pinus, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo.

<i>Chrysosporthe cubensis</i>										
Atividades (U/mL)	Eucalipto		Pinus		Bagaço de cana		Sabugo de milho		Farelo de trigo	
	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias
FPase	0,909±0,06 a A	1,046±0,10 a	0,867±0,09 a A	0,854±0,12 a	1,198±0,14 a A	1,138±0,08 a	1,046±0,08 a A	1,040±0,12 a	0,755±0,09 b	1,246±0,19 a A
Endoglucanase	0,200±0,01 b	0,287±0,01 a C	0,247±0,01 b	0,297±0,02 a C	1,289±0,03 a B	0,703±0,09 b	0,240±0,03 b	0,381±0,02 a C	1,743±0,07 b	2,779±0,14 a A
Xilanase	1,668±0,09 b	7,710±0,15 a C	1,471±0,05 b	5,303±0,21 a D	3,566±0,24 a D	0,815±0,14 b	5,080±0,23 b	10,35±0,29 a B	4,844±0,07 b	24,64±0,54 a A
Mananase	0,151±0,01 b	0,315±0,01 a C	0,097±0,01 b	0,166±0,01 a C	1,029±0,23 a B	1,165±0,13 a	0,107±0,02 b	0,190±0,02 a C	1,212±0,03 b	1,493±0,09 a A
Pectinase	0,974±0,11 a B	0,777±0,10 a	0,701±0,14 a B	0,276±0,11 b	0,842±0,11 a B	0,246±0,03 b	1,128±0,08 a B	0,737±0,13 b	2,882±0,37 a A	3,408±0,18 a
α-Glicosidase	0,003±0,00 b	0,005±0,00 a B	0,001±0,00 b	0,003±0,00 a B	0,004±0,00 b	0,006±0,00 a B	0,003±0,00 b	0,009±0,00 a B	0,013±0,00 b	0,052±0,00 a A
β-Glicosidase	0,162±0,02 b	0,239±0,03 a B	0,026±0,01 b	0,081±0,01 a C	0,068±0,01 a C	0,088±0,00 a	0,056±0,01 b	0,209±0,02 a BC	1,168±0,01 b	1,547±0,15 a A
β-Xilosidase	0,019±0,00 b	0,032±0,00 a B	0,003±0,00 b	0,005±0,00 a D	0,002±0,00 b	0,003±0,00 a E	0,003±0,00 b	0,017±0,00 a C	0,015±0,00 b	0,059±0,00 a A
α-Galactosidase	0,008±0,00 b	0,018±0,00 a B	0,003±0,00 b	0,006±0,00 a C	0,003±0,00 b	0,007±0,00 a C	0,004±0,00 b	0,021±0,00 a B	0,048±0,00 b	0,370±0,01 a A
β-Galactosidase	0,005±0,00 b	0,009±0,00 a B	0,003±0,00 a B	0,004±0,00 a	0,003±0,00 b	0,005±0,00 a B	0,004±0,00 a B	0,005±0,00 a	0,023±0,00 b	0,044±0,00 a A
β-Celobiohidrolase	0,048±0,00 b	0,089±0,01 a B	0,005±0,00 b	0,026±0,01 a C	0,017±0,00 b	0,028±0,00 a C	0,014±0,00 b	0,039±0,00 a C	0,044±0,00 b	0,846±0,04 a A
α-Arabinofuranosidase	0,020±0,00 b	0,038±0,00 a B	0,007±0,00 b	0,011±0,00 a C	nd	nd	0,005±0,00 a C	0,007±0,00 a	0,088±0,01 b	0,618±0,01 a A
Lacase	nd	nd	0,00005±0 a B	0,00004±0,0 a	nd	nd	nd	nd	0,00008±0 b	0,0003±0 a A
Proteína (mg/mL)	0,039±0,00	0,030±0,01	0,007±0,00	0,021±0,00	0,018±0,01	0,033±0,01	0,059±0,01	0,092±0,01	0,156±0,01	0,346±0,00

Fonte: A Autora. Letras minúsculas distintas, entre os tempos, diferem ao nível de $p < 0,05$ pelo Teste t de Student e letras maiúsculas distintas, em toda linha, diferem ao nível de $p < 0,05$ pelo Teste de Tukey a 95% de confiança. nd = não determinado; ± desvio padrão.

5.2.2 GPF132 - *Kretzschmaria zonata*

O fungo *Kretzschmaria zonata* foi recentemente relatado no Brasil como um fitopatógeno causador da podridão do colo da raiz em folhosas de *Tectona grandis* (ALFENAS *et al.*, 2020). Sua capacidade de virulência se mostrou interessante para a obtenção de enzimas lignocelulolíticas para aplicações biotecnológicas, sendo recentemente relatado seu perfil enzimático (DA LUZ MORALES *et al.*, 2021).

As atividades de *K. zonata* são descritas na Tabela 5. Dentre as biomassas testadas, a maior parte das enzimas apresentou maiores atividades em farelo de trigo, após 8 dias de crescimento do fungo, acompanhadas pela maior concentração de proteínas (0,296 mg/mL). Lacases foram detectadas somente nessa condição ($1,0 \cdot 10^{-4}$ U/mL). Pinus foi a biomassa que induziu a menor variedade de enzimas. As atividades inferiores dos substratos lenhosos (eucalipto e pinus) podem ser relacionadas com o baixo teor proteico dessas biomassas, embora a maior atividade de xilanase tenha ocorrido de modo pontual em eucalipto, após 8 dias de crescimento do fungo (4,152 U/mL).

Embora Da Luz Morales *et al.* (2021) tenha descrito o sabugo de milho como um bom indutor de enzimas para o fungo, neste trabalho o farelo de trigo se sobressaiu ao sabugo de milho, podendo considerar que as diferentes origens e composições da biomassa podem alterar molecularmente a expressão das enzimas. Além disso, a presença de pré-inóculo também pode ter contribuído para a diferença de atividades. Com relação ao farelo de trigo testado também por Da Luz Morales *et al.* (2021), valores próximos foram notados para concentração de proteínas (0,358 mg/mL) e xilanase (3,221 U/mL), enquanto outras enzimas apresentaram atividades inferiores quando comparadas com este trabalho, como endoglucanase (0,772 U/mL), FPase (0,215 U/mL), mananase (0,178 U/mL) e pectinase (0,269 U/mL).

Tabela 5 – Atividades enzimáticas (U/mL) e concentração de proteínas (mg/mL) do extrato bruto de *Kretzschmaria zonata* crescido em eucalipto, pinus, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo.

<i>Kretzschmaria zonata</i>										
Atividades (U/mL)	Eucalipto		Pinus		Bagaço de cana		Sabugo de milho		Farelo de trigo	
	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias
FPase	1,083±0,07 a AB	0,870±0,10 a	1,031±0,03 a AB	0,785±0,14 b	0,845±0,14 b	1,145±0,11 a A	0,953±0,04 a AB	0,982±0,07 a	0,870±0,06 a B	0,908±0,12 a
Endoglucanase	0,192±0,01 b	0,291±0,03 a B	0,073±0,01 b	0,215±0,02 a B	nd	0,677±0,07 B	0,777±0,01 a B	1,007±0,09 a	1,907±0,31 a A	1,082±0,24 b
Xilanase	1,155±0,08 b	4,152±0,59 a A	0,085±0,00 b	1,156±0,09 a C	0,705±0,24 b	1,185±0,10 a BC	0,600±0,04 a C	0,950±0,15 a	0,876±0,20 b	2,275±0,32 a B
Mananase	0,124±0,01 b	0,219±0,01 a C	0,057±0,01 a C	0,074±0,01 a	0,741±0,08 a A	0,547±0,05 a	0,036±0,00 b	0,383±0,14 a B	0,711±0,12 a A	0,594±0,13 a
Pectinase	0,567±0,09 a B	0,375±0,06 a	0,565±0,04 a B	0,401±0,07 a	0,637±0,17 a B	0,599±0,04 a	0,827±0,13 a AB	0,535±0,02 a	1,119±0,14 a A	1,214±0,17 a
α-Glicosidase	0,004±0,00 a B	0,004±0,00 a	0,001±0,00 a C	0,001±0,00 a	0,003±0,00 a BC	0,003±0,00 a	0,003±0,00 a BC	0,002±0,00 b	0,004±0,00 b	0,007±0,00 a A
β-Glicosidase	0,006±0,00 b	0,038±0,00 a B	0,004±0,00 a B	0,004±0,00 a	0,007±0,00 b	0,020±0,00 a B	0,004±0,00 a B	0,005±0,00 a	0,115±0,01 b	0,299±0,02 a A
β-Xilosidase	0,002±0,00 b	0,004±0,00 a B	nd	0,001±0,00 B	nd	0,002±0,00 B	nd	0,002±0,00 B	0,005±0,00 b	0,014±0,00 a A
α-Galactosidase	0,006±0,00 b	0,008±0,00 a C	0,001±0,00 b	0,002±0,00 a D	0,003±0,00 b	0,015±0,00 a B	0,003±0,00 a CD	0,003±0,00 a	0,029±0,00 b	0,386±0,01 a A
β-Galactosidase	0,001±0,00 a B	0,001±0,00 a	nd	nd	nd	0,002±0,00 B	0,001±0,00 b	0,002±0,00 a B	0,008±0,00 b	0,032±0,00 a A
β-Celobiohidrolase	nd	0,008±0,00 B	nd	nd	nd	0,005±0,00 B	nd	nd	0,019±0,01 b	0,043±0,01 a A
α-Arabinofuranosidase	nd	0,002±0,00 B	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,054±0,00 b	0,179±0,00 a A
Lacase	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,0001±0
Proteína (mg/mL)	0,041±0,00	0,042±0,00	0,024±0,00	0,018±0,00	0,016±0,00	0,056±0,00	0,067±0,00	0,082±0,01	0,191±0,00	0,296±0,02

Fonte: A Autora. Letras minúsculas distintas, entre os tempos, diferem ao nível de $p < 0,05$ pelo Teste t de Student e letras maiúsculas distintas, em toda linha, diferem ao nível de $p < 0,05$ pelo Teste de Tukey a 95% de confiança. nd = não determinado; ± desvio padrão.

5.2.3 31-37-E - *Bartalinia pondoensis*

Ainda pouco discutido na literatura, o fungo *Bartalinia pondoensis* foi descrito em 2010 na África do Sul (MARINCOWITZ; GRYZENHOUT; WINGFIELD, 2010). Este fungo, classificado como um ascomiceto endofítico, coloniza os tecidos vegetais sem causar doença imediata (MOHAMED *et al.*, 2021; ZAHER *et al.*, 2014). Atividades de ligninases foram listadas para uma cepa de *B. pondoensis* (MATTOO; NONZOM, 2022).

O perfil enzimático de *B. pondoensis* pode ser visualizado na Tabela 6. As atividades de FPase não apresentaram discrepâncias significativas entre as biomassas, mas se mostraram maiores após o tempo de 5 dias. A maioria das enzimas se mostraram mais promissoras a partir do farelo de trigo, bem como o teor de proteínas após 8 dias (0,270 mg/mL). Lacases não foram detectadas nas demais fontes de carbono testadas e a maior atividade encontrada no farelo de trigo foi de ordem diminuta ($3,0 \cdot 10^{-6}$ U/mL).

Yadav e colaboradores (2022) recentemente isolaram e caracterizaram uma CMCase termoestável de *B. pondoensis* comparado com outros isolados endofíticos. A máxima atividade da celulase foi obtida após crescimento em meio semissólido com folha de eucalipto. No presente trabalho é possível notar que as maiores atividades de CMCase (endoglucanase) ocorreram em sabugo de milho e farelo de trigo (1,174 e 1,031 U/mL, respectivamente). No entanto, a madeira de eucalipto se destacou na indução de xilanase em 8 dias (13,771 U/mL) e celulases, como β -celobiohidrolase (0,090 U/mL) e β -glicosidase (0,354 U/mL).

Tabela 6 – Atividades enzimáticas (U/mL) e concentração de proteínas (mg/mL) do extrato bruto de *Bartalinia pondoensis* crescido em eucalipto, pinus, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo.

<i>Bartalinia pondoensis</i>										
Atividades (U/mL)	Eucalipto		Pinus		Bagaço de cana		Sabugo de milho		Farelo de trigo	
	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias
FPase	0,837±0,19 a A	0,622±0,06 a	0,893±0,10 a A	0,680±0,08 b	0,878±0,06 a A	0,687±0,10 b	0,927±0,12 a A	0,657±0,05 b	0,911±0,02 a A	0,697±0,15 b
Endoglucanase	0,295±0,01 b	0,585±0,01 a B	0,273±0,02 b	0,430±0,04 a B	0,637±0,07 a B	0,590±0,04 a	0,654±0,05 b	1,174±0,17 a A	0,597±0,03 b	1,031±0,09 a A
Xilanase	5,721±0,08 b	13,77±0,56 a A	2,409±0,05 b	4,057±0,16 a C	1,064±0,12 b	3,659±0,09 a C	1,918±0,09 b	7,225±0,13 a B	1,116±0,07 b	4,277±0,08 a C
Mananase	0,377±0,01 b	0,618±0,01 a C	0,297±0,01 b	0,443±0,01 a D	0,294±0,09 b	0,555±0,03 a BC	0,181±0,02 b	0,687±0,15 a B	0,248±0,02 b	1,246±0,03 a A
Pectinase	0,557±0,07 a B	0,559±0,15 a	0,633±0,08 a AB	0,597±0,15 a	0,492±0,03 a B	0,755±0,22 a	0,750±0,08 a AB	0,834±0,17 a	0,893±0,08 a A	1,298±0,26 a
α-Glicosidase	0,003±0,00 b	0,005±0,00 a CD	0,001±0,00 b	0,003±0,00 a D	0,003±0,00 b	0,006±0,00 a BC	0,004±0,00 b	0,008±0,00 a B	0,004±0,00 b	0,016±0,00 a A
β-Glicosidase	0,144±0,01 b	0,354±0,02 a B	0,048±0,01 a D	0,054±0,00 a	0,006±0,00 b	0,049±0,00 a D	0,014±0,00 b	0,140±0,01 a C	0,043±0,00 b	0,410±0,03 a A
β-Xilosidase	0,007±0,00 b	0,018±0,00 a B	0,002±0,00 b	0,003±0,00 a C	0,004±0,00 b	0,015±0,00 a B	0,002±0,00 b	0,015±0,00 a B	0,002±0,00 b	0,044±0,00 a A
α-Galactosidase	0,005±0,00 b	0,008±0,00 a B	0,007±0,00 a B	0,003±0,00 b	nd	0,013±0,00 B	0,003±0,00 b	0,016±0,00 a B	0,002±0,00 b	0,343±0,00 a A
β-Galactosidase	0,004±0,00 b	0,013±0,00 a C	0,005±0,00 a E	0,005±0,00 a	0,002±0,00 b	0,008±0,00 a D	0,003±0,00 b	0,016±0,00 a B	0,004±0,00 b	0,062±0,00 a A
β-Celobiohidrolase	0,040±0,01 b	0,090±0,01 a A	0,003±0,00 b	0,011±0,00 a C	nd	0,006±0,00 C	0,006±0,01 b	0,090±0,01 a A	nd	0,058±0,00 B
α-Arabinofuranosidase	0,048±0,00 a B	0,029±0,00 b	0,040±0,00 a C	0,029±0,00 b	nd	0,003±0,00 D	nd	0,037±0,00 C	0,004±0,00 b	0,169±0,00 a A
Lacase	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,000001± 0 ^b	0,000003± 0 ^{a A}
Proteína (mg/mL)	0,009±0,01	0,057±0,02	0,010±0,00	0,016±0,00	0,007±0,01	0,026±0,00	0,018±0,01	0,132±0,02	0,058±0,01	0,270±0,02

Fonte: A Autora. Letras minúsculas distintas, entre os tempos, diferem ao nível de $p < 0,05$ pelo Teste t de Student e letras maiúsculas distintas, em toda linha, diferem ao nível de $p < 0,05$ pelo Teste de Tukey a 95% de confiança. nd = não determinado; ± desvio padrão.

5.2.4 21-37-1 - *Cytospora austromontana*

O fungo *Cytospora austromontana*, é um ascomiceto cuja presença é relatada em espécies lenhosas, principalmente em eucalipto (ADAMS; ROUX; WINGFIELD, 2006). Dentre as biomassas testadas, a Tabela 7 mostrou algumas atividades enzimáticas maiores a partir de eucalipto e pinus, bem como a partir do cultivo em farelo de trigo em cinco dias, acompanhado pela maior concentração proteica (0,040 mg/mL). A presença de lacase ocorreu em todas as biomassas testadas, sendo a maior atividade vista em farelo de trigo ($2,0 \cdot 10^{-4}$ U/mL). O fungo também foi um bom indutor de xilanase em farelo de trigo (20,01 U/mL). α -glicosidases, por sua vez, não foram secretadas em nenhum substrato lignocelulósico.

Tabela 7 – Atividades enzimáticas (U/mL) e concentração de proteínas (mg/mL) do extrato bruto de *Cytospora austromontana* crescido em eucalipto, pinus, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo.

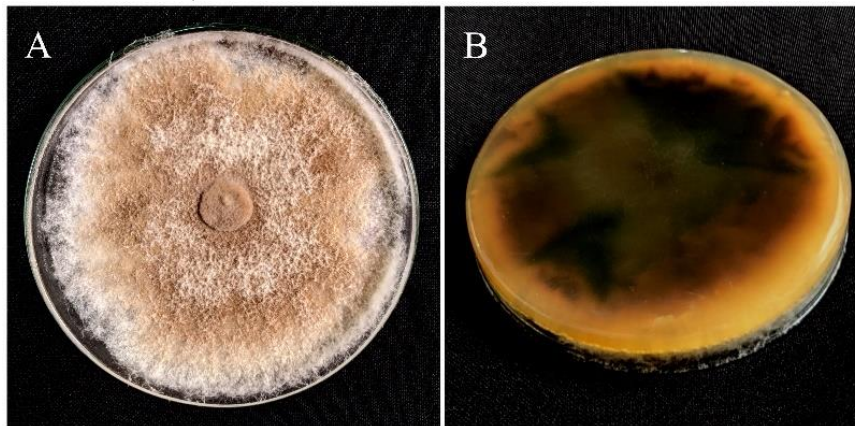
<i>Cytospora austromontana</i>										
Atividades (U/mL)	Eucalipto		Pinus		Bagaço de cana		Sabugo de milho		Farelo de trigo	
	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias
FPase	0,710±0,10 a B	0,890±0,07 a	0,761±0,03 a B	0,928±0,20 a	0,818±0,11 a B	0,708±0,13 a	0,919±0,16 a AB	0,625±0,11 a	0,717±0,26 b	1,213±0,14 a A
Endoglucanase	0,169±0,02 a D	0,186±0,03 a	0,227±0,02 b	0,397±0,03 a C	0,532±0,01 a B	0,593±0,04 a	0,550±0,02 a B	0,721±0,05 a	0,776±0,03 a A	0,590±0,05 b
Xilanase	3,268±0,14 b	5,636±0,23 a C	0,619±0,06 b	3,620±0,14 a D	0,796±0,03 b	1,095±0,04 a E	1,179±0,05 b	15,47±0,60 a B	20,01±0,73 a A	6,703±0,15 b
Mananase	0,288±0,01 a B	0,241±0,01 b	0,129±0,01 b	0,241±0,01 a B	0,897±0,04 a A	0,955±0,09 a	0,841±0,07 a A	0,915±0,04 a	0,974±0,05 a A	0,920±0,04 a
Pectinase	0,643±0,16 a A	0,730±0,00 a	0,913±0,10 a A	0,929±0,04 a	0,380±0,01 a A	0,461±0,08 a	0,402±0,03 a A	0,550±0,06 a	0,514±0,13 a A	0,382±0,08 a
α-Glicosidase	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
β-Glicosidase	0,067±0,01 a A	0,008±0,00 b	0,021±0,00 a C	0,004±0,00 b	0,005±0,00 b	0,016±0,00 a C	0,012±0,00 b	0,040±0,00 a B	0,055±0,00 a A	0,021±0,01 b
β-Xilosidase	0,017±0,00 b	0,022±0,00 a A	0,004±0,00 b	0,007±0,00 a C	nd	nd	nd	0,003±0,00 D	0,010±0,00 B	nd
α-Galactosidase	0,034±0,00 b	0,043±0,00 a A	0,003±0,00 b	0,011±0,00 a C	0,001±0,00 a D	0,002±0,00 a	nd	nd	0,027±0,00 B	nd
β-Galactosidase	0,037±0,00 b	0,044±0,00 a B	0,032±0,00 b	0,043±0,00 a B	nd	0,002±0,00 C	nd	0,004±0,00 C	0,062±0,00 A	nd
β-Celobiohidrolase	0,037±0,00 a A	0,036±0,00 a	0,048±0,01 a A	0,028±0,00 a	nd	nd	nd	0,001±0,00 C	0,016±0,00 B	nd
α-Arabinofuranosidase	0,077±0,01 b	0,092±0,01 a B	0,046±0,00 b	0,070±0,01 a C	nd	0,009±0,00 D	nd	0,024±0,00 D	0,182±0,01 a A	0,022±0,00 b
Lacase	nd	0,000004±0 D	0,000001±0 b	0,000002±0 a D	0,00005±0 a B	0,00004±0 b	0,00003±0 a C	0,00001±0 b	0,0002±0 a A	0,00003±0 b
Proteína (mg/mL)	0,027±0,00	0,034±0,00	0,016±0,00	0,023±0,00	0,026±0,00	0,023±0,00	0,010±0,00	0,009±0,01	0,040±0,02	0,022±0,01

Fonte: A Autora. Letras minúsculas distintas, entre os tempos, diferem ao nível de $p < 0,05$ pelo Teste t de Student e letras maiúsculas distintas, em toda linha, diferem ao nível de $p < 0,05$ pelo Teste de Tukey a 95% de confiança. nd = não determinado; ± desvio padrão.

5.2.5 LPF2177

O isolado LPF2177 não apresentou formação de estruturas reprodutivas para identificação preliminar a nível morfológico (Figura 7). Considerando o aspecto morfológico de crescimento, sugere-se se tratar de *Calonectria* sp., um gênero de fungos ascomicetos que inclui muitos fitopatógenos causadores de doenças em diversas espécies florestais, agrícolas e ornamentais (LI *et al.*, 2022; LIU *et al.*, 2020).

Figura 7 – Morfologia do isolado LPF2177. A – Cultura do fungo em meio de cultura BDA após 10 dias de crescimento, visão superior. B – Cultura do fungo em meio de cultura BDA após 10 dias de crescimento, visão inferior.



Fonte: A Autora.

As atividades enzimáticas do isolado LPF2177 são mostradas na Tabela 8. A atividade de celulases totais não diferiu estatisticamente entre as biomassas. A maioria das enzimas apresentou maiores atividades para as fontes de carbono sabugo de milho e farelo de trigo, sendo o sabugo de milho após 8 dias o indutor mais expressivo para xilanase (23,43 U/mL), mananase (3,133 U/mL), β -glicosidase (0,963 U/mL), β -galactosidase (0,097 U/mL) e β -celobiohidrolase (0,069 U/mL). O teor de proteínas induzido por sabugo de milho e farelo de trigo foram próximos (0,237 mg/mL e 0,281 mg/mL, respectivamente), reforçando que o sabugo de milho foi um bom indutor para o fungo se comparado ao farelo de trigo, que comumente apresenta essa característica.

Tabela 8 – Atividades enzimáticas (U/mL) e concentração de proteínas (mg/mL) do extrato bruto do isolado LPF2177 crescido em eucalipto, pinus, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo.

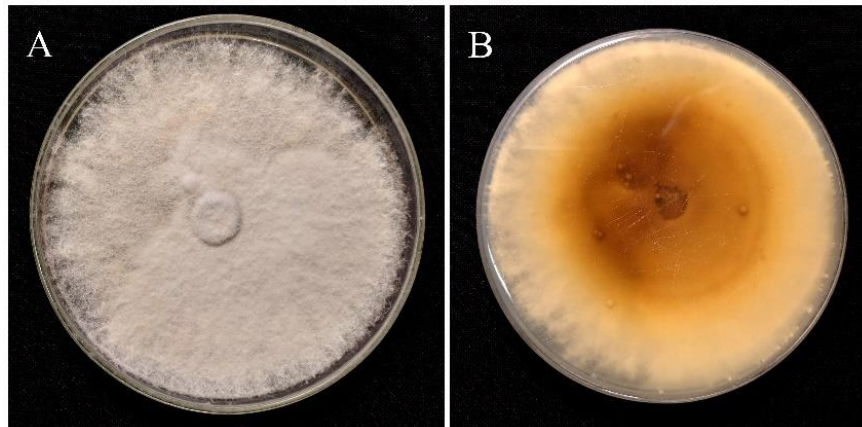
LPF 2177										
Atividades (U/mL)	Eucalipto		Pinus		Bagaço de cana		Sabugo de milho		Farelo de trigo	
	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias
FPase	nd	0,698±0,02 A	0,708±0,09 a A	0,896±0,10 a	0,896±0,12 a A	0,765±0,14 a	0,841±0,09 a A	0,914±0,14 a	0,772±0,04 a A	1,182±0,16 a
Endoglucanase	0,236±0,01 b	0,319±0,01 a C	0,199±0,02 b	0,321±0,01 a C	0,949±0,18 a A	0,191±0,01 b	0,675±0,09 a B	0,410±0,03 b	1,216±0,12 a A	1,590±0,13 a
Xilanase	1,380±0,06 b	6,944±0,43 a B	0,557±0,06 b	2,273±0,12 a C	1,219±0,18 b	2,119±0,07 a C	1,728±0,16 b	23,43±0,91 a A	3,802±0,59 b	7,612±0,63 a B
Mananase	0,403±0,03 b	1,221±0,10 a C	0,223±0,01 b	1,470±0,10 a C	0,566±0,23 a D	0,458±0,09 a	0,371±0,07 b	3,133±0,11 a A	1,054±0,13 b	2,022±0,24 a B
Pectinase	7,949±0,06 a B	4,111±0,12 b	10,37±0,05 b	12,56±0,56 a A	1,027±0,20 a D	0,600±0,08 a	2,179±0,04 a CD	0,668±0,02 b	4,255±0,34 a C	1,952±0,02 a
α-Glicosidase	0,003±0,00 a C	0,003±0,00 a	0,002±0,00 b	0,003±0,00 a C	0,001±0,00 a D	0,002±0,00 a	0,004±0,00 b	0,010±0,00 a B	0,006±0,00 b	0,012±0,00 a A
β-Glicosidase	0,144±0,01 b	0,191±0,00 a C	0,128±0,01 b	0,200±0,00 a C	0,061±0,00 b	0,086±0,01 a D	0,188±0,00 b	0,963±0,02 a A	0,258±0,02 b	0,586±0,02 a B
β-Xilosidase	0,009±0,00 a C	0,011±0,00 a	0,007±0,00 b	0,010±0,00 a C	0,001±0,00 b	0,004±0,00 a D	0,005±0,00 b	0,015±0,00 a B	0,015±0,00 b	0,041±0,00 a A
α-Galactosidase	0,043±0,00 a C	0,037±0,00 b	0,024±0,00 b	0,031±0,00 a B	0,003±0,00 b	0,012±0,00 a D	0,051±0,00 b	0,122±0,00 a A	0,116±0,01 b	0,225±0,00 a A
β-Galactosidase	0,041±0,00 b	0,045±0,00 a C	0,045±0,00 b	0,080±0,01 a B	0,008±0,00 b	0,019±0,00 a D	0,025±0,00 b	0,097±0,00 a A	0,052±0,00 b	0,092±0,00 a A
β-Celobiohidrolase	0,008±0,00 b	0,045±0,00 a B	0,009±0,00 b	0,049±0,01 a B	nd	0,014±0,00 C	0,036±0,00 b	0,069±0,01 a A	0,012±0,00 b	0,023±0,00 a C
α-Arabinofuranosidase	0,075±0,01 a CD	0,049±0,01 b	0,015±0,01 b	0,070±0,01 a C	nd	0,025±0,00 D	0,040±0,01 b	0,134±0,01 a B	0,154±0,11 b	0,180±0,01 a A
Lacase	nd	nd	nd	nd	0,00001±0 b	0,00003±0 a B	0,00004±0 a A	0,00001±0 b	nd	0,00001±0 C
Proteína (mg/mL)	0,036±0,00	0,042±0,00	0,023±0,00	0,040±0,00	0,049±0,01	0,047±0,01	0,147±0,00	0,237±0,01	0,172±0,01	0,281±0,01

Fonte: A Autora. Letras minúsculas distintas, entre os tempos, diferem ao nível de $p < 0,05$ pelo Teste t de Student e letras maiúsculas distintas, em toda linha, diferem ao nível de $p < 0,05$ pelo Teste de Tukey a 95% de confiança. nd = não determinado; ± desvio padrão.

5.2.6 LPF2180

O fungo LPF2180 também não apresentou formação de estruturas reprodutivas para identificação preliminar a nível morfológico (Figura 8). No entanto, sugere-se se tratar de *Hypoxylon* sp., por ter sido isolado de estromas típicos do fungo presentes em madeira, o que é característico desse gênero (KUHNER *et al.*, 2021). *Hypoxylon* spp. são ascomicetos relacionados como endófitos em seus estados vegetativos e saprófitos de hospedeiros em decomposição (KUHNER *et al.*, 2014).

Figura 8 – Morfologia do isolado LPF2180. A – Cultura do fungo em meio de cultura BDA após 10 dias de crescimento, visão superior. B – Cultura do fungo em meio de cultura BDA após 10 dias de crescimento, visão inferior.



Fonte: A Autora.

Diferentemente dos demais fungos, o isolado LPF2180 apresentou resultados interessantes a partir do crescimento em pinus (Tabela 9). Por ser uma biomassa lenhosa com baixo teor de proteínas e minerais, a indução das enzimas tende a ser mais limitada. No entanto, fungos que são hospedeiros e/ou patógenos desse material vegetal podem apresentar uma maquinaria celular favorável que explique a preferência para esse tipo de substrato.

Maiores atividades foram encontradas em pinus para mananase (1,503 U/mL), pectinase (17,09 U/mL), β -xilosidase (0,114 U/mL), α -galactosidase (0,304 U/mL), β -galactosidase (0,513 U/mL) e β -celobiohidrolase (0,054 U/mL). Como a maior parte dessas enzimas atuam na hidrólise da hemicelulose, a maior indução delas pode estar associada ao alto teor de hemicelulose do pinus.

Tabela 9 – Atividades enzimáticas (U/mL) e concentração de proteínas (mg/mL) do extrato bruto do isolado LPF2180 crescido em eucalipto, pinus, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo.

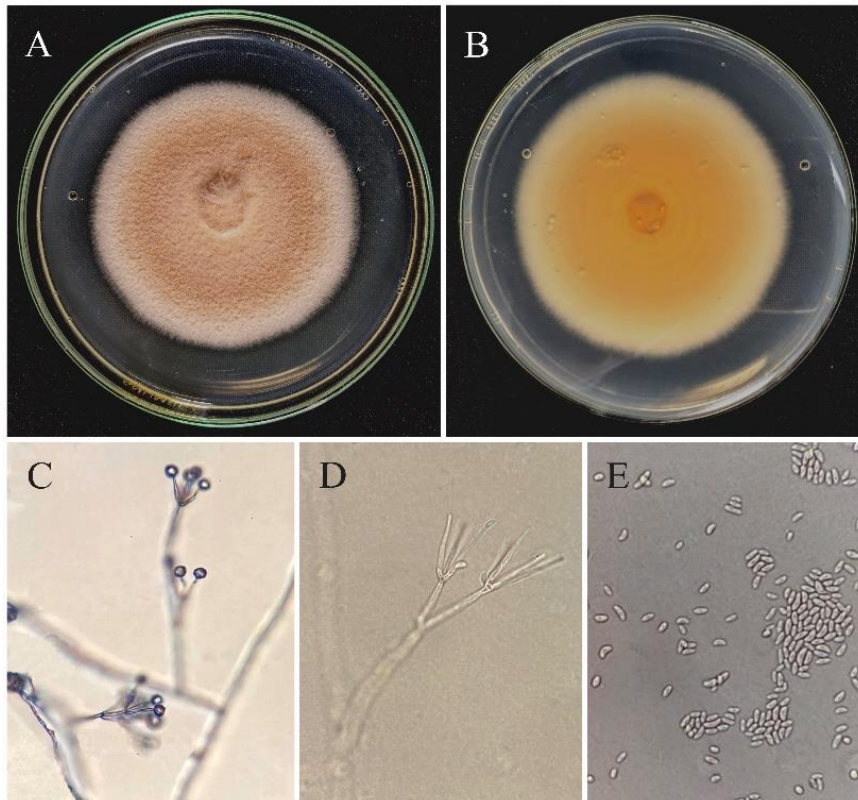
LPF 2180										
Atividades (U/mL)	Eucalipto		Pinus		Bagaço de cana		Sabugo de milho		Farelo de trigo	
	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias
FPase	0,736±0,01 b	0,867±0,04 a AB	0,998±0,16 a AB	0,712±0,06 b	1,121±0,16 a A	0,933±0,08 a	0,882±0,17 a AB	0,855±0,15 a	0,683±0,12 a B	0,610±0,09 a
Endoglucanase	0,148±0,01 b	0,305±0,01 a B	0,223±0,01 b	0,369±0,02 a B	0,881±0,23 a A	0,027±0,03 b	1,115±0,16 a B	0,240±0,01 b	1,047±0,07 a A	1,132±0,14 a
Xilanase	0,576±0,06 b	1,790±0,11 a C	0,741±0,04 b	1,507±0,05 a C	1,883±0,14 a C	1,023±0,26 b	1,644±0,38 b	10,629±0,1 5 a A	5,544±0,59 b	8,520±0,43 a B
Mananase	0,136±0,02 b	0,898±0,09 a BC	0,389±0,04 b	1,503±0,15 a A	0,569±0,18 a C	0,682±0,15 a	0,466±0,18 b	1,445±0,19 a A	1,205±0,22 a AB	1,573±0,19 a
Pectinase	3,657±0,12 a B	4,314±0,25 a	10,40±0,38 b	17,09±0,52 a A	1,380±0,33 a C	1,339±0,30 a	1,417±0,07 a C	0,515±0,02 b	3,641±0,09 a B	0,735±0,08 b
α-Glicosidase	0,002±0,00 b	0,004±0,00 a A	0,002±0,00 a B	0,003±0,00 a	0,002±0,00 a B	0,002±0,00 a	0,002±0,00 a B	0,002±0,00 a	0,004±0,00 a A	0,005±0,00 a
β-Glicosidase	0,067±0,00 b	0,200±0,00 a D	0,156±0,00 b	0,326±0,01 a C	0,111±0,00 b	0,174±0,00 a D	0,102±0,00 b	0,941±0,04 a A	0,363±0,01 b	0,701±0,02 a B
β-Xilosidase	0,005±0,00 b	0,011±0,00 a C	0,007±0,00 b	0,114±0,00 a A	0,004±0,00 b	0,007±0,00 a CD	0,001±0,00 b	0,016±0,00 a B	0,003±0,00 b	0,005±0,00 a D
α-Galactosidase	0,012±0,00 b	0,032±0,00 a C	0,022±0,00 b	0,304±0,04 a A	0,006±0,00 a C	0,007±0,00 a	0,023±0,00 b	0,036±0,00 a C	0,080±0,00 b	0,093±0,00 a B
β-Galactosidase	0,012±0,00 b	0,028±0,00 a BC	0,026±0,00 b	0,513±0,02 a A	0,006±0,00 b	0,011±0,00 a C	0,009±0,00 b	0,058±0,01 a B	0,025±0,00 b	0,059±0,00 a B
β-Celobiohidrolase	0,001±0,00 b	0,044±0,00 a AB	0,004±0,00 b	0,054±0,01 a A	nd	0,016±0,01 C	0,003±0,00 b	0,010±0,00 a C	0,021±0,00 b	0,015±0,00 a BC
α-Arabinofuranosidase	0,030±0,01 b	0,078±0,01 a A	0,045±0,01 a B	0,069±0,00 a	0,004±0,00 a C	0,006±0,00 a	0,015±0,01 a BC	0,020±0,00 a	0,006±0,00 b	0,019±0,00 a BC
Lacase	nd	nd	nd	nd	nd	0,000002± 0	nd	nd	nd	nd
Proteína (mg/mL)	0,033±0,01	0,039±0,00	0,024±0,01	0,041±0,00	0,032±0,00	0,047±0,00	0,077±0,01	0,196±0,02	0,178±0,01	0,297±0,03

Fonte: A Autora. Letras minúsculas distintas, entre os tempos, diferem ao nível de $p < 0,05$ pelo Teste t de Student e letras maiúsculas distintas, em toda linha, diferem ao nível de $p < 0,05$ pelo Teste de Tukey a 95% de confiança. nd = não determinado; ± desvio padrão.

5.2.7 LPF2471

A análise morfológica indicou que o isolado LPF2471 pertence ao gênero *Clonostachys* sp. (Figura 9). O gênero abrange espécies de ascomicetos encontrados como saprofitos e endofíticos, utilizados até mesmo como agentes de controle biológico contra doenças em plantas (GUASCHINO; JENSEN, 2023).

Figura 9 – Características morfológicas do isolado LPF2471. A – Cultura do fungo em meio de cultura BDA após 10 dias de crescimento, visão superior. B – Cultura do fungo em meio de cultura BDA após 10 dias de crescimento, visão inferior. C – Conidióforo aéreo após 7 dias em meio de cultura BDA por meio de microcultivo. D – Conidióforo após 7 dias em meio de cultura BDA por meio de microcultivo. E – Conídios após 7 dias em meio de cultura BDA por meio de microcultivo.



Fonte: A Autora.

As maiores atividades enzimáticas do isolado LPF2471 (Tabela 10) ocorreram principalmente após crescimento do fungo em farelo de trigo por 8 dias, com destaque para xilanase (2,742 U/mL), α -glicosidase (0,011 U/mL), β -glicosidase (0,094 U/mL), α -galactosidase (0,021 U/mL), β -galactosidase (0,008 U/mL), β -celobiohidrolase (0,059 U/mL) e α -arabinofuranosidase (0,053 U/mL). Ainda assim, os valores foram inferiores se comparados a outros fungos. Nas demais biomassas, tais enzimas foram pouco ou não detectadas, inclusive as lacases.

Tabela 10 – Atividades enzimáticas (U/mL) e concentração de proteínas (mg/mL) do extrato bruto do isolado LPF2471 crescido em eucalipto, pinus, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo.

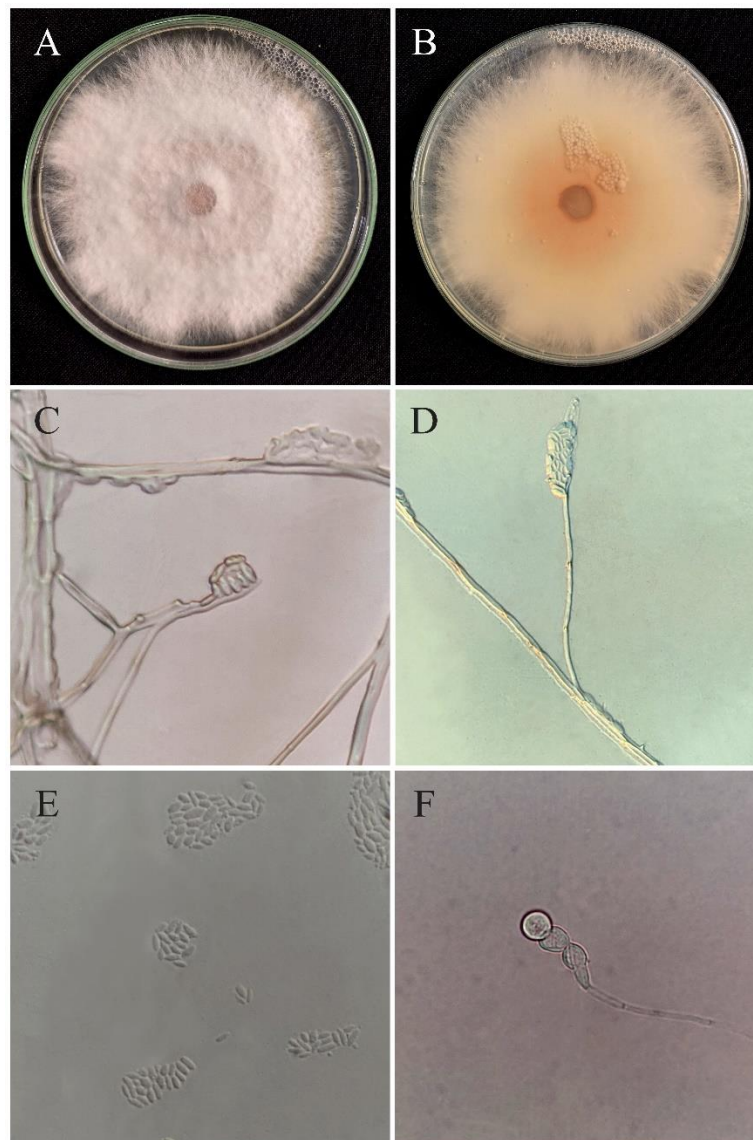
LPF 2471										
Atividades (U/mL)	Eucalipto		Pinus		Bagaço de cana		Sabugo de milho		Farelo de trigo	
	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias
FPase	0,791±0,08 a A	0,777±0,04 a	0,897±0,10 a A	0,650±0,06 b	0,844±0,06 a A	0,898±0,13 a	0,852±0,06 a A	0,938±0,09 a	0,728±0,04 b	0,986±0,11 a A
Endoglucanase	0,162±0,01 a C	0,189±0,02 a	0,198±0,01 b	0,238±0,02 a C	0,378±0,12 b	0,855±0,14 a A	0,452±0,03 a B	0,681±0,14 a	0,512±0,03 a B	0,267±0,01 b
Xilanase	0,545±0,06 a B	0,790±0,17 a	0,516±0,07 b	0,735±0,03 a B	0,565±0,14 a B	0,670±0,20 a	0,628±0,04 a B	0,692±0,20 a	2,011±0,03 b	2,742±0,03 a A
Mananase	0,065±0,00 b	0,084±0,01 a C	0,058±0,00 b	0,088±0,01 a C	0,463±0,13 a B	0,449±0,15 a	0,265±0,05 b	0,668±0,11 a A	0,306±0,03 a B	0,373±0,05 a
Pectinase	0,535±0,06 a C	0,702±0,07 a	2,644±0,02 b	4,147±0,12 a B	0,885±0,03 a C	0,483±0,05 b	0,937±0,14 a C	0,307±0,12 b	5,224±0,07 a A	0,448±0,01 b
α-Glicosidase	0,001±0,00 a B	0,001±0,00 a	nd	nd	nd	0,001±0,00 B	nd	0,001±0,00 B	nd	0,011±0,00 A
β-Glicosidase	0,003±0,00 b	0,005±0,00 a C	0,007±0,00 b	0,012±0,00 a B	0,004±0,00 a C	0,003±0,00 a	0,003±0,00 b	0,007±0,00 a C	0,031±0,00 b	0,094±0,00 a A
β-Xilosidase	nd	nd	nd	0,001±0,00 A	0,001±0,00 a A	0,002±0,00 a	0,001±0,00 a A	0,002±0,00 a	0,002±0,00 a A	0,005±0,00 a
α-Galactosidase	nd	nd	nd	0,001±0,00 B	0,004±0,00 a B	0,002±0,00 a	0,002±0,00 B	nd	0,003±0,00 b	0,021±0,00 a A
β-Galactosidase	0,002±0,00 B	nd	nd	nd	0,002±0,00 B	nd	0,002±0,00 B	nd	nd	0,008±0,00 A
β-Celobiohidrolase	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,059±0,09 A
α-Arabinofuranosidase	nd	0,006±0,00 c	0,010±0,00 b	0,027±0,00 a B	nd	nd	nd	nd	0,029±0,00 b	0,053±0,00 a A
Lacase	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Proteína (mg/mL)	0,033±0,00	0,028±0,00	0,025±0,00	0,027±0,00	0,034±0,00	0,037±0,00	0,035±0,00	0,092±0,01	0,063±0,00	0,319±0,02

Fonte: A Autora. Letras minúsculas distintas, entre os tempos, diferem ao nível de $p < 0,05$ pelo Teste t de Student e letras maiúsculas distintas, em toda linha, diferem ao nível de $p < 0,05$ pelo Teste de Tukey a 95% de confiança. nd = não determinado; ± desvio padrão.

5.2.8 LPF2472

O isolado LPF2472 apresentou estruturas típicas de *Fusarium* sp. (Figura 10), um ascomiceto que abrange espécies endofíticas e fitopatogênicas relacionadas à podridão de raízes e murcha de culturas agrícolas (COSTA *et al.*, 2016; CROUS *et al.*, 2021; MAHANTY; MISHRA; JOSHI, 2022; MIRSAM *et al.*, 2022; YANG *et al.*, 2022).

Figura 10 – Características morfológicas do isolado LPF2472. A – Cultura do fungo em meio de cultura BDA após 10 dias de crescimento, visão superior. B – Cultura do fungo em meio de cultura BDA após 10 dias de crescimento, visão inferior. C – Conidióforo aéreo após 7 dias em meio de cultura BDA por meio de microcultivo. D – Conidióforo após 7 dias em meio de cultura BDA por meio de microcultivo. E – Conídios após 7 dias em meio de cultura BDA por meio de microcultivo. F – Clamidósporo após 55 dias em meio de cultura BDA por meio de microcultivo.



Fonte: A Autora.

Para o isolado LPF2472 (Tabela 11), o farelo de trigo induziu maiores atividades de mananase (0,722 U/mL), β -glicosidase (0,170 U/mL), β -xilosidase (0,019 U/mL), α -galactosidase (0,062 U/mL) e β -celobiohidrolase (0,077 U/mL). O sabugo de milho foi o segundo melhor indutor, apresentando outras maiores atividades, como xilanase (4,584 U/mL) e α -glicosidase (0,004 U/mL), bem como concentração proteica similar ao farelo de trigo. Assim como o isolado LPF2471, o LPF2472 não expressou lacases e os valores das demais enzimas se mostraram menos pronunciados.

Triagem de espécies de *Fusarium* demonstraram produção de endoglucanases, xilanases, β -glicosidases e β -xilosidases em diferentes fontes de carbono e nitrogênio para sacarificação (BERTONHA *et al.*, 2018; DA ROSA-GARZON *et al.*, 2019). Assim como para o isolado do presente trabalho, o estudo de Koshila Ravi e colaboradores (2022) não detectou secreção de lacases pela espécie *Fusarium haematococcum*, o que pode estar relacionado ao estilo de vida de fungos infectantes de culturas menos recalcitrantes.

Tabela 11 – Atividades enzimáticas (U/mL) e concentração de proteínas (mg/mL) do extrato bruto do isolado LPF2472 crescido em eucalipto, pinus, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo.

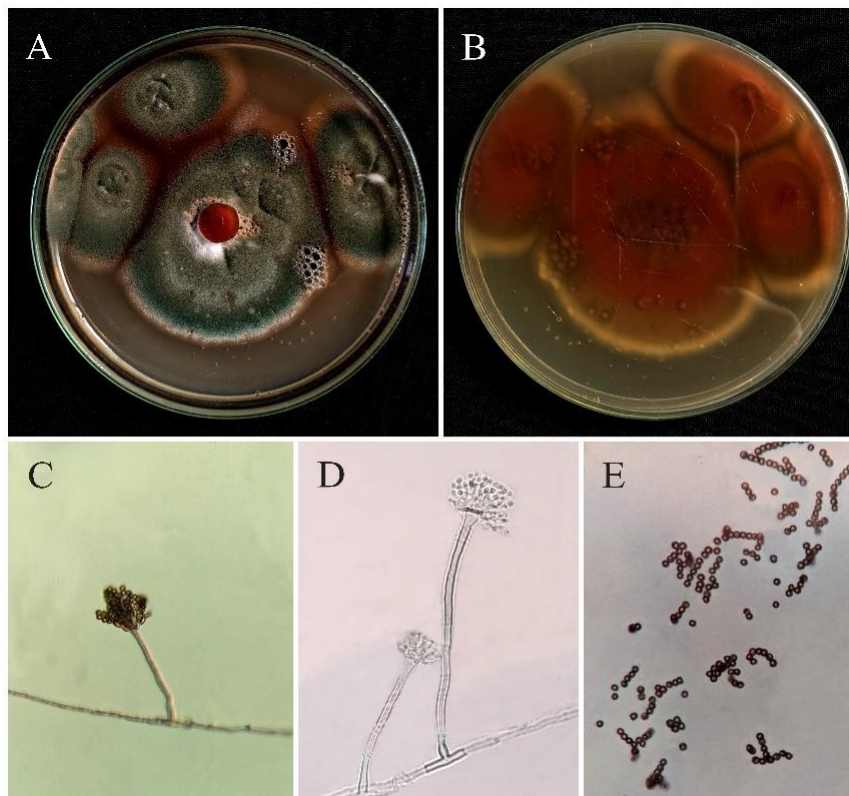
LPF 2472										
Atividades (U/mL)	Eucalipto		Pinus		Bagaço de cana		Sabugo de milho		Farelo de trigo	
	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias
FPase	1,039±0,09 a A	0,776±0,13 a	0,746±0,12 a A	1,006±0,14 a	1,030±0,13 a A	0,975±0,13 a	0,697±0,11 a A	0,700±0,15 a	0,706±0,02 a A	0,736±0,13 a
Endoglucanase	0,061±0,00 a C	0,044±0,00 b	0,053±0,00 a C	0,049±0,00 a	1,363±0,05 a A	0,455±0,08 b	0,198±0,01 b	0,412±0,02 a B	0,261±0,03 b	0,459±0,03 a B
Xilanase	0,304±0,01 b	0,411±0,03 a C	0,389±0,02 a C	0,354±0,05 a	0,582±0,12 a C	0,538±0,07 a	3,412±0,30 b	4,584±0,22 a A	1,776±0,21 a B	1,569±0,12 a
Mananase	0,384±0,04 a D	0,270±0,02 b	0,581±0,04 a BC	0,390±0,02 b	0,524±0,09 a B	0,255±0,06 b	0,087±0,02 b	0,259±0,11 a CD	0,722±0,09 a A	0,517±0,06 b
Pectinase	0,561±0,02 a A	0,422±0,06 a	0,659±0,02 a A	0,698±0,03 a	0,827±0,01 a A	0,534±0,08 b	0,498±0,04 a A	0,494±0,07 a	0,546±0,07 a AB	0,586±0,03 a
α-Glicosidase	0,002±0,00 a B	0,001±0,00 a	nd	nd	nd	nd	0,002±0,00 b	0,004±0,00 a A	0,002±0,00 a AB	0,002±0,00 a
β-Glicosidase	0,102±0,01 b	0,134±0,00 a B	0,042±0,00 b	0,063±0,01 a C	0,008±0,00 b	0,014±0,00 a E	0,030±0,00 a D	0,038±0,00 a	0,170±0,00 a A	0,191±0,00 a
β-Xilosidase	0,003±0,00 a C	0,003±0,00 a	0,001±0,00 a D	0,001±0,00 a	nd	nd	0,006±0,00 a B	0,009±0,00 a	0,019±0,00 a A	0,018±0,00 a
α-Galactosidase	0,002±0,00 b	0,003±0,00 a C	0,002±0,00 a C	0,002±0,00 a	0,005±0,00 B	nd	nd	0,002±0,00 C	0,062±0,00 a A	0,049±0,00 b
β-Galactosidase	0,001±0,00 a A	0,002±0,00 a	0,001±0,00 a A	0,002±0,00 a	0,002±0,00 a A	0,001±0,00 a	0,003±0,00 A	nd	0,003±0,00 a A	0,003±0,00 a
β-Celobiohidrolase	0,036±0,00 a B	0,024±0,00 b	0,006±0,00 a C	0,005±0,00 a	nd	nd	0,004±0,00 a C	0,004±0,00 a	0,004±0,00 b	0,077±0,01 a A
α-Arabinofuranosidase	nd	0,009±0,00 A	nd	0,001±0,00 A	nd	nd	nd	0,010±0,01 A	0,003±0,00 b	0,009±0,00 a A
Lacase	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Proteína (mg/mL)	0,030±0,00	0,031±0,00	0,010±0,00	0,016±0,00	0,034±0,00	0,037±0,00	0,142±0,01	0,293±0,02	0,180±0,01	0,244±0,01

Fonte: A Autora. Letras minúsculas distintas, entre os tempos, diferem ao nível de $p < 0,05$ pelo Teste t de Student e letras maiúsculas distintas, em toda linha, diferem ao nível de $p < 0,05$ pelo Teste de Tukey a 95% de confiança. nd = não determinado; ± desvio padrão.

5.2.9 LPF2473

O isolado LPF2473 foi identificado como *Aspergillus* sp. (Figura 11), o qual corresponde a um dos maiores gêneros de diversidade fúngica (HOUBRAKEN *et al.*, 2020). Em decorrência dessa diversidade, o estudo da relação da taxonomia filogenética e do perfil do secretoma de CAZymes de *Aspergillus* spp. vem sendo bastante explorado (BARRETT *et al.*, 2020).

Figura 11 – Características morfológicas do isolado LPF2473. A – Cultura do fungo em meio de cultura BDA após 17 dias de crescimento, visão superior. B – Cultura do fungo em meio de cultura BDA após 17 dias de crescimento, visão inferior. C – Conidióforo aéreo após 7 dias em meio de cultura BDA por meio de microcultivo. D – Conidióforo após 7 dias em meio de cultura BDA por meio de microcultivo. E – Conídios após 7 dias em meio de cultura BDA por meio de microcultivo.



Fonte: A Autora.

Para o isolado LPF2473, o farelo de trigo induziu maiores atividades para mananase (1,630 U/mL), α -glicosidase (0,004 U/mL), β -glicosidase (1,661 U/mL), α -galactosidase (1,050 U/mL), β -galactosidase (0,071 U/mL), β -celobiohidrolase (0,265 U/mL), acompanhado pelo maior teor proteico (0,449 mg/mL), após 8 dias de crescimento. Em paralelo, a mesma biomassa induziu maior atividade de endoglucanase (1,981 U/mL), α -arabinofuranosidase (0,023 U/mL) e expressiva xilanase (45,01 U/mL) após 5 dias. Em nenhuma fonte lignocelulósica foi

Tabela 12 – Atividades enzimáticas (U/mL) e concentração de proteínas (mg/mL) do extrato bruto do isolado LPF2473 crescido em eucalipto, pinus, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo.

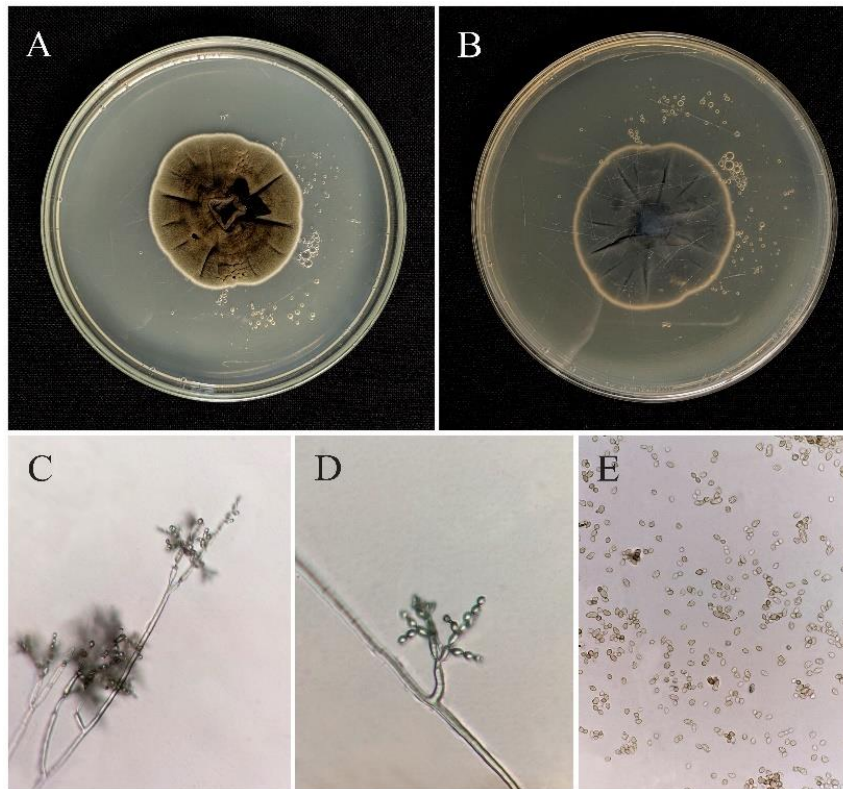
LPF 2473										
Atividades (U/mL)	Eucalipto		Pinus		Bagaço de cana		Sabugo de milho		Farelo de trigo	
	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias
FPase	0,617±0,09 a B	0,723±0,11 a	1,043±0,06 a A	0,704±0,11 b	1,131±0,16 a A	1,104±0,16 a	1,054±0,11 a A	1,001±0,09 a	1,038±0,10 a A	1,122±0,15 a
Endoglucanase	0,187±0,02 a D	0,205±0,02 a	0,199±0,01 b	0,223±0,01 a D	0,891±0,23 a C	0,685±0,07 a	1,197±0,08 a B	0,321±0,04 b	1,981±0,17 a A	0,396±0,05 b
Xilanase	4,029±0,13 a C	3,393±0,23 b	2,616±0,06 a D	1,800±0,18 b	0,792±0,21 a E	0,996±0,04 a	16,18±0,42 a B	10,11±0,35 b	45,01±0,92 a A	13,13±0,62 b
Mananase	0,052±0,01 a D	0,087±0,02 a	0,049±0,01 b	0,094±0,01 a D	0,876±0,16 a B	0,458±0,13 a	0,476±0,08 a C	0,587±0,15 a	0,803±0,29 b	1,630±0,04 a A
Pectinase	0,476±0,03 a B	0,222±0,08 b	0,629±0,02 a B	0,440±0,04 a	0,574±0,03 b	0,941±0,02 a A	0,605±0,01 a B	0,558±0,07 a	0,509±0,01 a B	0,270±0,01 b
α-Glicosidase	0,002±0,00 a C	0,001±0,00 a	nd	0,001±0,00 C	0,001±0,00 a C	0,001±0,00 a	0,003±0,00 a B	0,003±0,00 a	0,003±0,00 b	0,004±0,00 a A
β-Glicosidase	0,093±0,01 b	0,106±0,00 a C	0,061±0,00 b	0,106±0,00 a C	0,050±0,00 a C	0,055±0,00 a	0,486±0,01 b	0,781±0,02 a B	0,916±0,16 b	1,661±0,06 a A
β-Xilosidase	0,008±0,00 a C	0,009±0,00 a	0,005±0,00 a CD	0,005±0,00 a	0,003±0,00 D	nd	0,037±0,00 b	0,049±0,00 a A	0,033±0,00 a B	0,035±0,00 a
α-Galactosidase	0,006±0,00 a C	0,004±0,00 a	0,006±0,00 b	0,010±0,00 a C	0,004±0,00 a C	0,003±0,00 a	0,219±0,00 b	0,337±0,01 a B	0,424±0,01 b	1,050±0,04 a A
β-Galactosidase	0,003±0,00 a C	0,003±0,00 a	0,002±0,00 a C	0,002±0,00 a	0,001±0,00 a C	0,001±0,00 a	0,015±0,00 a B	0,008±0,00 b	0,028±0,00 b	0,071±0,00 a A
β-Celobiohidrolase	0,013±0,00 b	0,025±0,00 a B	0,005±0,00 b	0,043±0,01 a B	nd	0,002±0,00 B	0,011±0,01 a B	0,032±0,03 a	0,068±0,02 b	0,265±0,11 a A
α-Arabinofuranosidase	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,023±0,00 a	0,014±0,00 a
Lacase	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Proteína (mg/mL)	0,035±0,00	0,036±0,00	0,026±0,00	0,030±0,00	0,048±0,00	0,051±0,00	0,186±0,01	0,249±0,02	0,288±0,01	0,449±0,03

Fonte: A Autora. Letras minúsculas distintas, entre os tempos, diferem ao nível de $p < 0,05$ pelo Teste t de Student e letras maiúsculas distintas, em toda linha, diferem ao nível de $p < 0,05$ pelo Teste de Tukey a 95% de confiança. nd = não determinado; ± desvio padrão.

5.2.10 J2-01

Para o isolado J2-01, sugere-se tratar de *Cladosporium* sp. (Figura 12), um gênero comumente encontrado em ambientes, com interações endofíticas e fitopatogênicas já relatadas, como invasor de tecidos de plantas (BENSCH *et al.*, 2010; SOLAIRAJ *et al.*, 2022). Poucos estudos relatam a produção de celulases e pectinases para espécies deste gênero a partir de resíduos agrícolas (BASTOS *et al.*, 2010; VÁZQUEZ-MONTOYA *et al.*, 2020).

Figura 12 – Características morfológicas do isolado J2-01. A – Cultura do fungo em meio de cultura BDA após 17 dias de crescimento, visão superior. B – Cultura do fungo em meio de cultura BDA após 17 dias de crescimento, visão inferior. C – Conidióforo aéreo após 7 dias em meio de cultura BDA por meio de microcultivo. D – Conidióforo após 7 dias em meio de cultura BDA por meio de microcultivo. E – Conídios após 7 dias em meio de cultura BDA por meio de microcultivo.



Fonte: A Autora.

As maiores atividades do isolado J2-01 foram observadas principalmente após 8 dias de crescimento em farelo de trigo: β -glicosidase (1,612 U/mL), β -xilosidase (0,072 U/mL), α -galactosidase (0,756 U/mL), β -galactosidase (0,047 U/mL), β -celobiohidrolase (0,281 U/mL), α -arabinofuranosidase (0,014 U/mL), acompanhado pelo maior teor proteico (0,411 mg/mL). Lacases foram identificadas apenas após crescimento do fungo nas fontes sabugo de milho

(1,0.10⁻⁶ U/mL) e farelo de trigo (8,0.10⁻⁶ U/mL), após 8 dias, mas de ordem pouco considerável (Tabela 13).

Tabela 13 – Atividades enzimáticas (U/mL) e concentração de proteínas (mg/mL) do extrato bruto do isolado J2-01 crescido em eucalipto, pinus, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo.

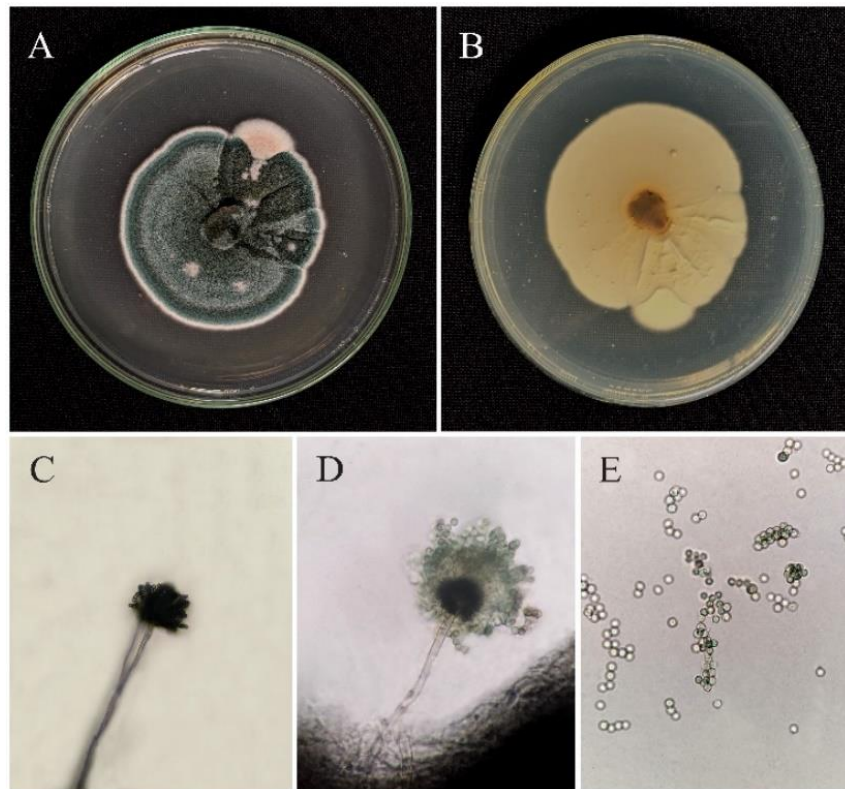
J2-01										
Atividades (U/mL)	Eucalipto		Pinus		Bagaço de cana		Sabugo de milho		Farelo de trigo	
	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias
FPase	0,731±0,04 a A	0,750±0,11 a	0,633±0,09 a A	0,720±0,04 a	0,863±0,06 a A	0,749±0,15 a	0,657±0,15 a A	0,641±0,07 a	0,848±0,05 a A	0,672±0,15 a
Endoglucanase	0,145±0,01 b	0,166±0,01 a C	0,105±0,00 b	0,130±0,01 a C	0,955±0,18 a AB	0,733±0,26 a	0,247±0,02 a BC	0,270±0,02 a	1,262±0,13 a A	1,519±0,06 a
Xilanase	1,422±0,11 b	2,053±0,05 a C	0,529±0,03 b	1,204±0,05 a C	0,938±0,25 a C	1,120±0,17 a	9,423±0,45 b	14,23±0,98 a B	13,75±1,11 b	16,55±0,81 a A
Mananase	0,125±0,02 a C	0,113±0,01 a	0,130±0,01 b	0,217±0,02 a C	1,496±0,20 a A	0,539±0,16 b	0,847±0,21 a B	1,046±0,22 a	1,297±0,23 a A	1,421±0,11 a
Pectinase	0,248±0,09 a A	0,572±0,19 a	0,273±0,09 a A	0,437±0,09 a	0,399±0,11 a A	0,600±0,13 a	0,256±0,08 b	0,613±0,15 a A	0,461±0,19 a A	1,084±0,24 a
α-Glicosidase	0,001±0,00 a A	0,002±0,00 a	nd	nd	nd	nd	0,002±0,00 a A	0,002±0,00 a	nd	0,003±0,00 A
β-Glicosidase	0,035±0,00 b	0,093±0,00 a C	0,014±0,00 b	0,093±0,01 a C	0,006±0,00 b	0,064±0,01 a C	0,131±0,00 b	0,453±0,02 a B	0,229±0,02 b	1,612±0,18 a A
β-Xilosidase	0,003±0,00 b	0,009±0,00 a C	0,003±0,00 a C	0,003±0,00 a	nd	0,003±0,00 C	0,009±0,00 b	0,031±0,00 a B	0,021±0,00 b	0,072±0,00 a A
α-Galactosidase	0,009±0,00 b	0,021±0,00 a C	0,001±0,00 b	0,017±0,00 a C	0,002±0,00 b	0,009±0,00 a C	0,012±0,00 b	0,109±0,00 a B	0,105±0,02 b	0,756±0,02 a A
β-Galactosidase	0,002±0,00 b	0,003±0,00 a B	0,002±0,00 b	0,003±0,00 a B	0,002±0,00 a B	0,002±0,00 a	0,006±0,00 b	0,010±0,00 a B	0,012±0,00 b	0,047±0,01 a A
β-Celobiohidrolase	0,002±0,00 b	0,027±0,00 a B	nd	0,012±0,00 BC	nd	0,002±0,00 C	0,023±0,00 a B	0,010±0,00 a	0,016±0,00 b	0,281±0,01 a A
α-Arabinofuranosidase	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,014±0,09
Lacase	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,000001±0 B	nd	0,000008±0 A
Proteína (mg/mL)	0,042±0,01	0,002±0,00	0,012±0,01	0,016±0,01	0,014±0,01	0,024±0,00	0,054±0,02	0,136±0,02	0,193±0,01	0,411±0,05

Fonte: A Autora. Letras minúsculas distintas, entre os tempos, diferem ao nível de p<0,05 pelo Teste t de Student e letras maiúsculas distintas, em toda linha, diferem ao nível de p<0,05 pelo Teste de Tukey a 95% de confiança. nd = não determinado; ± desvio padrão.

5.2.11 J2-02

O aspecto morfológico do isolado J2-02 revelou conidióforos referentes a *Aspergillus* spp. (Figura 13). A secreção de enzimas envolvidas na degradação dos polissacarídeos da parede vegetal por *Aspergillus* spp. é amplamente relatada, principalmente para celulases como endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases (DE VRIES; VISSER, 2001).

Figura 13 – Características morfológicas do isolado J2-02. A – Cultura do fungo em meio de cultura BDA após 17 dias de crescimento, visão superior. B – Cultura do fungo em meio de cultura BDA após 17 dias de crescimento, visão inferior. C – Conidióforo aéreo após 7 dias em meio de cultura BDA por meio de microcultivo. D – Conidióforo após 7 dias em meio de cultura BDA por meio de microcultivo. E – Conídios após 7 dias em meio de cultura BDA por meio de microcultivo.



Fonte: A Autora.

Grande parte das enzimas do isolado J2-02 apresentaram maiores atividades após crescimento do fungo em farelo de trigo por 5 dias, incluindo endoglucanase (1,532 U/mL), xilanase (20,48 U/mL), mananase (1,406 U/mL), pectinase (1,702 U/mL), β -xilosidase (0,051 U/mL), β -galactosidase (0,041 U/mL) e α -arabinofuranosidase (0,027 U/mL). Lacases foram detectadas apenas para as fontes de carbono sabugo de milho ($9,0 \cdot 10^{-6}$ U/mL) e farelo de trigo ($1,0 \cdot 10^{-4}$ U/mL), após 8 dias de crescimento do isolado J2-02, sendo este último mais considerável (Tabela 14).

Tabela 14 – Atividades enzimáticas (U/mL) e concentração de proteínas (mg/mL) do extrato bruto do isolado J2-02 crescido em eucalipto, pinus, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo.

J2-02										
Atividades (U/mL)	Eucalipto		Pinus		Bagaço de cana		Sabugo de milho		Farelo de trigo	
	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias	5 dias	8 dias
FPase	0,848±0,09 a A	0,749±0,08 a	0,780±0,06 a A	0,814±0,15 a	0,962±0,14 a A	0,879±0,08 a	0,771±0,04 a A	0,753±0,11 a	0,983±0,07 a A	1,022±0,06 a
Endoglucanase	0,128±0,02 a C	0,170±0,02 a	0,166±0,02 a C	0,175±0,01 a	1,092±0,09 a B	0,862±0,16 a	0,134±0,00 a C	0,217±0,02 a	1,532±0,28 a A	1,496±0,11 a
Xilanase	1,512±0,01 b	3,988±0,21 a C	1,035±0,04 b	1,921±0,08 a CD	1,012±0,31 a D	0,861±0,15 a	4,888±0,35 b	14,05±0,94 a B	20,48±1,32 a A	6,698±0,55 b
Mananase	0,075±0,01 b	0,140±0,01 a C	0,141±0,01 a C	0,199±0,02 a	1,085±0,18 a B	1,039±0,16 a	0,665±0,03 b	1,169±0,09 a AB	1,406±0,13 a A	0,930±0,05 b
Pectinase	0,593±0,05 a B	0,520±0,09 a	0,606±0,11 a B	0,590±0,01 a	0,645±0,01 a B	0,646±0,07 a	0,879±0,03 a AB	0,591±0,05 b	1,072±0,08 a A	0,702±0,14 a
α-Glicosidase	0,001±0,00 a A	0,001±0,00 a	0,001±0,00 a A	0,001±0,00 a	nd	nd	0,001±0,00 a A	0,002±0,00 a	nd	0,002±0,00 A
β-Glicosidase	0,049±0,00 b	0,149±0,01 a C	0,041±0,00 b	0,106±0,01 a C	0,011±0,00 b	0,046±0,00 a C	0,107±0,00 b	0,584±0,10 a B	0,671±0,02 b	1,269±0,13 a A
β-Xilosidase	0,004±0,00 b	0,011±0,00 a C	nd	0,010±0,00 CD	nd	0,002±0,00 D	0,006±0,00 b	0,028±0,00 a B	0,051±0,00 a A	0,049±0,00 a
α-Galactosidase	0,011±0,00 b	0,045±0,00 a B	0,012±0,00 b	0,017±0,00 a C	0,002±0,00 b	0,012±0,00 a C	nd	0,016±0,00 C	0,068±0,00 b	0,098±0,00 a A
β-Galactosidase	0,003±0,00 b	0,004±0,00 a C	0,004±0,00 a C	0,002±0,00 b	nd	0,002±0,00 C	nd	0,015±0,00 B	0,041±0,00 a A	0,042±0,00 a
β-Celobiohidrolase	0,006±0,00 b	0,058±0,01 a B	0,011±0,00 b	0,027±0,00 a C	nd	0,002±0,00 D	0,008±0,00 a D	0,002±0,00 a	0,041±0,01 b	0,156±0,00 a A
α-Arabinofuranosidase	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,027±0,00 a	0,003±0,01 a
Lacase	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,000009±0 B	nd	0,0001±0,0 A
Proteína (mg/mL)	0,028±0,01	0,038±0,01	0,020±0,00	0,044±0,00	0,025±0,00	0,048±0,00	0,064±0,00	0,225±0,01	0,236±0,01	0,389±0,02

Fonte: A Autora. Letras minúsculas distintas, entre os tempos, diferem ao nível de $p < 0,05$ pelo Teste t de Student e letras maiúsculas distintas, em toda linha, diferem ao nível de $p < 0,05$ pelo Teste de Tukey a 95% de confiança. nd = não determinado; ± desvio padrão.

5.2.12 Seleção das atividades enzimáticas fúngicas

A partir do estudo enzimático preliminar de cada microrganismo, as atividades mais promissoras em suas respectivas biomassas e tempo de crescimento foram estabelecidas (Tabela 15). Para comparação entre os isolados em termos enzimáticos, foi realizada a análise de variância (ANOVA) com Teste de Tukey a 95 % de confiança.

De modo geral, o extrato do fungo *Chrysosporthe cubensis* cultivado em farelo de trigo por 8 dias se destacou para a maioria das enzimas, contemplando FPase, endoglucanase, lacase, α e β -glicosidase, β -celobiohidrolase e α -arabinofuranosidase. Trabalhos anteriores do grupo de pesquisa evidenciaram que o *C. cubensis* se mostrou com grande capacidade de produção de celulases e hemicelulases para sacarificação de biomassa lignocelulósica, além de enzimas acessórias (DUTRA *et al.*, 2017; FALKOSKI *et al.*, 2013; MAITAN-ALFENAS *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2021; VISSER *et al.*, 2013).

O crescimento do fungo LPF2180 em pinus por 8 dias induziu os maiores valores para pectinase, β -xilosidase e β -galactosidase. O isolado LPF2473, por sua vez, demonstrou atividades interessantes após crescimento em farelo de trigo por 8 dias para as enzimas β -glicosidase e α -galactosidase e, principalmente, para xilanase após 5 dias de cultivo, cujo valor se mostrou bastante expressivo. Dessa forma, os fungos selecionados para aplicação dos extratos enzimáticos nos cavacos foram *C. cubensis*, LPF2180 e LPF2473.

Tabela 15 – Maiores atividades enzimáticas (U/mL) com as respectivas biomassas e tempo de crescimento dos isolados fúngicos.

Atividades enzimáticas (U/mL)											
	<i>C. cubensis</i>	<i>K. zonata</i>	<i>B. pondoensis</i>	<i>C. austromontana</i>	LPF 2177	LPF 2180	LPF 2471	LPF 2472	LPF 2473	J2-01	J2-02
FPase	1,246 ±0,19 (FT8) A	1,145 ±0,11 (BC8) AB	0,927 ±0,12 (SM5) AB	1,213 ±0,14 (FT8) AB	0,896 ±0,12 (BC5) AB	1,121 ±0,16 (BC5) AB	0,986 ±0,11 (FT8) AB	1,039 ±0,09 (EUC5) AB	1,131 ±0,16 (BC5) AB	0,863 ±0,06 (BC5) B	0,983 ±0,07 (FT5) AB
Endoglucanase	2,779 ±0,14 (FT8) A	1,907 ±0,31 (FT5) AB	1,174 ±0,17 (SM8) BCD	0,776 ±0,03 (FT5) D	1,216 ±0,12 (FT5) BCD	1,115 ±0,16 (SM5) CD	0,855 ±0,14 (BC8) D	1,363 ±0,05 (BC5) BCD	1,981 ±0,17 (FT5) ABC	1,262 ±0,13 (FT5) BCD	1,532 ±0,28 (FT5) BCD
Xilanase	24,64 ±0,54 (FT8) B	4,152 ±0,59 (EUC8) F	13,77 ±0,56 (EUC8) DE	20,01 ±0,73 (FT5) C	23,43 ±0,91 (SM8) B	10,63 ±0,15 (SM8) E	2,742 ±0,03 (FT8) F	4,584 ±0,22 (SM8) F	45,01 ±0,92 (FT5) A	16,55 ±0,81 (FT8) D	20,48 ±1,32 (FT5) C
Mananase	1,493 ±0,09 (FT8) BC	0,741 ±0,08 (BC5) D	1,246 ±0,03 (FT8) C	0,974 ±0,05 (FT5) D	3,133 ±0,11 (SM8) A	1,503 ±0,15 (PIN8) BC	0,668 ±0,11 (SM8) D	0,722 ±0,09 (FT5) D	1,630 ±0,04 (FT8) B	1,496 ±0,20 (BC5) BC	1,406 ±0,13 (FT5) BC
Pectinase	2,882 ±0,37 (FT5) D	1,119 ±0,14 (FT5) DE	0,893 ±0,08 (FT5) E	0,913 ±0,10 (PIN5) E	12,56 ±0,56 (PIN8) B	17,09 ±0,52 (PIN8) A	5,224 ±0,07 (FT5) C	0,827 ±0,01 (BC5) DE	0,941 ±0,02 (BC8) E	0,613 ±0,15 (SM8) E	1,072 ±0,08 (FT5) DE
α-Glicosidase	0,052 ±0,00 (FT8) A	0,007 ±0,00 (FT8) DE	0,016 ±0,00 (FT8) B	nd	0,012 ±0,00 (FT8) C	0,004 ±0,00 (EUC8) F	0,011 ±0,00 (FT8) CD	0,004 ±0,00 (SM8) EF	0,004 ±0,00 (FT8) EF	0,003 ±0,00 (FT8) F	0,002 ±0,00 (FT8) F
β-Glicosidase	1,547 ±0,15 (FT8) A	0,299 ±0,02 (FT8) DE	0,410 ±0,03 (FT8) D	0,067 ±0,01 (EUC5) E	0,963 ±0,02 (SM8) C	0,941 ±0,04 (SM8) C	0,094 ±0,00 (FT8) DE	0,170 ±0,00 (FT5) DE	1,661 ±0,06 (FT8) A	1,612 ±0,18 (FT8) A	1,269 ±0,13 (FT8) B
β-Xilosidase	0,059 ±0,00 (FT8) C	0,014 ±0,00 (FT8) G	0,044 ±0,00 (FT8) DE	0,022 ±0,00 (EUC8) F	0,041 ±0,00 (FT8) E	0,114 ±0,00 (PIN8) A	0,002 ±0,00 (FT5) H	0,019 ±0,00 (FT5) FG	0,049 ±0,00 (SM8) CDE	0,072 ±0,00 (FT8) B	0,051 ±0,00 (FT5) CD
α-Galactosidase	0,370 ±0,01 (FT8) CD	0,386 ±0,01 (FT8) C	0,343 ±0,00 (FT8) CD	0,043 ±0,00 (EUC8) F	0,225 ±0,00 (FT8) E	0,304 ±0,04 (PIN8) DE	0,021 ±0,00 (FT8) F	0,062 ±0,00 (FT5) F	1,050 ±0,04 (FT8) A	0,756 ±0,02 (FT8) B	0,098 ±0,00 (FT8) F
β-Galactosidase	0,044 ±0,00 (FT8) CDE	0,032 ±0,00 (FT8) CDE	0,062 ±0,00 (FT8) BC	0,062 ±0,00 (FT5) BC	0,097 ±0,00 (SM8) B	0,513 ±0,02 (PIN8) A	0,008 ±0,00 (FT8) E	0,003 ±0,00 (FT5) DE	0,071 ±0,00 (FT8) BC	0,047 ±0,01 (FT8) CD	0,041 ±0,00 (FT5) CDE
β-Celobiohidrolase	0,846 ±0,04 (FT8) A	0,043 ±0,01 (FT8) C	0,090 ±0,01 (SM8) C	0,048 ±0,01 (PIN5) C	0,069 ±0,01 (SM8) C	0,054 ±0,01 (PIN8) C	0,059 ±0,09 (FT8) C	0,077 ±0,01 (FT8) C	0,265 ±0,11 (FT8) B	0,281 ±0,01 (FT8) B	0,156 ±0,00 (FT8) BC
α-Arabinofuranosidase	0,618 ±0,01 (FT8) A	0,179 ±0,00 (FT8) B	0,169 ±0,00 (FT8) B	0,182 ±0,01 (FT5) B	0,180 ±0,01 (FT8) B	0,078 ±0,01 (EUC8) C	0,053 ±0,00 (FT8) D	0,010 ±0,01 (SM8) E	0,023 ±0,00 (FT5) E	0,014 ±0,09 (FT8) E	0,027 ±0,00 (FT5) E
Lacase	0,0003 ±0,00 (FT8) A	0,0001 ±0,0 (FT8) D	0,000003 ±0,0 (FT8) F	0,0002 ±0,00 (FT5) B	0,00004 ±0,0 (SM5) E	0,000002 ±0,0 (BC8) F	nd	nd	nd	0,000008 ±0,0 (FT8) F	0,0001 ±0,0 (FT8) C

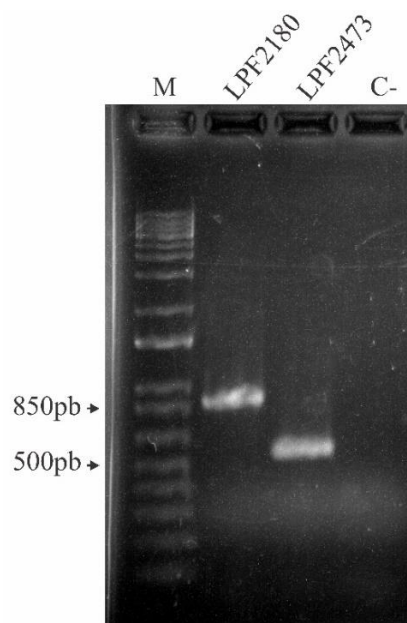
Fonte: A Autora. As biomassas e tempo de cultivo são indicados entre parênteses: EUC – eucalipto; PIN – pinus; BC – bagaço de cana; SM – sabugo de milho; FT – farelo de trigo. Letras maiúsculas distintas, na mesma linha, diferem ao nível de $p < 0,05$ pelo Teste de Tukey a 95% de confiança. As maiores atividades para cada enzima são destacadas em cinza.

nd = não determinado; ± desvio padrão.

5.3 Identificação molecular dos isolados LPF2180 e LPF2473

Os DNAs extraídos dos isolados LPF2180 e LPF2473 apresentaram boa qualidade e foram amplificados por PCR em suas regiões intergênicas (ITS) por meio dos primers ITS1 e ITS4. Os produtos de PCR foram confirmados, mostrando um fragmento de peso molecular próximo à 850 pb para o isolado LPF2180 e próximo a 500 pb para o isolado LPF2473 (Figura 14).

Figura 14 – Produto de amplificação por PCR da região ITS em eletroforese de agarose 1,5 % dos isolados LPF2180 e LPF2473. M – Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; C- – Controle negativo da PCR.



Fonte: A Autora.

As sequências obtidas das duas fitas de DNA foram analisadas para formar uma sequência consenso, para cada isolado. Em seguida, essas sequências foram submetidas ao banco de dados do NCBI (GenBank) para identificação. O isolado LPF2180 foi confirmado como sendo *Hypoxylon* sp., com 100 % de identidade à sequência de referência (GenBank: EU678667.1). A sequência parcial do gene ITS não foi capaz de identificar o isolado a nível de espécie, sendo necessário o sequenciamento de outras regiões gênicas para resolução. A sequência do isolado LPF2473 apresentou 100 % de identidade com sequências de *Aspergillus sydowii* (GenBank: KX898426.1; LN898721.1). Após a identificação, as sequências de ambos os isolados foram depositadas no GenBank (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com os códigos de acesso OQ001480 para *Hypoxylon* sp. e OP837535 para *Aspergillus sydowii*.

Espécies de *Hypoxylon* são ascomicetos que já foram relatados como endofíticos, mas principalmente como apodrecedores, comumente encontrados em madeira em decomposição (SONG *et al.*, 2022; ZHOU *et al.*, 2019). A análise genômica de isolados de *Hypoxylon* sp. demonstrou um rico reservatório para produção de enzimas ativas em carboidratos (CAZymes) (WU *et al.*, 2017), sendo necessário mais estudos para o gênero quanto ao potencial dessas enzimas.

Os resultados encontrados no presente trabalho demonstram que *Hypoxylon* sp. foi capaz de produzir as maiores atividades de duas hemicelulases (β -xilosidase e α -galactosidase) e pectinase. Isso foi verificado por meio do crescimento em madeira de pinus, um substrato rico em celulose e hemicelulose com fonte de nitrogênio escassa. Tais resultados sugerem que *Hypoxylon* sp. é um fungo com potencial para produção de enzimas acessórias, que durante a degradação da hemicelulose, facilitam o acesso das celulasas à celulose e promovem melhores rendimentos de hidrólise (YANG *et al.*, 2018).

Quanto à provável taxonomia atribuída ao isolado LPF2473, o gênero *Aspergillus* representa uma gama de ascomicetos industrialmente importantes, tanto para a produção de metabólitos quanto para a secreção de enzimas que hidrolisam resíduos lignocelulósicos (FERREIRA *et al.*, 2016; HAGAG *et al.*, 2022). Embora pouco explorado em comparação com outras espécies do mesmo gênero, *A. sydowii* é relatado como um fungo endofítico encontrado em ambientes terrestres e marinho, devido à sua tolerância em meio salino (HALLEGRAEFF *et al.*, 2014). Além disso, tem sido relatado como um possível patógeno de ecossistemas marinhos (BRANDT *et al.*, 2020).

Aspergillus sydowii tem demonstrado capacidade celulolítica para produção de enzimas de valor agregado através de análises genômicas (BRANDT *et al.*, 2020; DE VRIES *et al.*, 2017; TULSANI *et al.*, 2022). Um estudo recente analisou o perfil CAZyme de uma cepa do fungo, revelando 543 CAZymes, com vantagem celulolítica e pectinolítica comparada às CAZymes de fungos de podridão. Além disso, as enzimas do extrato bruto do fungo liberaram 50,85 % de açúcares redutores na sacarificação em palha de trigo pré-tratada, mostrando potencial para aplicações biotecnológicas (TULSANI *et al.*, 2022).

Outros estudos mostram a utilização do fungo *A. sydowii* para produção de tanase (tanino-acil-hidrolase) a partir de resíduo de coco (ALBUQUERQUE *et al.*, 2020); endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase, utilizando a lactose como fonte de carbono (MATKAR *et al.*, 2013); e xilanase para branqueamento de celulose kraft induzida por farelo de trigo (NAIR; SINDHU; SHASHIDHAR, 2010). Esse último trabalho, por sua vez, quantificou 87,12 U/mL de atividade de xilanase bruta inicial, o que reforça o potencial

xilanolítico do fungo se comparado aos resultados do presente trabalho, cuja atividade encontrada na mesma fonte de carbono foi de 45,01 U/mL, superando os valores dos demais isolados. Uma recente expressão heteróloga de duas xilanases de uma cepa desta espécie fortalece ainda mais esse potencial (BRANDT *et al.*, 2020). Além disso, as atividades de endoglucanase e β -glicosidase encontradas no presente trabalho reforçam também a capacidade celulolítica do fungo.

5.4 Hidrólise enzimática *in vitro* dos cavacos de madeira

Como o extrato bruto enzimático produzido pelo fungo *C. cubensis* se destacou para a maior parte das enzimas, inicialmente avaliou-se a utilização de seu respectivo extrato como coquetel enzimático na hidrólise dos cavacos de madeira, testando-se cargas enzimáticas de 10 e 20 FPU/g de biomassa. Considerando as atividades enzimáticas expressas por *Hypoxylon* sp. (LPF2180) e *A. sydowii* (LPF2473) como complementares às atividades de *C. cubensis*, avaliou-se, posteriormente, o coquetel combinado de 10 FPU/g de extrato de *C. cubensis* adicionado de 5 FPU/g do extrato de *Hypoxylon* sp. e 5 FPU/g do extrato de *A. sydowii*, totalizando uma carga enzimática final de 20 FPU/g.

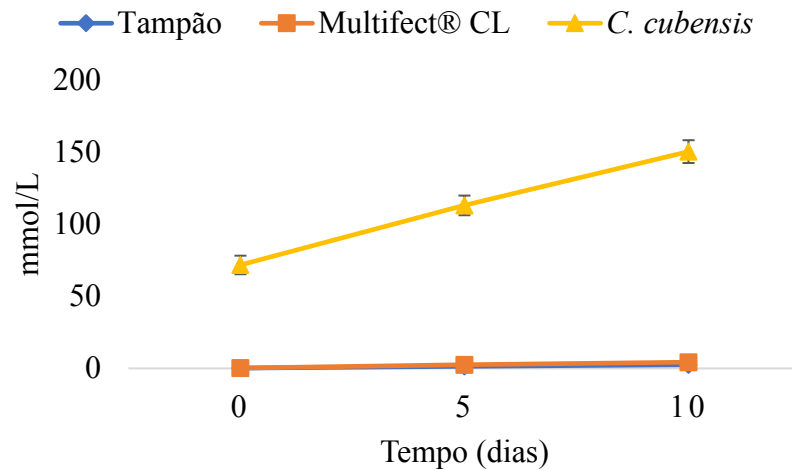
Além da utilização do tampão como controle negativo da reação, foi realizado o controle negativo dos extratos enzimáticos com as enzimas desnaturadas, após fervura das mesmas por 10 minutos. Dessa forma, a ação das enzimas dos extratos foi estabelecida a partir do decréscimo de variações secundárias do extrato contendo as enzimas desnaturadas. O coquetel comercial celulolítico Multifect® CL seguiu as mesmas proporções enzimáticas. Aliquotas dos tratamentos foram avaliadas em 0, 5 e 10 dias, bem como a atividade de FPase do extrato de *C. cubensis*, que se mostrou constante ao longo de 10 dias.

5.4.1 Determinação de açúcares redutores totais

A liberação de açúcares redutores obtida pelo experimento de hidrólise que utilizou carga enzimática inicial de 10 FPU/g, durante 10 dias, é mostrada na Figura 15. O efeito do tampão sem enzimas foi pouco considerável durante todo tempo, sendo o valor máximo obtido de 2,50 mmol/L em 10 dias. O coquetel enzimático comercial Multifect® CL demonstrou liberação de 4,31 mmol/L após 10 dias.

O extrato enzimático de *C. cubensis* apresentou concentração inicial de açúcares redutores de 71,70 mmol/L e subsequente aumento exclusivo pelas enzimas no tempo de 5 dias para 112,96 mmol/L, sendo que, em 10 dias, a concentração foi de 150,27 mmol/L.

Figura 15 – Concentração de açúcares redutores totais após hidrólise enzimática de cavacos de madeira utilizando o extrato enzimático de *C. cubensis*, o coquetel comercial Multifect® CL, todos na concentração de 10 FPU/g de cavaco, e o tampão.



Fonte: A Autora.

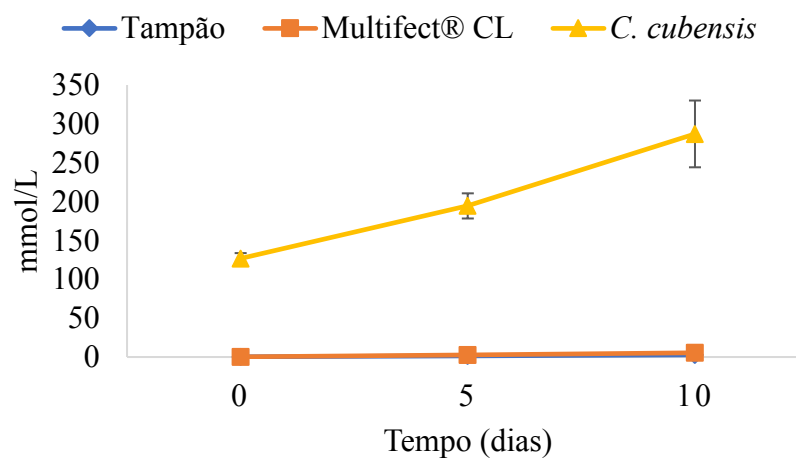
Dessa forma, considerando a concentração inicial do extrato, o saldo de açúcares redutores liberados exclusivamente pelas enzimas de *C. cubensis* testadas na concentração de 10 FPU/g foi de 41,27 mmol/L em 5 dias e 78,57 mmol/L após 10 dias de hidrólise.

A concentração superior de açúcares redutores liberados com relação ao Multifect® CL pode estar relacionada à maior especificidade das enzimas secretadas por *C. cubensis*, em decorrência do seu estilo de vida como causador de doenças em madeira, inclusive pela produção de lacases. Além dessa direcionalidade para atacar substratos lenhosos, um estudo anterior do grupo de pesquisa mostrou que as atividades específicas de algumas celulases e hemicelulases do extrato concentrado de *C. cubensis* eram superiores às atividades do Multifect® CL (MAITAN-ALFENAS *et al.*, 2015). As diferenças de açúcares redutores liberados entre os tratamentos no presente trabalho reforçam o potencial enzimático do extrato de *C. cubensis* quanto à sua utilização como coquetel.

O mesmo ensaio de hidrólise de cavacos de madeira utilizando carga enzimática de 20 FPU/g de cavaco é mostrado na Figura 16. O tampão apresentou a mesma concentração irrelevante em termos de açúcares redutores. O coquetel enzimático Multifect® CL apresentou liberação similar de açúcares redutores quando comparado ao experimento que utilizou 10 FPU/g de enzima, por 10 dias, com relação ao tampão, 5,47 mmol/L. A pouca variação na liberação de açúcares utilizando o dobro de celulases do coquetel comercial pode estar relacionada à sua maior dispersão no meio reacional, já que o coquetel enzimático comercial é extremamente concentrado e o seu volume utilizado na reação é bastante reduzido.

O maior volume de extrato de *C. cubensis* propiciou maior concentração inicial de açúcares redutores, 126,79 mmol/L, acompanhado de aumento no tempo de 5 dias para 194,45 mmol/L e, em 10 dias para 287,08 mmol/L. Dessa forma, o extrato enzimático de *C. cubensis*, quando aplicado na hidrólise dos cavacos de madeira numa concentração de 20 FPU/g promoveu liberação líquida de 67,67 mmol/L de açúcares redutores em 5 dias e 160,29 mmol/L após 10 dias.

Figura 16 – Concentração de açúcares redutores totais após hidrólise enzimática de cavacos de madeira utilizando o extrato enzimático de *C. cubensis*, o coquetel comercial Multifect® CL, todos na concentração de 20 FPU/g de cavaco, e o tampão.

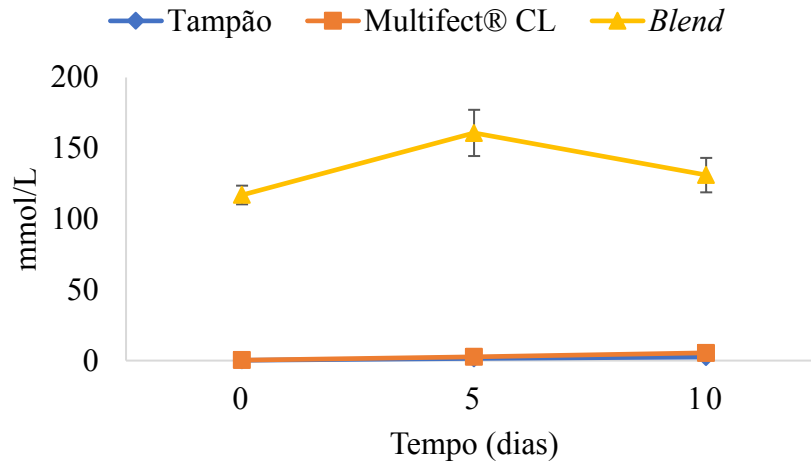


Fonte: A Autora.

Considerando a ação do coquetel enzimático de *C. cubensis* para as duas cargas enzimáticas testadas, constatou-se que a liberação de açúcares redutores totais pela concentração de 20 FPU/g de cavaco liberou cerca de 26,40 mmol/L a mais do que o extrato na concentração de 10 FPU/g após 5 dias e 81,72 mmol/L a mais após 10 dias.

Para avaliação da mistura enzimática (*blend*) dos coquetéis de *C. cubensis*, *Hypoxyylon* sp. e *A. sydowii* (10:5:5 FPU/g de cavaco), a quantificação de açúcares redutores totais também foi realizada (Figura 17). O tampão e o coquetel enzimático Multifect® CL apresentaram o mesmo padrão de açúcares redutores dos ensaios anteriores. O *blend*, por sua vez, apresentou concentração inicial de 116,98 mmol/L, aumentando a liberação para 160,84 mmol/L em 5 dias e 131,02 mmol/L em 10 dias.

Figura 17 – Concentração de açúcares redutores totais após hidrólise enzimática de cavacos de madeira utilizando a mistura enzimática de *C. cubensis*, *Hypoxylon* sp. e *A. sydowii* (10:5:5 FPU/g de cavaco), o coquetel comercial Multifect® CL (20 FPU/g de cavaco), e o tampão.



Fonte: A Autora.

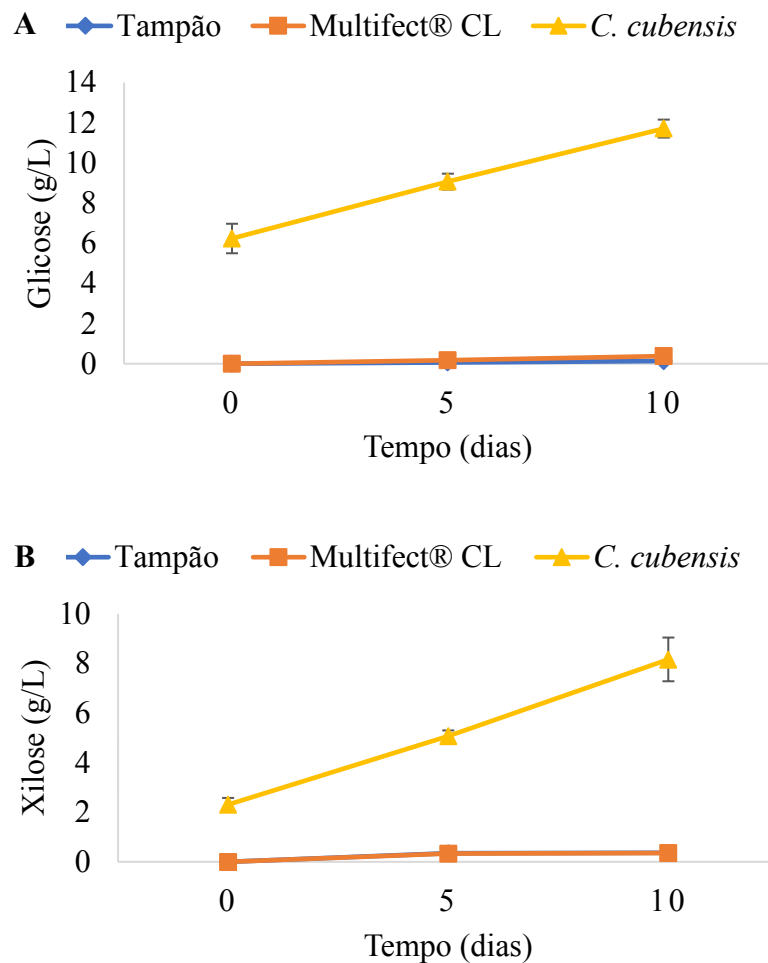
O saldo proveniente da mistura enzimática foi de 43,86 mmol/L após 5 dias de hidrólise dos cavacos de madeira e de 14,04 mmol/L após 10 dias. Desse modo, a concentração de açúcares redutores em 5 dias se assemelhou ao valor obtido pelo coquetel individual de *C. cubensis* utilizado na concentração de 10 FPU/g, enquanto a liberação em 10 dias foi menor do que aquelas apresentadas nos ensaios anteriores, o que indica que as enzimas adicionais de *Hypoxylon* sp. e *A. sydowii* não contribuíram de forma significativa para aprimorar a ação das enzimas de *C. cubensis*.

Além disso, as enzimas de *C. cubensis* utilizadas na concentração de 20 FPU/g de cavaco, equivalente à proporção total do *blend*, ainda se mostraram mais eficientes na liberação de açúcares redutores. Nessa avaliação, portanto, conclui-se que não houve sinergia entre enzimas oriundas dos fungos diferentes, não havendo vantagens na utilização dos extratos combinados testados.

5.4.2 Determinação de glicose e xilose

Os dois principais produtos de sacarificação enzimática da celulose e da hemicelulose, glicose e xilose, respectivamente, foram quantificados via CLAE. As concentrações de glicose e xilose durante o processo de hidrólise enzimática dos cavacos de madeira pelas enzimas ativas de *C. cubensis* na concentração de 10 FPU/g, são mostradas na Figura 18A e B, respectivamente.

Figura 18 – Concentrações de glicose (A) e xilose (B) obtidas após hidrólise enzimática de cavacos de madeira pelas enzimas ativas do extrato bruto de *C. cubensis*, pelo coquetel comercial Multifect® CL, todos na concentração de 10 FPU/g de cavaco, e pelo tampão.



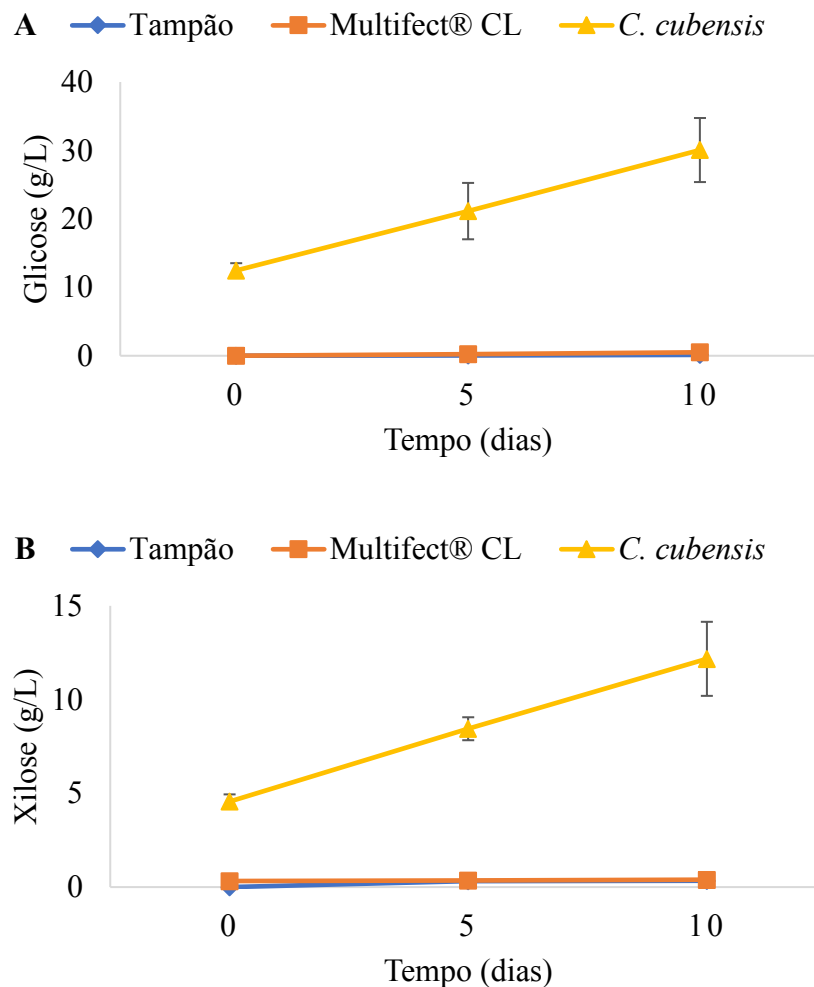
Fonte: A Autora.

As amostras de tampão e Multifect® CL apresentaram liberação de glicose e xilose pouco expressivas com relação às amostras de *C. cubensis*. A ineficiência de sacarificação pelo coquetel comercial Multifect® CL pode estar relacionada à ausência de lacases em sua constituição, descrito por Maitan-Alfenas e colaboradores (2015), visto que o alto teor de lignina, característico da composição da madeira, constitui uma barreira para ação de celulases e hemicelulases (ZHENG *et al.*, 2014). Considerando as concentrações de glicose e xilose iniciais e obtidas a partir do extrato enzimático inativado, o saldo de liberação de glicose pelo extrato enzimático ativo de *C. cubensis* na concentração de 10 FPU/g de cavaco foi de 2,84 g/L em 5 dias e 5,48 g/L após 10 dias. As concentrações de xilose, por sua vez, foram de 2,76 e 5,85 g/L, após 5 e 10 dias, respectivamente.

O ensaio realizado na concentração de 20 FPU/g de cavaco (Figura 19A e B) também demonstrou liberação praticamente nula de glicose e xilose pelo tampão e pelo coquetel

comercial Multifect® CL, enquanto o saldo de glicose liberada a partir das enzimas ativas de *C. cubensis* foi de 8,68 e 17,61 g/L em 5 e 10 dias, respectivamente. A liberação líquida de xilose após 5 dias foi de 3,89 g/L e, após 10 dias, de 7,62 g/L. Considerando as duas cargas enzimáticas testadas, o extrato de *C. cubensis* na concentração de 20 FPU/g de cavaco demonstrou liberação dos monossacarídeos de modo mais expressivo após 10 dias de hidrólise, sobretudo para glicose.

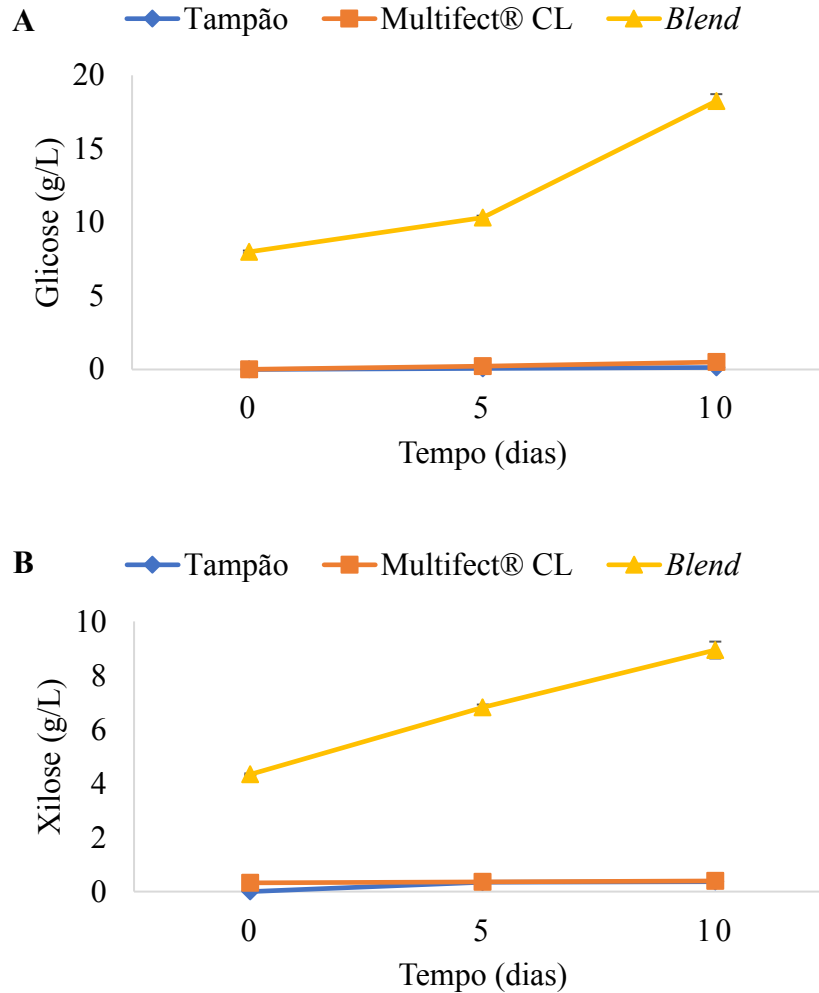
Figura 19 – Concentrações de glicose (A) e xilose (B) obtidas após hidrólise enzimática de cavacos de madeira pelas enzimas ativas do extrato bruto de *C. cubensis*, pelo coquetel comercial Multifect® CL, todos na concentração de 20 FPU/g de cavaco, e pelo tampão.



Fonte: A Autora.

O ensaio para o *blend* formado pelo extrato de *C. cubensis*, *Hypoxylon* sp. e *A. sydowii* (10:5:5 FPU/g de cavaco) (Figura 20A e B), por sua vez, demonstrou saldo de liberação de 2,34 g/L de glicose após 5 dias, e 10,27 g/L após 10 dias. Para a xilose, o saldo foi de 2,48 e 4,61 g/L após 5 e 10 dias de hidrólise, respectivamente.

Figura 20 – Concentrações de glicose (A) e xilose (B) obtidas após ensaio de hidrólise enzimática de cavacos de madeira pela mistura enzimática de *C. cubensis*, *Hypoxylon* sp. e *A. sydowii* (10:5:5 FPU/g de cavaco), o coquetel comercial Multifect® CL (20 FPU/g de cavaco), e o tampão.



Fonte: A Autora.

O efeito do *blend*, quando comparado à hidrólise dos cavacos de madeira pelo extrato enzimático de *C. cubensis* na concentração de 10 FPU/g de cavaco indicou melhoria na liberação de glicose após 10 dias, inferindo que a adição das enzimas de *Hypoxylon* sp. e *A. sydowii* auxiliaram na desestruturação da celulose. Em contrapartida, as enzimas de *C. cubensis* utilizadas na concentração de 20 FPU/g superaram a liberação de glicose e xilose quando comparadas ao *blend* na mesma proporção enzimática total, indicando que as enzimas do próprio extrato atuaram de forma mais sinérgica na hidrólise dos cavacos do que enzimas contidas na mistura.

Em bioprocessos para a produção de açúcares fermentescíveis a partir de *Eucalyptus* sp., normalmente são empregados diferentes métodos e combinações de pré-tratamentos para

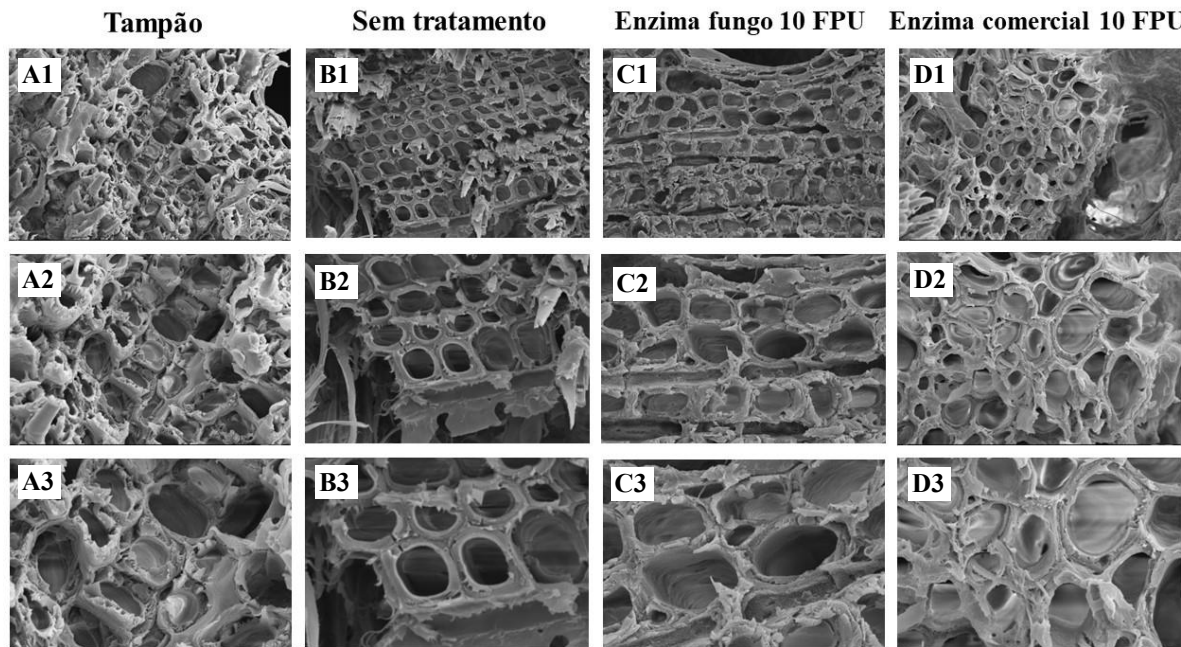
melhoramento da sacarificação enzimática (THORESEN *et al.*, 2021), como ácido diluído (WEI; WU; LIU, 2012), explosão a vapor (MARTIN-SAMPEDRO *et al.*, 2014), alcalino e hidrotérmico-mecanoquímico (ISHIGURO; ENDO, 2014). Sabe-se, portanto, que a recalcitrância do complexo hemicelulose/celulose e principalmente lignina em biomassas lenhosas se apresenta como um desafio para o acesso das enzimas (HOUFANI *et al.*, 2020; TAKADA *et al.*, 2020). Contudo, a utilização de pré-tratamento se torna limitada e inviável para o objetivo de aplicação no campo, seja por necessidade de produtos químicos, equipamentos ou formação de subprodutos.

Um estudo de sacarificação de *Eucalyptus globulus* utilizando enzimas comerciais após pré-tratamento hidrotérmico e biológico com fungos endofíticos obteve concentração de glicose entre 7 a 9 g/L, e de xilose entre 1,5 a 2,5 g/L, após 72 horas de hidrólise (MARTÍN-SAMPEDRO *et al.*, 2015). Dessa forma, mesmo com a ausência de pré-tratamento nos ensaios de sacarificação do presente trabalho, concentrações superiores de glicose e xilose foram alcançadas em maior período de tempo.

5.4.3 Avaliação estrutural dos cavacos de madeira após hidrólise enzimática

As microestruturas das amostras brutas dos cavacos foram analisadas primeiramente por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para avaliação preliminar das paredes vegetais após tratamento com enzimas. Os tratamentos com tampão e Multifect® CL também foram avaliados para comparação. A Figura 21 mostra as microfotografias do plano transversal da madeira após o tratamento com o extrato enzimático de *C. cubensis*, com o coquetel comercial Multifect® CL, ambos na concentração de 10 FPU/g de cavaco, com o tampão e a madeira sem nenhum tratamento. Como as amostras foram derivadas de cavacos brutos, para a análise da micromorfologia deve ser considerada a não padronização das amostras em termos de tamanho, região do tronco e polimento, apresentando resquícios do cisalhamento do processamento dos cavacos.

Figura 21 – Imagens obtidas por MEV do plano transversal dos cavacos de madeira após 10 dias de hidrólise enzimática com tampão (A1, A2, A3), sem tratamento (B1, B2, B3), pelo extrato de *C. cubensis* (C1, C2, C3) e pelo Multifect® CL (D1, D2, D3), na concentração de 10 FPU/g de cavaco. De cima para baixo, as ampliações são de 1500X, 3000X e 5000X, referentes à mesma região.



Fonte: A Autora.

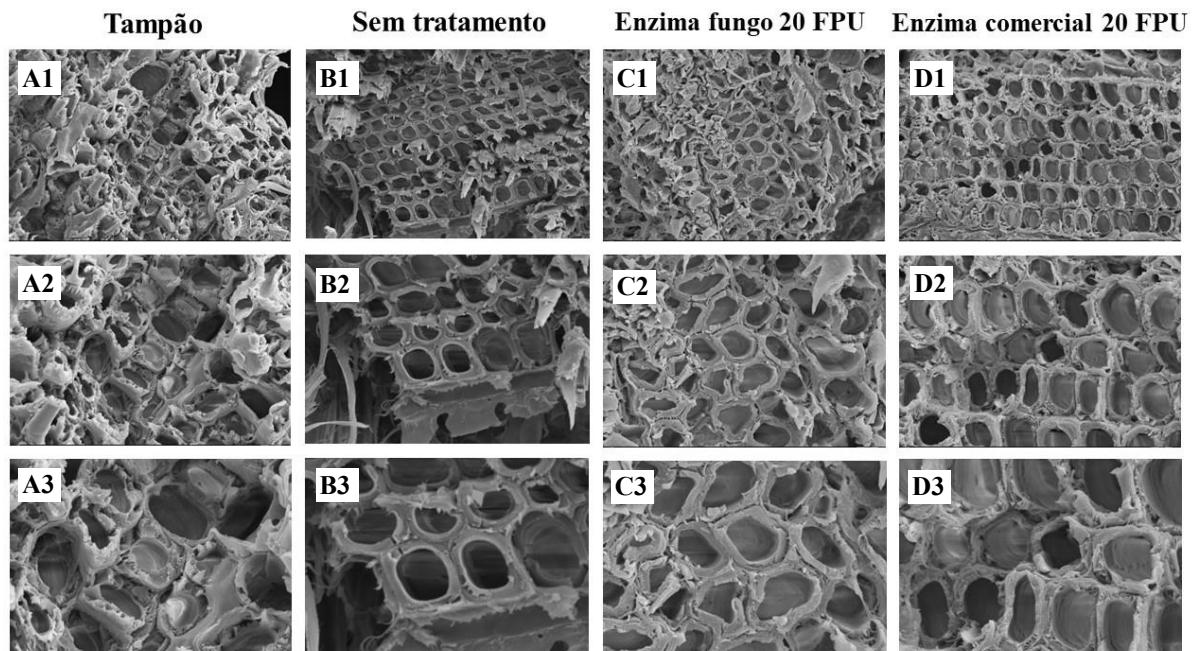
O cisalhamento intrínseco às amostras causou um macro efeito em suas superfícies, dificultando a análise. As enzimas, por sua vez, atuam em magnitudes menores, de modo localizado e não homogêneo nas camadas da parede celular, cujas alterações são melhor observadas em maiores resoluções.

Apesar disso, é possível observar que o tampão provocou entumescimento nas células vegetais quando comparado à madeira sem tratamento, cujo formato das células se apresenta de modo mais regular e enrijecido (Figuras 21A e B, respectivamente). O entumescimento celular também pode ser observado nos tratamentos enzimáticos.

As microfotografias provenientes da ação do extrato enzimático de *C. cubensis* na concentração de 10 FPU/g de cavaco (Figuras 21C) mostram uma região com menor efeito de cisalhamento, fragmentações superficiais e não apresentam maiores evidências de degradação. Tais observações podem ser decorrentes tanto do efeito enzimático, quanto do processamento do material. O tratamento com enzimas comerciais, por sua vez, mostrou menos fragmentações e paredes celulares menos espessas, podendo ser característica da região anatômica, carecendo de maiores evidências (Figuras 21D).

Considerando os mesmos controles negativos, o efeito em maior proporção enzimática também foi avaliado (Figura 22). Para a amostra tratada com o coquetel comercial Multifect® CL na concentração de 20 FPU/g de cavaco é possível notar fragmentações superficiais nas paredes, decorrentes do tratamento enzimático ou original da amostra (Figuras 22D), sem aparentar outras diferenças com relação ao tampão. A amostra tratada com as enzimas de *C. cubensis* na concentração de 20 FPU/g de cavaco, por sua vez, mostrou maior delineamento das lamelas médias e parede primária pelos tons mais escuros entre as células (Figura 22 C2 e C3), o que pode indicar algum indício de afastamento entre as paredes pela ação das enzimas do extrato.

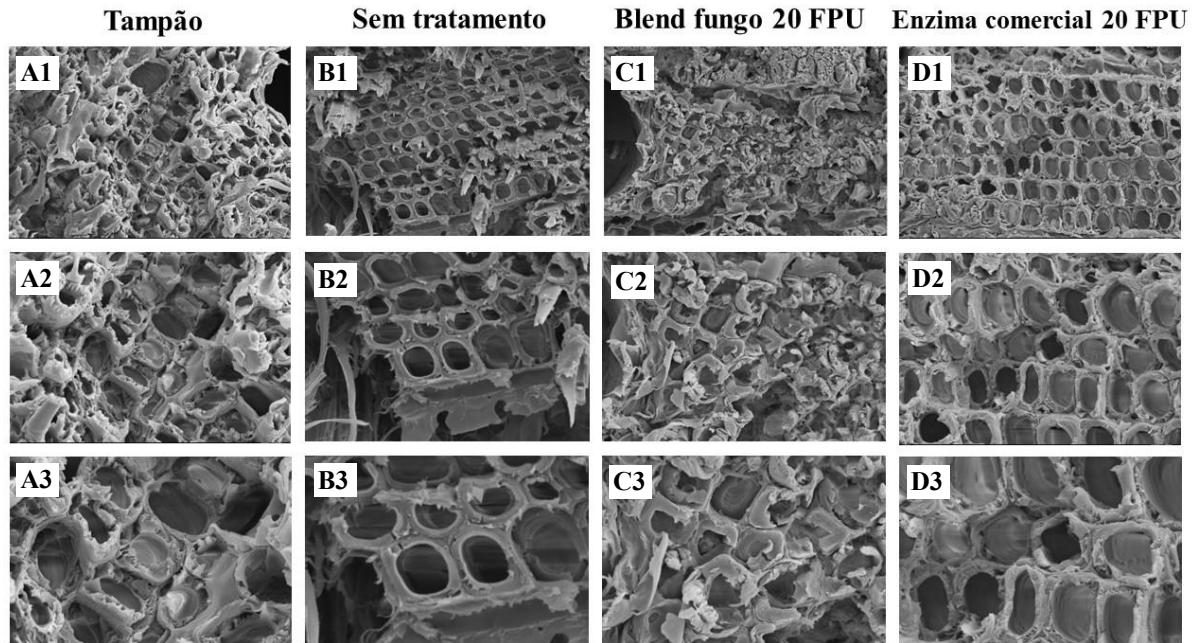
Figura 22 – Imagens obtidas por MEV do plano transversal dos cavacos de madeira após 10 dias de hidrólise enzimática com tampão (A1, A2, A3), sem tratamento (B1, B2, B3), pelo extrato de *C. cubensis* (C1, C2, C3) e pelo Multifect® CL (D1, D2, D3), na concentração de 20 FPU/g de cavaco. De cima para baixo, as ampliações são de 1500X, 3000X e 5000X, referentes à mesma região.



Fonte: A Autora.

Por fim, a madeira tratada com *blend* também foi avaliada por MEV (Figura 23), mas a sua superfície apresentou grande efeito do processamento da amostra, dificultando a análise qualitativa. Dessa forma, não foi possível observar evidências de degradação.

Figura 23 – Imagens obtidas por MEV do plano transversal dos cavacos de madeira após 10 dias de hidrólise enzimática com tampão (A1, A2, A3), sem tratamento (B1, B2, B3), pela mistura de *C. cubensis*, *Hypoxyylon* sp. e *A. sydowii* (concentração de 10:5:5 FPU/g de cavaco) (C1, C2, C3) e pelo Multifect® CL, na concentração de 20 FPU/g de cavaco (D1, D2, D3). De cima para baixo, as ampliações são de 1500X, 3000X e 5000X, referentes à mesma região.

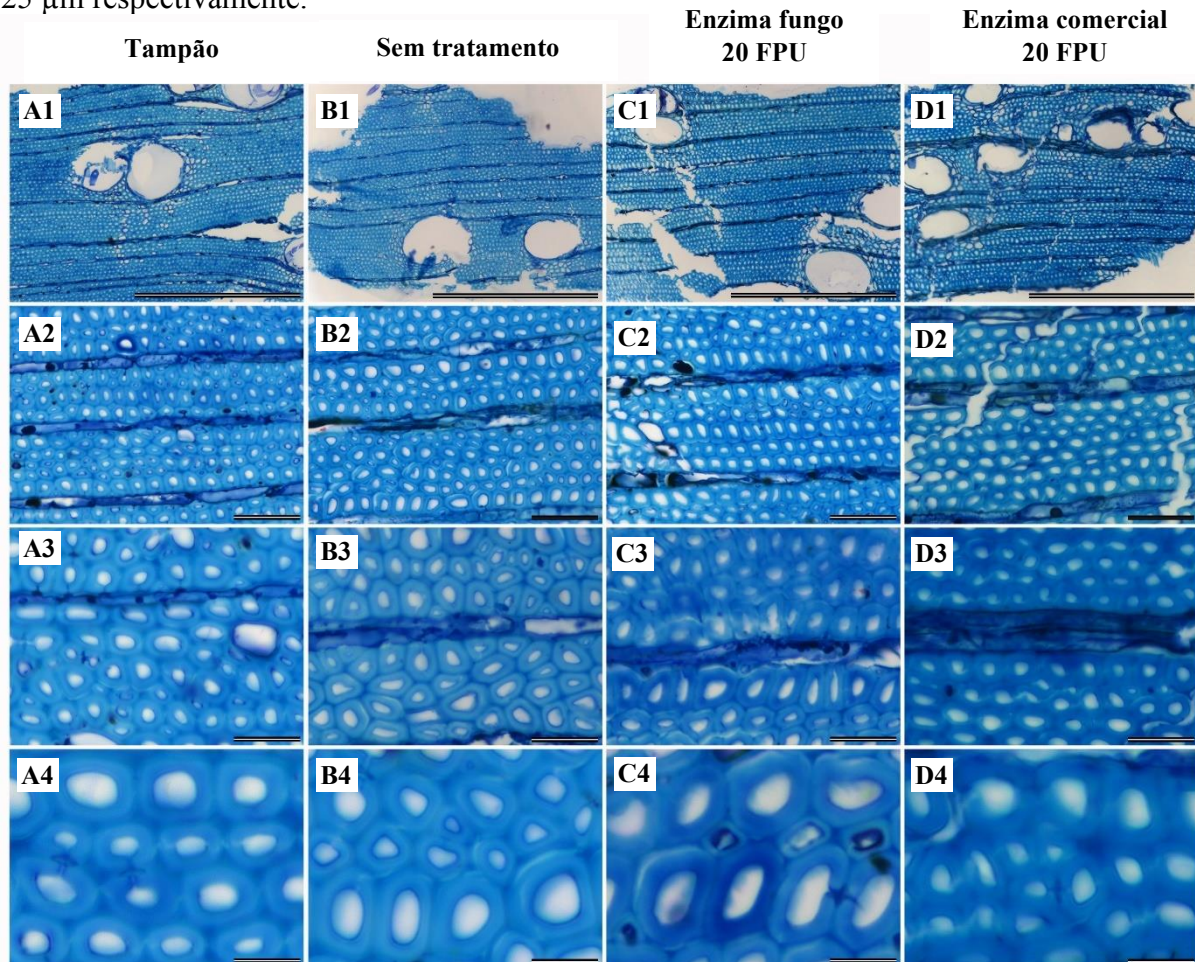


Fonte: A Autora.

De modo geral, as imagens preliminares de cada tratamento obtidas por MEV foram parcialmente mascaradas pelo efeito do processamento das amostras. Ainda assim, indícios de diferenças entre os tratamentos a nível de parede celular são sugeridos, observado principalmente nas lamelas médias da amostra tratada com o extrato enzimático de *C. cubensis* na concentração de 20 FPU/g de cavaco. Tais aspectos podem ser decorrentes tanto do efeito enzimático, quanto da região anatômica e corte do material. Deste modo, para uma análise mais precisa, se faz necessário a padronização das amostras para a utilização desta ferramenta.

Uma segunda abordagem qualitativa foi realizada por meio de microscopia óptica para análise das amostras tratadas com maior carga enzimática de *C. cubensis* (20 FPU/g de cavaco) (Figura 24), cujos resultados anteriores se mostraram mais interessantes. O azul de toluidina é um corante que apresenta efeito de metacromasia, propiciando diferentes colorações de acordo com os constituintes de um tecido, como lignina e carboidratos de paredes vegetais (VIDAL; MELLO, 2019).

Figura 24 – Imagens obtidas por microscopia óptica do plano transversal dos cavacos de madeira após 10 dias de hidrólise enzimática com tampão (A1, A2, A3, A4), sem tratamento (B1, B2, B3, B4), pelo extrato de *C. cubensis* (C1, C2, C3, C4) e pelo Multifect® CL (D1, D2, D3, D4), na concentração de 20 FPU/g de cavaco. De cima para baixo, as ampliações são de 10X, 20X, 40X e 80X referentes à mesma região. Barras de escala: 500 µm, 100 µm, 50 µm e 25 µm respectivamente.



Fonte: A Autora.

Através dessa segunda abordagem pode ser observado novamente a melhor definição das células sem tratamento com relação ao entumescimento presente nas demais. As ampliações de 40 e 80X mostram certa variação de coloração entre os tratamentos.

A escala de metacromasia do azul de toluidina atribui coloração verde para fenólicos solúveis, verde-azulado a azul-esverdeado para a lignina, azul escuro para celulose, roxo para pectina e rosa para pectatos e mucilagens (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964). Dessa forma, nas imagens de maiores ampliações é possível notar que as amostras lignificadas sem tratamento e em contato apenas com tampão aparentaram um tom de azul mais claro com relação aos tratamentos enzimáticos (Figuras 24 B3/B4, A3/A4, respectivamente), sugerindo que os controles negativos apresentaram maior presença de lignina nas paredes. Por outro lado, as amostras que tiveram contato com o coquetel enzimático de *C. cubensis* e com o coquetel

comercial Multifect® CL, ambos na concentração de 20 FPU/g de cavaco, apresentaram região azulada mais intensa, inferindo menor presença de lignina e consequente exposição dos polissacarídeos (Figuras 24 C3/C4, D3/D4, respectivamente). A sutil variação de coloração pode indicar que a presença de enzimas lignocelulolíticas presentes nos coquetéis enzimáticos promove alteração na estrutura do complexo lignocelulósico, mesmo que em pequena escala.

Embora a metodologia para microscopia óptica minimize o efeito macro do cisalhamento das amostras, a microestrutura foi inicialmente avaliada somente em quesitos qualitativos e descritivos de coloração, uma vez que o tamanho das paredes, células e elementos de vasos do xilema podem ter variações conforme à região anatômica da planta, ausência ou presença de estresse hídrico (ANDRADE BUENO *et al.*, 2020), bem como condições edafoclimáticas da área de plantio (CÂMARA *et al.*, 2020). Dessa forma, para análises mais avançadas é necessária a definição das amostras vegetais em termos de idade, lenho, corte, tamanho e condições de cultivo da madeira.

Levando em conta as ressalvas quanto à padronização das amostras para os métodos de microscopia, ainda assim é possível considerar que, para uma avaliação inicial, as duas abordagens microscópicas sugeriram indicadores de alteração na microestrutura da madeira após 10 dias de tratamento com o coquetel enzimático de *C. cubensis* na concentração de 20 FPU/g de cavaco.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tocos e raízes remanescentes nas áreas de plantio constituem um dos grandes desafios para as empresas florestais, necessitando de novas abordagens que contribuam na resolução dessa problemática. A produção e a utilização de enzimas têm crescido cada vez mais em diversos setores industriais por serem catalisadores naturais não tóxicos altamente específicos.

No presente trabalho, as biomassas lignocelulósicas de madeira de eucalipto e pinus, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo foram avaliadas quanto ao potencial de indução de enzimas lignocelulolíticas de 11 fungos isolados de madeira. O farelo de trigo foi a fonte de carbono que induziu as maiores atividades para a maior parte dos fungos. Sua composição rica em proteínas e minerais contribuem para o crescimento dos microrganismos, além de baixo teor de lignina, que confere maior acessibilidade aos polissacarídeos.

A produção de enzimas lignocelulolíticas pelo fungo fitopatogênico *Chrysosporthe cubensis* cultivado em farelo de trigo se destacou para as principais atividades com relação aos demais isolados avaliados. Os isolados LPF2180 e LPF2473 cultivados em pinus e farelo de trigo, respectivamente, se destacaram para enzimas complementares e foram identificados molecularmente como *Hypoxylon* sp. e *Aspergillus sydowii*.

O blend formado pela adição de 5 FPU/g de cavaco de *Hypoxylon* sp. e *A. sydowii* com 10 FPU/g de cavaco de *C. cubensis* apresentou melhorias parciais com relação ao extrato individual de *C. cubensis* na concentração de 10 FPU/g de cavaco na hidrólise da madeira por 10 dias. No entanto, o coquetel individual de *C. cubensis* em maior proporção de enzimas (20 FPU/g de cavaco) demonstrou maior liberação de açúcares redutores, glicose e xilose.

Imagens obtidas por MEV das paredes vegetais sugeriram alteração das lamelas médias no tratamento com as enzimas de *C. cubensis* 20 FPU/g de cavaco, não observado para os demais tratamentos. No entanto, o efeito do cisalhamento oriundo do processamento dos cavacos dificultou a avaliação, sendo necessário a padronização das amostras para esse tipo de análise. A microscopia de luz com azul de toluidina sugeriu degradação da lignina e maior exposição da celulose nas amostras tratadas com enzimas, quando comparadas aos controles negativos, sugerindo a ação positiva das enzimas.

Embora a degradação da madeira seja limitada pela alta recalcitrância da arquitetura da biomassa lenhosa associada à ausência de pré-tratamento, o trabalho demonstra o potencial do uso de enzimas para a degradação de madeira, visando à destoca biológica. Mais estudos, portanto, se fazem necessários para avaliação de outros fatores, como hidrólise em maiores tempos, reaplicações enzimáticas e a utilização de coquetéis enzimáticos mais concentrados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, A. P. *et al.* Improvement in mechanical, physical and biological properties of eucalyptus and pine woods by raw pine resin in situ polymerization. **Industrial Crops and Products**, v. 166, n. March, 2021.
- ADAMS, G. C.; ROUX, J.; WINGFIELD, M. J. Cytospora species (Ascomycota, Diaporthales, Valsaceae): Introduced and native pathogens of trees in South Africa. **Australasian Plant Pathology**, v. 35, n. 5, p. 521–548, 2006.
- ALBUQUERQUE, K. K. S. A. *et al.* Biotechnological potential of a novel tannase-acyl hydrolase from *Aspergillus sydowii* using waste coir residue: Aqueous two-phase system and chromatographic techniques. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, n. September 2019, 2020.
- ALFENAS, A. C. **Processo de destoca biológica de eucalyptus, mediante o uso de fungos apodrecedores**. Depositante: Universidade Federal de Viçosa; Rhodia Ster S/A. Sylvia Maria Machado Vedramini. PI 0104661-6 A2, Depósito: 22 Jun. 2001, Publicação: 15 Abr. 2003. Disponível em: <https://www.escavador.com/patentes/471708/processo-destoca-biologicaeucalyptus-mediante-uso-fungos-apodrecedores>. Acesso em: 13 Jan. 2022.
- ALFENAS, R. F. *et al.* Root Collar Rot, a New Lethal Disease on *Tectona grandis* Caused by *Kretzschmaria zonata* in Brazil. **Plant Disease**, v. 105, n. 1, p. 221, 2020.
- ALFENAS, A. C; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. 2 ed. Viçosa: Ed. UFV, 2016, 516 p.
- ALIYAH, A. *et al.* Production of α -Amylase and β -Glucosidase from *Aspergillus Niger* by solid state fermentation method on biomass waste substrates from rice husk, bagasse and corn cob. **Energy Procedia**, v. 136, p. 418–423, 2017.
- AMIRZAKARIYA, B. Z.; SHAKERI, A. Bioactive terpenoids derived from plant endophytic fungi: An updated review (2011–2020). **Phytochemistry**, v. 197, n. January, p. 113130, 2022.
- ANDRADE BUENO, I. G. *et al.* Wood anatomy of field grown eucalypt genotypes exhibiting differential dieback and water deficit tolerance. **Current Plant Biology**, v. 22, n. January, 2020.
- ANDRADE, F. A. DE *et al.* Selection of fungi for accelerated decay in stumps of *Eucalyptus* spp. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 456–461, 2012.
- ANDRADE, F. A. **Degradação de tocos de *Eucalyptus grandis* por fungos**. 2003. 76 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2003.
- BALLONI, C. J. V. **Caracterização física e química da madeira de *Pinus elliottii***. 2009. Monografia (Graduação em Engenharia Industrial Madeireira) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Itapeva, 2009.
- BARRETT, K. *et al.* Fungal secretome profile categorization of CAZymes by function and family corresponds to fungal phylogeny and taxonomy: Example *Aspergillus* and *Penicillium*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020.

BASTOS, S. C. *et al.* Characterization of the optimal conditions for the cultivation of *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries and isolation of the pectinase produced in solid-state conditions. n. November, p. 538–542, 2010.

BCC RESEARCH. **Global Markets for Enzymes in Industrial Applications**. Disponível em: <<https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/global-markets-for-enzymes-in-industrial-applications.html>>. Acesso em: 11 abr. 2021.

BEIMS, R. F. *et al.* Functionalized wood as bio-based advanced materials: Properties, applications, and challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 157, n. December 2021, p. 112074, 2022.

BENSCH, K. *et al.* Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). **Studies in Mycology**, v. 67, p. 1–94, 2010.

BERTONHA, L. C. *et al.* Screening of *Fusarium* sp. for xylan and cellulose hydrolyzing enzymes and perspectives for the saccharification of delignified sugarcane bagasse. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, n. May, p. 385–389, 2018.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248–254, 1976.

BRADSTREET, R. B. Kjeldahl Method for Organic Nitrogen. **Analytical Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 185–187, 1954.

BRANDT, S. C. *et al.* *Aspergillus sydowii*: Genome Analysis and Characterization of Two Heterologous Expressed, Non-redundant Xylanases. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. September, 2020.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003, dispõe sobre **Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados**. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 de dez. 2003.

BROWN, N. A.; RIES, L. N. A.; GOLDMAN, G. H. How nutritional status signalling coordinates metabolism and lignocellulolytic enzyme secretion. **Fungal Genetics and Biology**, v. 72, p. 48–63, 2014.

CÂMARA, A. P. *et al.* Changes in hydraulic architecture across a water availability gradient for two contrasting commercial *Eucalyptus* clones. **Forest Ecology and Management**, v. 474, n. June, p. 118380, 2020.

CANTERI, M. H. G. *et al.* Pectin: From raw material to the final product. **Polimeros**, v. 22, n. 2, p. 149–157, 2012.

CHAI, Y. *et al.* Valorization of waste biomass through fungal technology: Advances, challenges, and prospects. **Industrial Crops and Products**, v. 188, p. 115608, nov. 2022.

CHILAKAMARRY, C. R. *et al.* Advances in solid-state fermentation for bioconversion of agricultural wastes to value-added products: Opportunities and challenges. **Bioresource**

Technology, v. 343, n. August 2021, p. 126065, 2022.

CHIRAT, C. Use of vegetal biomass for biofuels and bioenergy. Competition with the production of bioproducts and materials? **Comptes Rendus Physique**, v. 18, n. 7–8, p. 462–468, set. 2017.

CLINE, L. C. *et al.* Ecological and functional effects of fungal endophytes on wood decomposition. **Functional Ecology**, v. 32, n. 1, p. 181–191, 2018.

COSTA, L. G. DA. **Seleção de fungos com capacidade de degradação de tocos de Eucalyptus spp. para utilização na destoca biológica**. 2014. p. 69. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, 2014.

COSTA, L. G. DA *et al.* Potential of selected fungi for biological stump removal of Eucalyptus spp. **Forest Ecology and Management**, v. 402, n. July, p. 265–271, 2017.

COSTA, S. S. *et al.* Fusarium paranaense sp. nov., a member of the Fusarium solani species complex causes root rot on soybean in Brazil. **Fungal Biology**, v. 120, n. 1, p. 51–60, 2016.

CROUS, P. W. *et al.* Fusarium: more than a node or a foot-shaped basal cell. **Studies in Mycology**, v. 98, 2021.

DA LUZ MORALES, M. *et al.* First report on the enzymatic profile of Kretzschmaria zonata. **3 Biotech**, v. 11, n. 9, p. 1–6, 2021.

DA ROSA-GARZON, N. G. *et al.* Fusarium oxysporum cultured with complex nitrogen sources can degrade agricultural residues: Evidence from analysis of secreted enzymes and intracellular proteome. **Renewable Energy**, v. 133, n. 2019, p. 941–950, 2019.

DE ALONSO, S. K. *et al.* Isolamento e seleção de fungos causadores da podridão-branca da madeira em florestas de Eucalyptus spp. com potencial de degradação de cepas e raízes. **Revista Arvore**, v. 31, n. 1, p. 145–155, 2007.

DE FREITAS, E. N. *et al.* Challenges of biomass utilization for bioenergy in a climate change scenario. **Biology**, v. 10, n. 12, 2021.

DE VRIES, R. P. *et al.* **Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus Aspergillus**. [s.l: s.n.]. v. 18

DE VRIES, R. P.; VISSER, J. Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 4, p. 497–522, 2001.

DUTRA, T. R. *et al.* A Chrysosporthe cubensis enzyme cocktail produced from a low-cost carbon source with high biomass hydrolysis efficiency. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.

EGNELL, G.; JUREVICS, A.; PEICHL, M. Negative effects of stem and stump harvest and deep soil cultivation on the soil carbon and nitrogen pools are mitigated by enhanced tree

growth. **Forest Ecology and Management**, v. 338, p. 57–67, 2015.

EUFRADE-JUNIOR, H. DE J. *et al.* Stump and coarse root biomass from eucalypt forest plantations in a commercial-scale operation for bioenergy. **Biomass and Bioenergy**, v. 142, n. August, 2020.

FALKOSKI, D. L. *et al.* *Chrysosporthe cubensis*: A new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 296–305, 2013.

FALKOSKI, D. L. **Enzimas lignocelulolíticas de fungos de podridão branca e fitopatógenos: produção, caracterização e aplicação em processos de sacarificação da biomassa**. 2011, 102f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG. 2011.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. In: Berlin: [s.n.]. p. 613.

FERRAZ, A.; BAEZA, J.; RODRIGUEZ, J.; FREER, J. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 201 – 212, 2000.

FERREIRA, J. A. *et al.* Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 334–345, 2016.

FILIATRAULT-CHASTEL, C. *et al.* From fungal secretomes to enzymes cocktails: The path forward to bioeconomy. **Biotechnology Advances**, v. 52, n. August, p. 107833, 2021.

FONTANA, D. C. *et al.* Endophytic fungi: Biological control and induced resistance to phytopathogens and abiotic stresses. **Pathogens**, v. 10, n. 5, p. 1–28, 2021.

FUKASAWA, Y.; MATSUKURA, K. Decay stages of wood and associated fungal communities characterise diversity-decomposition relationships. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 8972, 2021.

GIBSON, D. M. *et al.* Plant pathogens as a source of diverse enzymes for lignocellulose digestion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 264–270, 2011.

GONZÁLEZ, C. *et al.* Biomass to value-added products using microbial consortia with white-rot fungi. **Bioresource Technology Reports**, v. 16, 2021.

GREEN, F.; HIGHLEY, T. L. Mechanism of brown-rot decay: Paradigm or paradox. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 39, n. 2–3, p. 113–124, 1997.

GRYZENHOUT, M. *et al.* Novel hosts of the Eucalyptus canker pathogen *Chrysosporthe cubensis* and a new *Chrysosporthe* species from Colombia. **Mycological Research**, v. 110, n. 7, p. 833–845, 2006.

GUASCHINO, M.; JENSEN, D. F. Insights into the ecological generalist lifestyle of Clonostachys fungi through analysis of their predicted secretomes. **Front Microbiol.** February,

p. 1–16, 2023.

GUIMARÃES, L. M. DA S. *et al.* Genetic control of *Eucalyptus urophylla* and *E. grandis* resistance to canker caused by *Chrysosporthe cubensis*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 3, p. 525–531, 2010.

HAGAG, A. *et al.* The endophytic *Aspergillus* strains: A bountiful source of natural products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 6, p. 4150–4169, 2022.

HALLEGRAEFF, G. *et al.* Australian dust storm associated with extensive *Aspergillus sydowii* fungal “Bloom” in coastal waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 11, p. 3315–3320, 2014.

HEPPERLE D. **SeqAssem - analysis and contig assembly of sequences**. SequentiX-Digital DNA Processing, Klein Raden, Germany, 2004.

HOPE, G. D. Changes in soil properties, tree growth, and nutrition over a period of 10 years after stump removal and scarification on moderately coarse soils in interior British Columbia. **Forest Ecology and Management**, v. 242, n. 2–3, p. 625–635, 2007.

HOUBRAKEN, J. *et al.* Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. **Studies in Mycology**, v. 95, p. 5–169, 2020.

HOUFANI, A. A. *et al.* Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars– a review. **Biomass and Bioenergy**, v. 134, n. January, p. 105481, 2020.

HOWELL, C. *et al.* Temporal changes in wood crystalline cellulose during degradation by brown rot fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, n. 4, p. 414–419, 2009.

HUANG, C. *et al.* Functional fungal communities dominate wood decomposition and are modified by wood traits in a subtropical forest. **Science of the Total Environment**, v. 806, p. 151377, 2022.

IBÁ. **Relatório Anual IBÁ 2019**. Brasil: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorioiba2019-final.pdf>>.

IBÁ. **Relatório Anual IBÁ 2021**. Brasil: [s.n.]. Disponível em: <<https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorioiba2021-compactado.pdf>>.

IBÁ. **Relatório Anual IBÁ 2022**. Brasil: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-anual-iba2022-compactado.pdf>>.

INTASIT, R. *et al.* Synergistic production of highly active enzymatic cocktails from lignocellulosic palm wastes by sequential solid state-submerged fermentation and co-cultivation of different filamentous fungi. **Biochemical Engineering Journal**, v. 173, n. May, p. 108086, 2021.

ISHIGURO, M.; ENDO, T. Addition of alkali to the hydrothermal-mechanochemical treatment of Eucalyptus enhances its enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 322–326, 2014.

ISMAIL, S. A.; NOUR, S. A.; HASSAN, A. A. Valorization of corn cobs for xylanase production by *Aspergillus flavus* AW1 and its application in the production of antioxidant oligosaccharides and removal of food stain. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 41, n. February, p. 102311, 2022.

JAKOB, M. *et al.* The strength and stiffness of oriented wood and cellulose-fibre materials: A review. **Progress in Materials Science**, v. 125, n. December 2021, p. 100916, 2022.

JENSEN, K. A. *et al.* Pathways for Extracellular Fenton Chemistry in the Brown Rot Basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2705–2711, 2001.

JOHN, J. *et al.* Advances in upstream and downstream strategies of pectinase bioprocessing: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 1086–1099, 2020.

KIKOT, G. E.; HOURS, R. A.; ALCONADA, T. M. Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: A review. **Journal of Basic Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 231–241, 2009.

KOSHILA RAVI, R.; PREMA SUNDARA VALLI, P.; MUTHUKUMAR, T. Physiological characterization of root endophytic *Fusarium haematococcum* for hydrolytic enzyme production, nutrient solubilization and salinity tolerance. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 43, n. June, p. 102392, 2022.

KUHNERT, E. *et al.* New *Hypoxyylon* species from Martinique and new evidence on the molecular phylogeny of *Hypoxyylon* based on ITS rDNA and β -tubulin data. **Fungal Diversity**, v. 64, n. 1, p. 181–203, 2014.

KUHNERT, E. *et al.* Secondary metabolite biosynthetic diversity in the fungal family Hypoxylaceae and *Xylaria hypoxyylon*. **Studies in Mycology**, v. 99, p. 1–43, 2021.

LE FLOCH, A.; JOURDES, M.; TEISSEDRE, P. L. Polysaccharides and lignin from oak wood used in cooperage: Composition, interest, assays: A review. **Carbohydrate Research**, v. 417, p. 94–102, 2015.

LEITE, P. *et al.* Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 27, p. 100407, 2021.

LEPINAY, C. *et al.* Successional development of wood-inhabiting fungi associated with dominant tree species in a natural temperate floodplain forest. **Fungal Ecology**, v. 59, n. December 2020, 2022.

LI, J. Q. *et al.* *Calonectria* in the age of genes and genomes: Towards understanding an important but relatively unknown group of pathogens. **Molecular Plant Pathology**, v. 23, n. 7, p. 1060–1072, 2022.

LIU, G.; QU, Y. Engineering of filamentous fungi for efficient conversion of lignocellulose: Tools, recent advances and prospects. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 4, p. 519–529, 2019.

LIU, Q. L. *et al.* Reconsideration of species boundaries and proposed DNA barcodes for *Calonectria*. **Studies in Mycology**, v. 97, 2020.

MACHUCA, A.; FERRAZ, A. Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white- and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 6–7, p. 386–391, 2001.

MAHANTY, B.; MISHRA, R.; JOSHI, R. K. Molecular characterization of Zn(II)₂Cys₆ cluster gene family and their association with pathogenicity of the onion basal rot pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 117, n. November 2021, p. 101782, 2022.

MAITAN-ALFENAS, G. P. *et al.* The influence of pretreatment methods on saccharification of sugarcane bagasse by an enzyme extract from *Chrysosporthe cubensis* and commercial cocktails: A comparative study. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 670–676, 2015.

MANAVALAN, T.; MANAVALAN, A.; HEESE, K. Characterization of Lignocellulolytic Enzymes from White-Rot Fungi. **Current Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 485–498, 2015.

MARINCOWITZ, S.; GRYZENHOUT, M.; WINGFIELD, M. J. New and rare coelomycetes with appendage-bearing conidia from Pondoland, South Africa. **Mycotaxon**, v. 111, n. March, p. 309–322, 2010.

MARTIN-SAMPEDRO, R. *et al.* Enhancement of enzymatic saccharification of *Eucalyptus globulus*: Steam explosion versus steam treatment. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 186–191, 2014.

MARTÍN-SAMPEDRO, R. *et al.* Use of new endophytic fungi as pretreatment to enhance enzymatic saccharification of *Eucalyptus globulus*. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 383–390, 2015.

MATKAR, K. *et al.* Production of cellulase by a newly isolated strain of *Aspergillus sydowii* and its optimization under submerged fermentation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 78, p. 24–33, 2013.

MATTOO, A. J.; NONZOM, S. Endophytes in Lignin Valorization: A Novel Approach. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, n. July, p. 1–30, 2022.

MAUSSE-SITOE, S. N. D. *et al.* Endophytic Cryphonectriaceae on native Myrtales: Possible origin of *Chrysosporthe* canker on plantation-grown *Eucalyptus*. **Fungal Biology**, v. 120, n. 6–7, p. 827–835, 2016.

MCKELVEY, S. M.; MURPHY, R. A. Biotechnological Use of Fungal Enzymes. In: **Fungi: Biology and Applications**. [s.l: s.n.]. p. 416.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytica Chemistry**, 31, 426–430, 1959.

MIRSAM, H. *et al.* Molecular Characterization of Indigenous Microbe and its Potential as a Biological Control Agent of Fusarium Stem Rot (*Fusarium Verticillioides*) on Maize. **SSRN Electronic Journal**, v. 8, n. November, p. e11960, 2022.

MISHRA, D. *et al.* Endophytic fungi as biostimulants. In: **Biostimulants for Crops from Seed Germination to Plant Development**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 365–391.

MOHAMED, H. *et al.* Deep learning strategies for active secondary metabolites biosynthesis from fungi: Harnessing artificial manipulation and application. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 38, n. June, p. 102195, 2021.

MONRROY, M. *et al.* Structural change in wood by brown rot fungi and effect on enzymatic hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 5, p. 472–477, 2011.

MORAN-AGUILAR, M. G. *et al.* Production of cellulases and xylanases in solid-state fermentation by different strains of *Aspergillus niger* using sugarcane bagasse and brewery spent grain. **Biochemical Engineering Journal**, v. 172, n. February, 2021.

MORRISON, J. M.; ELSHAHED, M. S.; YOUSSEF, N. H. Defined enzyme cocktail from the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. Strain C1A effectively releases sugars from pretreated corn stover and switchgrass. **Scientific Reports**, v. 6, n. May, p. 1–12, 2016.

NAIR, S. G.; SINDHU, R.; SHASHIDHAR, S. Enzymatic bleaching of kraft pulp by xylanase from *Aspergillus sydowii* SBS 45. **Indian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 332–338, 2010.

NEGRÃO, D. R. *et al.* Biodegradation of eucalyptus urograndis wood by fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 89, p. 95–102, 2014.

NREL Laboratory Analytical Procedure (LAP). **Determination of Ash in Biomass**. Ohio, 2008. (Technical Report NREL/TP-510-42622).

NREL Laboratory Analytical Procedure (LAP). **Determination of Extractives in Biomass**. Ohio, 2008. (Technical Report NREL/TP-510-42619).

NREL Laboratory Analytical Procedure (LAP). **Determination of Protein Content in Biomass**. Ohio, 2008. (Technical Report NREL/TP-510-42625).

NREL Laboratory Analytical Procedure (LAP). **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass**. Colorado, 2012. (Technical Report NREL/TP-510-42618).

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368–373, 1964.

OLIVEIRA, E. B. DE; PINTO JUNIOR, J. E. **O Eucalipto e a Embrapa. Quatro décadas de pesquisa e desenvolvimento**. 1. ed. Brasília, DF: 1163, 2021.

OLIVEIRA, J. G. DE S.; NUNEZ, C. V. Atividades biológicas e prospecção química de extratos de fungos endofíticos de *Duroia macrophylla* HUBER (RUBIACEAE). In: **Micologia: Fungos e/ou seus Metabólitos como Objeto de Estudo**. Ponta Grossa, PR: Atena Editora,

2020. p. 32–43.

ONOFRE, F. F. *et al.* **Modelo de degradação de tocos remanescentes em povoamentos de eucalipto**. XIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, outubro de 2001, Bauru, SP.

PAPADAKI, E. *et al.* Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using *Aspergillus niger* in an integrated citric acid-enzymes production process. **Bioresource Technology**, v. 309, p. 123317, ago. 2020.

PENÍN, L. *et al.* Technologies for Eucalyptus wood processing in the scope of biorefineries: A comprehensive review. **Bioresource Technology**, v. 311, n. May, p. 123528, 2020.

PIMENTEL, P. R. S. *et al.* Composição Química do Bagaço de Cana-de-Açúcar Tratado com Óxido de Cálcio. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 17, n. 1, p. 61–68, 2015.

PONTES, J. G. D. M. *et al.* Virulence Factors in the Phytopathogen-Host Interactions: An Overview. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 29, p. 7555–7570, 2020.

ROJAS, L. F.; ZAPATA, P.; RUIZ-TIRADO, L. Agro-industrial waste enzymes: Perspectives in circular economy. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 34, p. 100585, 2022.

ROSSO, M. N.; BERRIN, J. G.; LOMASCOLO, A. Plant wastes and sustainable refineries: What can we learn from fungi? **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 34, n. i, p. 1–10, 2022.

SAAD, O. **Máquinas e técnicas de preparo inicial do solo**. São Paulo: Nobel, 1984, p. 98.

SÁEZ-PLAZA, P. *et al.* An Overview of the Kjeldahl Method of Nitrogen Determination. Part I. Early History, Chemistry of the Procedure, and Titrimetric Finish. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 43, n. 4, p. 178–223, 2013.

SAINI, P. *et al.* Wheat Bran as Potential Source of Dietary Fiber: Prospects and Challenges. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 116, n. August 2022, p. 105030, 2022.

SAINI, S.; SHARMA, K. K. Fungal lignocellulolytic enzymes and lignocellulose: A critical review on their contribution to multiproduct biorefinery and global biofuel research. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, n. PB, p. 2304–2319, 2021.

SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ, S. *et al.* Biotransformation of lignocellulosic biomass into industrially relevant products with the aid of fungi-derived lignocellulolytic enzymes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 1099–1116, 2020.

SANTOS, M. B. *et al.* Bioactive molecules in wood extractives: Methods of extraction and separation, a review. **Industrial Crops and Products**, v. 186, n. May, p. 115231, 2022.

SCHWARZE, F. W. M. R. Wood decay under the microscope. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 133–170, 2007.

SIMETTI, R. *et al.* Production of biomass and energy stock for five Eucalyptus species. **Revista Ciência da Madeira - RCM**, v. 9, n. 1, p. 30–36, 2018.

SINGH, A. P.; SINGH, T. Biotechnological applications of wood-rotting fungi: A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 62, p. 198–206, 2014.

SOLAIRAJ, D. *et al.* Microclimatic parameters affect Cladosporium rot development and berry quality in table grapes. **Horticultural Plant Journal**, v. 8, n. 2, p. 171–183, 2022.

SONG, Z. *et al.* Fungal endophytes as priority colonizers initiating wood decomposition. **Functional Ecology**, v. 31, n. 2, p. 407–418, 2017.

SONG, Z. K. *et al.* Three New Species of Hypoxylon (Xylariales, Ascomycota) on a Multigene Phylogeny from Medog in Southwest China. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 5, 2022.

SPECHT, C. A. *et al.* A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. **Analytical Biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 158–163.

PAVAN, J. A.; ALVES, T. W.; SOUZA, M. A. DE. Viabilidade Econômica Da Produção De Eucalyptos No Rio Grande Do Sul. **ABCustos**, v. 5, n. 1, p. 92–127, 2010.

TAKADA, M. *et al.* The influence of lignin on the effectiveness of using a chemithermomechanical pulping based process to pretreat softwood chips and pellets prior to enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 302, n. December 2019, p. 122895, 2020.

TAVARES, M. P. *et al.* Secretomic insight into the biomass hydrolysis potential of the phytopathogenic fungus *Chrysosporthe cubensis*. **Journal of Proteomics**, v. 236, n. February, 2021.

TEIXEIRA, J. A. *et al.* Improved pectinase production in *Penicillium griseoroseum* recombinant strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. October, 2011.

THORESEN, M. *et al.* The effects of chemical and structural factors on the enzymatic saccharification of Eucalyptus sp. samples pre-treated by various technologies. **Industrial Crops and Products**, v. 166, n. November 2020, 2021.

TIAN, B. Y. *et al.* Microbial community structure and diversity in a native forest wood-decomposed hollow-stump ecosystem. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 233–240, 2010.

TRIBOT, A. *et al.* Wood-lignin: Supply, extraction processes and use as bio-based material. **European Polymer Journal**, v. 112, n. January, p. 228–240, 2019.

TROIANO, D.; ORSAT, V.; DUMONT, M. J. Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 117, n. February 2019, p. 109472, 2020.

TULSANI, N. J. *et al.* Genome analysis and CAZy repertoire of a novel fungus *Aspergillus sydowii* C6d with lignocellulolytic ability isolated from camel rumen. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 59, p. 36–45, 2022.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: Aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388–394, 2007.

VASCO-CORREA, J.; SHAH, A. Techno-economic bottlenecks of the fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. **Fermentation**, v. 5, n. 2, 2019.

VÁZQUEZ-MONTOYA, E. L. *et al.* Moringa straw as cellulase production inducer and cellulolytic fungi source. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 52, n. 1, p. 4–12, 2020.

VERMA, N.; KUMAR, V. Impact of process parameters and plant polysaccharide hydrolysates in cellulase production by *Trichoderma reesei* and *Neurospora crassa* under wheat bran based solid state fermentation. **Biotechnology Reports**, v. 25, p. e00416, 2020.

VIDAL, B. DE C.; MELLO, M. L. S. Toluidine blue staining for cell and tissue biology applications. **Acta Histochemica**, v. 121, n. 2, p. 101–112, 2019.

VISSER, E. M. *et al.* Production and application of an enzyme blend from *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 587–594, 2013.

WALMSLEY, J. D.; GODBOLD, D. L. Stump harvesting for bioenergy - A review of the environmental impacts. **Forestry**, v. 83, n. 1, p. 17–38, 2010.

WALSH-KORBS, Z.; AVÉROUS, L. Recent developments in the conservation of materials properties of historical wood. **Progress in Materials Science**, v. 102, n. November 2018, p. 167–221, 2019.

WANG, H. *et al.* Protein Nitrogen Determination by Kjeldahl Digestion and Ion Chromatography. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 6, p. 1851–1857, 2016.

WEI, W.; WU, S.; LIU, L. Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated eucalyptus chips for fermentable sugar production. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 302–307, 2012.

WHITE, T. J. *et al.* Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics. **PCR Protocols**, n. December 2015, p. 315–322, 1990.

WIKANDARI, R.; HASNIAH, N.; TAHERZADEH, M. J. The role of filamentous fungi in advancing the development of a sustainable circular bioeconomy. **Bioresource Technology**, v. 345, n. December 2021, p. 126531, 2022.

WOLFENDEN, B.S., WILLSON, R.L. Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). **J. Chem. Soc. Perkin Trans. II**. p. 805–812, 1982.

WU, W. *et al.* Characterization of four endophytic fungi as potential consolidated bioprocessing hosts for conversion of lignocellulose into advanced biofuels. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 6, p. 2603–2618, 2017.

YADAV, R. *et al.* Isolation and characterization of thermostable and alkali-tolerant cellulase from litter endophytic fungus *Bartalinia pondoensis*. **Folia Microbiologica**, n. 0123456789, 2022.

YAFETTO, L. Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for

bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: a review and bibliometric analysis. **Heliyon**, v. 8, n. November 2021, p. e09173, 2022.

YANG, Y. *et al.* The composition of accessory enzymes of *Penicillium chrysogenum* P33 revealed by secretome and synergistic effects with commercial cellulase on lignocellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 257, n. February, p. 54–61, 2018.

YANG, Y. *et al.* Insights into intracellular signaling network in *Fusarium* species. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 222, n. PA, p. 1007–1014, 2022.

YANKOV, D. Fermentative Lactic Acid Production From Lignocellulosic Feedstocks: From Source to Purified Product. **Frontiers in Chemistry**, v. 10, n. March, p. 1–34, 2022.

YANU, P.; JAKMUNEE, J. Down scaled Kjeldahl digestion and flow injection conductometric system for determination of protein content in some traditional northern Thai foods. **Food Chemistry**, v. 230, p. 572–577, 2017.

ZAHER, A. M. *et al.* LC-MS metabolite fingerprinting and MtSK-based screening of an endophyte *Bartalinia pondoensis* Marinc of *Citrus aurantium* L. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 970, p. 18–23, 2014.

ZANNE, A. E. *et al.* Fungal functional ecology: bringing a trait-based approach to plant-associated fungi. **Biological Reviews**, v. 95, p. 409–433, 2020.

ZANUNCIO, A. J. V. *et al.* Composição química da madeira de eucalipto com diferentes níveis de desbaste. **Ciencia Florestal**, v. 23, n. 4, p. 755–760, 2013.

ZHENG, Y. *et al.* Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 42, n. 1, p. 35–53, 2014.

ZHOU, H. *et al.* The complete mitochondrial genome of wood-rotting fungus *Xylaria hypoxylon*. **Mitochondrial DNA Part B: Resources**, v. 4, n. 2, p. 3848–3849, 2019.

ZHUO, R.; FAN, F. A comprehensive insight into the application of white rot fungi and their lignocellulolytic enzymes in the removal of organic pollutants. **Science of the Total Environment**, v. 778, p. 146132, 2021.