

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA, MATEMÁTICA E
EDUCAÇÃO

GABRIEL SCANAVACHI DE JESUS

**Bioprospecção de fungos filamentosos e leveduras para a
produção de enzimas visando obtenção de etanol de segunda
geração**

ARARAS
2023

GABRIEL SCANAVACHI DE JESUS

**Bioprospecção de fungos filamentosos e leveduras para a
produção de enzimas visando produção de etanol de segunda
geração**

Monografia apresentada no Curso de
Licenciatura em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de São Carlos para
obtenção do título de Licenciado em
Ciências biológicas

Orientação: Prof. Dr. Renato Nallin
Montagnoli

**ARARAS
2023**

Gabriel Scanavachi De Jesus

**Bioprospecção de fungos filamentosos e leveduras para a
produção de enzimas visando produção de etanol de segunda
geração**

Monografia apresentada no Curso de
Licenciatura em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de São Carlos para
obtenção do título de Licenciado em
Ciências biológicas

Orientação: Prof. Dr. Renato Nallin
Montagnolli

Data de defesa: 31/07/2023

Resultado: APROVADO

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Renato Nallin Montagnolli
Universidade Federal de São Carlos

Professor. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos,
Universidade Federal de São Carlos

Me. José Machado da Silva Neto
Universidade de São Paulo

**ARARAS
2023**

AGRADECIMENTO

Ao Prof. Dr. Renato Nallim Montagnolli, pelas oportunidades e toda orientação.

Aos meus pais, Carlos Roberto e Luciene Aparecida, pelo incansável esforço, pela dedicação, e principalmente, por todo o amor que me deram. Vou levar sempre comigo tudo o que me ensinaram e ensinam. Amo vocês.

Aos meus irmãos, Camila Scanavachi e Miguel Scanavachi, obrigado por sempre estarem comigo, torcendo de perto ou de longe.

À minha melhor amiga, companheira e namorada Grazielle Luna. Obrigado por todo o apoio, paciência, sinceridade, carinho e amor. Com você minha vida é mais bela. “Quer namorar comigo?” Amo-te.

Ao meu amigo Davi Romero, obrigado por todas as horas compartilhadas, companheirismo e esforço dedicado às nossas histórias. Estou te esperando para a próxima mesa.

Aos meus amigos, Lucas Vicentin, Brenda Fernanda, Gabriel Degressi, Gabriel Revelim, Pedro Medina, Luis Otávio, João Henrique, Gabriel Restani, Giulia Cerruti, Lara Cussolin, Júlia Zanoni, Otávio Cerruti, Nicolás Ferreira, Pedro Paliães, Rafael Alan, Rafael Franco, Alexander Orlando, Luiza Cerruti e Vinícius Zamariola, sou muito grato a todos os momentos compartilhados.

Aos meus companheiros de Universidade, Sabrina Monteiro, Luis Guilherme, Lucas Souza e Rafaela Abdalla, obrigado por todo o carinho, esses anos não teriam sido a mesma coisa sem vocês.

À toda equipe do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular, sou muito grato a todos os momentos e ensinamentos aprendidos.

À UFSCar e a todos os seus funcionários, em especial aos professores com quem tanto aprendi.

“Existem três coisas que não podem ser interrompidas: o sonho dos homens, o fluxo do tempo e a vontade herdada, enquanto as pessoas continuarem buscando o sentido da liberdade tudo isso jamais deixará de existir.”

Eiichiro Oda

RESUMO

O etanol tem se destacado como uma alternativa promissora para reduzir o impacto ambiental causado pelos combustíveis fósseis. A cana-de-açúcar, sendo a principal matéria-prima para a produção de etanol no Brasil, torna-se uma fonte de energia renovável. Neste contexto, o etanol de segunda geração surge como um avanço promissor, aproveitando de forma mais eficiente os resíduos lignocelulósicos. Portanto, a utilização de pré-tratamentos físicos, químicos ou biológicos nos resíduos, são necessários para liberar os açúcares para a produção de etanol. O tratamento biológico utilizando enzimas produzidas por fungos tem se mostrado uma abordagem eficiente e economicamente viável. Nesse contexto, o presente estudo isolou quatro linhagens de fungos filamentosos e três de leveduras do bagaço de cana-de-açúcar em decomposição e, após a etapa de seleção de linhagens, três desses fungos filamentosos isolados, juntamente com três linhagens de leveduras previamente bioprospectadas pelo grupo de pesquisa, foram empregados em testes de crescimento em meio enriquecido com bagaço de cana-de-açúcar, além de análises enzimáticas (CMCase e FPase). Os resultados obtidos revelaram condições de crescimento menos favoráveis em meio enriquecido com bagaço de cana-de-açúcar em comparação com os meios controle. No entanto, as linhagens incubadas em meio com bagaço demonstraram números positivos de produção de FPase e Endoglucanases, onde a linhagem L3 apresentou o melhor resultado analisado entre as CMCase (0,47 U/mL), e a L2 obteve o melhor resultado para a FPase (0,25 U/mL). Esses resultados indicam o potencial dessas linhagens isoladas para a produção de enzimas lignocelulolíticas a partir do bagaço de cana-de-açúcar, o que é relevante para a utilização mais eficiente dos resíduos lignocelulósicos na produção de etanol de segunda geração.

Palavras-chave: bagaço; cana-de-açúcar; lignocelulose.

ABSTRACTS

O ethanol has stood out as a promising alternative to reduce the environmental impact caused by fossil fuels. Sugarcane, being the main raw material for ethanol production in Brazil, becomes a source of renewable energy. In this context, second-generation ethanol emerges as a promising advancement, making more efficient use of lignocellulosic residues. Therefore, the use of physical, chemical, or biological pretreatments on the residues is necessary to release sugars for ethanol production. Biological treatment using enzymes produced by fungi has proven to be an efficient and economically viable approach. In this context, the present study isolated four strains of filamentous fungi and three strains of yeast from decomposing sugarcane bagasse. After the strain selection step, three of these isolated filamentous fungi, along with three yeast strains previously bio-prospected by the research group, were employed in growth tests in a medium enriched with sugarcane bagasse, along with enzymatic analyses (CMCase and FPase). The obtained results revealed less favorable growth conditions in the medium enriched with sugarcane bagasse compared to control media. However, the strains incubated in bagasse medium demonstrated positive numbers for FPase and Endoglucanase production, with strain L3 showing the best result among CMCase (0.47 U/mL), and strain L2 obtaining the best result for FPase (0.25 U/mL). These results indicate the potential of these isolated strains for lignocellulolytic enzyme production from sugarcane bagasse, which is relevant for the more efficient utilization of lignocellulosic residues in second-generation ethanol production.

Keywords: bagasse; sugarcane; lignocellulose.

FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Área de coleta das amostras | 15 |
| Figura 2 - Amontoado de bagaço de cana-de-açúcar separado para descarte..... | 16 |
| Figura 3 - Condições pluviométricas totais (mm) nos meses de dezembro de 2022 (a) e abril de 2023 (b) | 17 |
| Figura 4 - Diferença de Temperatura Máxima Média do Ar (°C) nos meses de dezembro de 2022 (a) e abril de 2023 (b) | 18 |
| Figura 5 - Fungos filamentosos selecionados (da esquerda para direita, F1, F2 e F3) | 24 |
| Figura 6 - Leveduras selecionadas (da esquerda para direita, L1, L2 e L3) | 24 |
| Figura 7 - Crescimento microbiano em meio de cultivo sólido enriquecido com bagaço de cana-de-açúcar..... | 26 |

TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Isolamento dos fungos pela data de coleta | 23 |
| Tabela 2 - Teste t de Student com intervalo de 5% de confiança | 27 |
| Tabela 3 - Atividade enzimática de CMCase e FPase em U/mL das linhagens em 72 (fungos filamentosos) e 48 (leveduras) horas de cultivo | 28 |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 | OBJETIVOS | 14 |
| 2.1 | Objetivo geral | 14 |
| 2.2 | Objetivos específicos..... | 14 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 15 |
| 3.1 | Coleta de amostras | 15 |
| 3.2 | Isolamento dos fungos bioprospectados | 18 |
| 3.3 | Conservação das cepas | 19 |
| 3.4 | Obtenção e preparação do bagaço de cana-de-açúcar | 19 |
| 3.5 | Formulação dos meios de cultivo enriquecidos com bagaço de cana-de-açúcar. | 20 |
| 3.6 | Crescimento em meio de cultivo sólido enriquecidos com bagaço de cana-de-açúcar. | 20 |
| 3.7 | Obtenção do extrato enzimático | 20 |
| 3.8 | Determinação da atividade enzimática..... | 21 |
| 3.8.1 | Atividade em papel de filtro (FPase) | 21 |
| 3.8.2 | Endoglucanase (CMCase) | 22 |
| 3.9 | Análise estatística..... | 22 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 23 |
| 4.1 | Isolamento e seleção dos fungos e leveduras..... | 23 |
| 4.2 | Crescimento em meio de cultivo enriquecido com bagaço..... | 25 |
| 4.3 | Análise enzimática..... | 28 |
| 5 | CONCLUSÕES | 30 |
| | REFERÊNCIAS..... | 32 |
| | ANEXO A – Gráfico da curva padrão de glicose..... | 36 |

1 INTRODUÇÃO

O etanol tem se destacado no contexto energético global como um potencial solução para mitigar o impacto ambiental provocado pela gasolina, graças à sua capacidade de reduzir as emissões de carbono em comparação com outros combustíveis fósseis (RIBEIRO e SCHIRMER 2017). Uma vez que, o etanol é uma fonte de energia renovável, com a cana-de-açúcar sendo sua principal matéria-prima para produção desse combustível (GIMENEZ *et al.*, 2018).

Com o avanço dos estudos nessa área, buscou-se aperfeiçoar a tecnologia do etanol no Brasil, com o intuito de aumentar a produtividade agrícola, reduzir o tempo dos processos fermentativos e elevar a produção anual de etanol. No entanto, ainda são enfrentados desafios significativos relacionados ao etanol de segunda geração, sendo este uma tecnologia notória no sentido energético e ambiental. Há questões relevantes referentes aos pré-tratamentos da matéria-prima, aos processos envolvidos na obtenção de açúcares fermentescíveis, à conversão desses açúcares em etanol e ao aprimoramento dos processos de produção, bem como à utilização de novas enzimas (SANTOS, 2016).

Enquanto o etanol de primeira geração utiliza apenas um terço da cana-de-açúcar nos processos de produção, no etanol de segunda geração, por meio da hidrólise enzimática microbiana, é possível utilizar os resíduos compostos por lignocelulose da planta, representando dois terços da mesma. Resultando em um aumento de 40% na produção de energia em comparação com a geração anterior, utilizando a mesma quantidade de matéria-prima (SANTOS *et al.*, 2012).

De acordo com Castro e Pereira Jr (2010), com base nos dados do Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA (2009), em 2007, foram geradas aproximadamente 147 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar, e a soma de todos os resíduos lignocelulósicos resultou em 606 toneladas apenas no Brasil. Muitas vezes este resíduo é utilizado como fonte de energia elétrica para as indústrias por meio da combustão, gerando por fim, mais impacto ambiental (UNIFESP, 2023). Esses resíduos são compostos principalmente por lignina, celulose e hemicelulose, que estão interligados em uma estrutura complexa de ligações covalentes e não covalentes, o que dificulta sua quebra (JEFFRIES, 1991).

Para superar essa dificuldade, são empregados pré-tratamentos físicos, químicos, biológicos ou combinações entre eles para aumentar a eficiência da

hidrólise enzimática dos compostos lignocelulósicos, com o objetivo de obter açúcares fermentáveis necessários para a produção de etanol de segunda geração. Dentre esses métodos, todos eles apresentam melhorias específicas no tratamento dos materiais lignocelulósicos (RABELO, 2007). No entanto, o tratamento biológico usando enzimas derivadas de microrganismos tem se mostrado eficiente, pois é um processo economicamente viável e o Brasil possui uma variedade de substratos disponíveis, incluindo não apenas o bagaço da cana-de-açúcar, mas também palhas, cascas e outros resíduos orgânicos ricos em celulose (ROSA, 2014).

Para o tratamento desses materiais vegetais, fungos filamentosos, leveduras e bactérias conseguem liberar enzimas celulases e xilanases, essas capazes de degradar a lignocelulose (FLORENCIO, BADINO e FARINAS, 2017). Essas enzimas, sendo compostas principalmente por endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases, atuam em conjunto na hidrólise do polímero presente nos materiais vegetais (LYND e ZHANG, 2002).

As endoglucanases, também chamadas de carboximetilcelulases (CMCases) são enzimas que iniciam a hidrólise da molécula de celulose. Atuam atacando as regiões menos cristalinas das cadeias celulósicas, reduzindo o grau de polimerização e fragmentando a celulose em oligossacarídeos. As novas extremidades geradas pelas endoglucanases são cruciais para a atuação das exoglucanases, permitindo a degradação da celulose em unidades menores (CASTRO E PEREIRA JR, 2010).

Diferentemente das endoglucanases, as exoglucanases possuem a capacidade de atuar sobre as áreas cristalinas nas moléculas de celulose, por meio de áreas redutoras e não redutoras (INFANZÓN-RODRÍGUEZ *et al.*, 2023). Por outro lado, as β -glicosidases, necessitam do auxílio das enzimas anteriores para atuarem nas regiões cristalinas da celulose, no entanto, elas são responsáveis pela hidrólise da celobiose e de oligossacarídeos (FLORINDO *et al.*, 2018).

O estudo de microrganismos produtores de enzimas degradadoras de lignocelulose, pode ser uma estratégia de grande relevância para a otimização do etanol de segunda geração. Dessa forma, estudos de bioprospecção podem potencializar a indústria biotecnológica, principalmente quando colocado em perspectiva o vasto território do Brasil. Segundo Lewinsohn e Prado (2005), especula-se que o Brasil possui um número sete vezes maior de espécies ainda não descobertas quando comparado com as que já foram catalogadas, o que impulsiona a busca por inovações, especialmente na indústria da biotecnologia.

Além do cenário de bioprospecção, que visa a descoberta de novos microrganismos com potencial industrial, é necessário realizar mais estudos para avaliar a otimização do processo de produção enzimática. Segundo Hansen *et al.* (2015), é importante comparar as produções de enzimas em substratos distintos, uma vez que cada microrganismo possui melhores condições de produção, as quais ainda não são completamente compreendidas. Portanto, é evidente que a padronização dos meios de cultivo e das metodologias utilizadas em cada método de produção enzimática requer mais investigação (HANSEN *et al.*, 2015).

Portanto, neste trabalho, foram bioprospectados microrganismos no bagaço de cana-de-açúcar na região da UFSCar, Araras - São Paulo. Após a purificação das cepas, realizou-se testes para averiguar os microrganismos coletados, junto de outros já existentes no estoque do grupo de pesquisa em Bioenergia, Biorremediação e Biodegradação (Gr3B), prosseguindo-se com ensaios visando apurar o crescimento em meio de cultivo enriquecido com bagaço de cana-de-açúcar e a sua produção enzimática neste meio.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Bioprospectar fungos filamentosos e leveduras produtores de enzimas capazes de degradarem a lignocelulose.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar e selecionar linhagens bioprospectadas no bagaço de cana-de-açúcar.
- Avaliar o crescimento de fungos pela incorporação do bagaço de cana-de-açúcar no meio de cultivo.
- Quantificar a produtividade de FPases e Endoglucanases (CMcase), através da análise de atividade enzimática.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção são apresentados os procedimentos realizados neste estudo.

3.1 Coleta de amostras

Foram coletadas amostras com potencial de conter microrganismos degradadores de lignocelulose no campus da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), localizado em Araras, São Paulo (22°18'53.23"S 47°22'56.72"O), como mostra o marcador com a localização na Figura 1. As coletas ocorreram durante os meses de dezembro de 2022 (período chuvoso) e abril de 2023 (período de estiagem).

Figura 1 - Área de coleta das amostras



Fonte: *Google Earth*, 2023.

As coletas foram realizadas em amontoados de bagaço de cana-de-açúcar em decomposição, que já estavam separados para descarte, ficando expostos aos efeitos climáticos, embora tenham uma certa proteção proporcionada pelo prédio adjacente, como demonstrado na Figura 2, onde é fotografado o local de coleta em um dia chuvoso. A duração exata em que as amostras permaneceram nesse local de descarte varia, e não tem-se especificamente estes dados para análise. No entanto,

foi constatado que o bagaço permaneceu nesse local por quase um mês em ocasiões consecutivas.

Figura 2 - Amontoado de bagaço de cana-de-açúcar separado para descarte

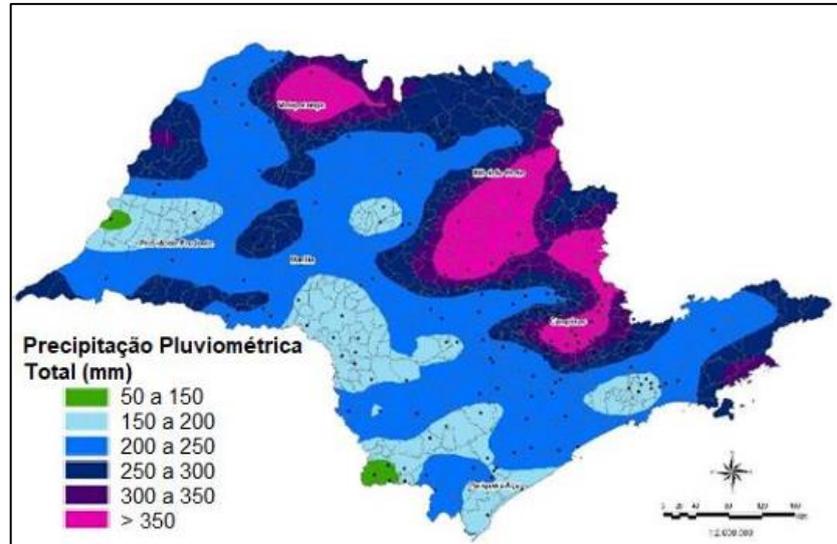


Fonte: Autoria própria, 2023.

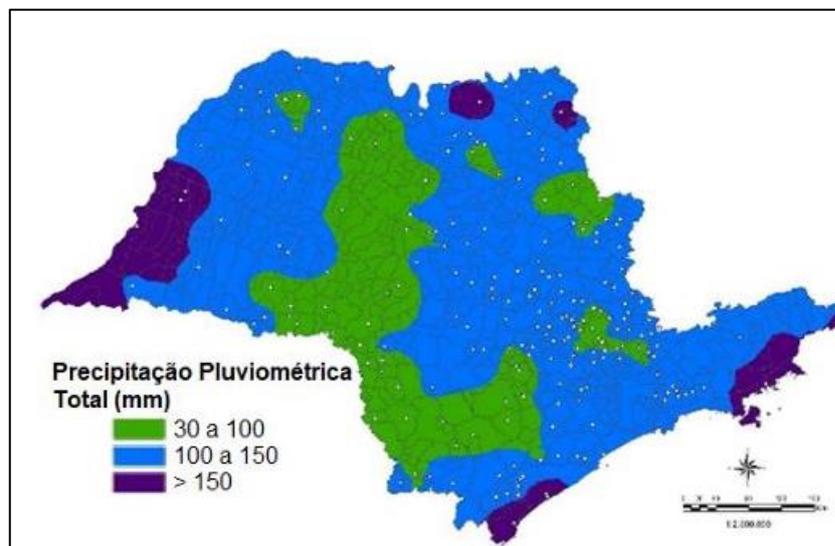
O bagaço em questão é colhido tanto no território da Universidade de São Carlos, campus Araras, como também tem sua origem de todo o território de São Paulo. Dessa forma, Foi levado em consideração os dados climáticos do território de São Paulo, mas a discussão foram pautadas somente na região de Araras, levando em consideração a exposição do amontoado de bagaço de cana-de-açúcar que deu origem aos biológicos coletados.

Os dados climáticos destes meses foram avaliados com base nas informações fornecidas pelo Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO, 2022 e 2023), conforme apresentado nas Figuras 3 e 4. Esses dados levantados são de extrema relevância, pois permitem traçar padrões e diferenças entre os meses em que as coletas foram realizadas. Conseqüentemente, contribuindo na formulação de discussões mais profundas sobre os fungos coletados e suas relações com as características ambientais.

Figura 3 - Condições pluviométricas totais (mm) nos meses de dezembro de 2022 (a) e abril de 2023 (b)



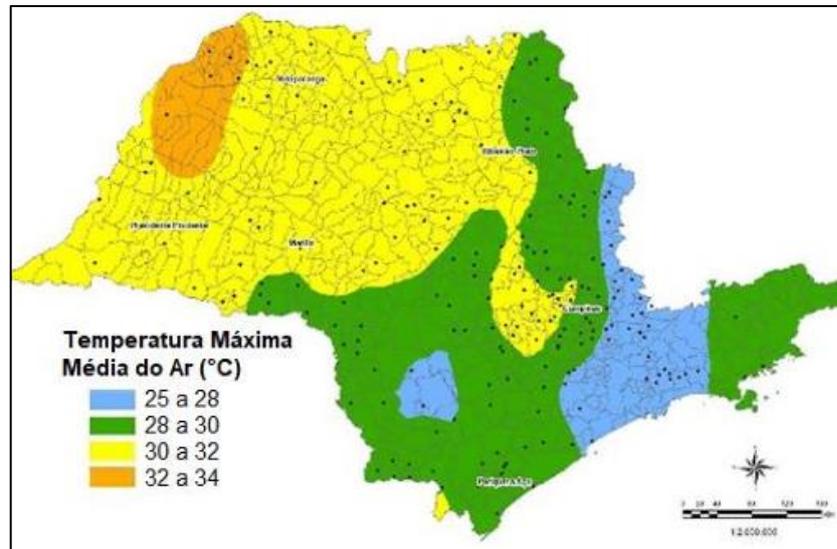
(a)



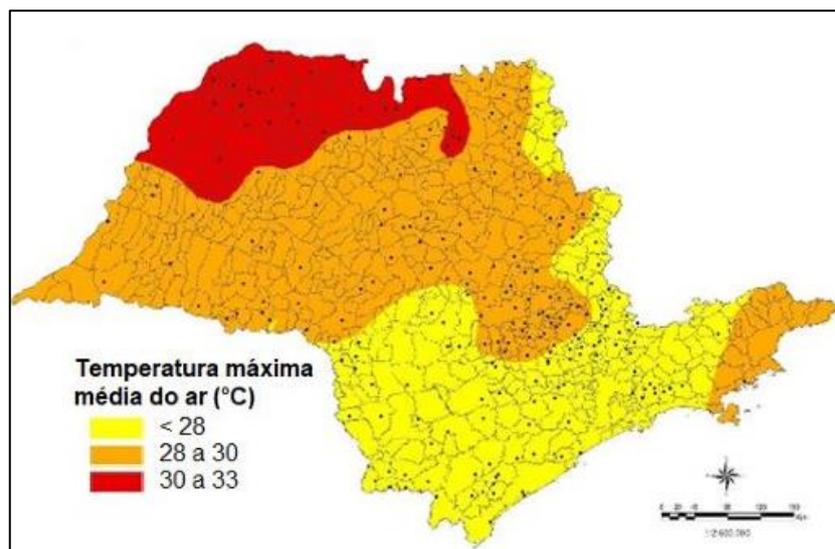
(b)

Fonte: CIAGRO (2022; 2023).

Figura 4 - Diferença de Temperatura Máxima Média do Ar (°C) nos meses de dezembro de 2022 (a) e abril de 2023 (b)



(a)



(b)

Fonte: CIIAGRO (2022; 2023).

3.2 Isolamento dos fungos bioprospectados

Após a coleta das amostras, o pré-cultivo teve início com a seleção e apuramento do material coletado no laboratório de microbiologia, onde raspagens manuais utilizando-se de espátulas de laboratório foram executadas nas amostras visando a obtenção do material biológico. A partir desta preparação inicial, ocorreu uma suspensão de 10,0 mL de material raspado em 225,0 mL de água destilada, deixando de repouso pela duração de 24 horas em temperatura ambiente (GOMES,

2007). Prosseguindo de uma transferência de 0,5 mL de potenciais inóculos para os frascos Erlenmeyer de 100,0 mL, juntamente com 20,0 mL de meio nutriente caldo dextrose batata, ocorrendo a vedação com rolhas de algodão e armazenando-as em estufa a 30°C, sob agitação de 100 rpm, por 48 horas. Em seguida, 0,1 mL será transferido com o auxílio de uma pipeta para o centro de uma placa de Petri contendo meio nutriente de ágar dextrose batata (BDA), finalizando com a incubação 30°C por 96 horas (ROSA, 2014). Este procedimento prosseguiu com a técnica de esgotamento *spread plate* em diluição de até 10^{-6} . Tal procedimento foi realizado até a obtenção de culturas puras, armazenando no estoque de microrganismos do Grupo de Pesquisa de Bioenergia, Biorremediação e Biodegradação (Gr3B).

3.3 Conservação das cepas

Segundo Costa, Mota e Cardoso (2020), a conservação por água destilada estéril demonstrou-se como o melhor método dentre os analisados (conservação por água destilada estéril; conservação com óleo mineral estéril; conservação a partir de repiques contínuos em Ágar Sabouraud e Ágar Mycosel), devido ao baixo custo, facilidade de manutenção, baixa necessidade de espaço para estocagem e ausência de contaminantes. Neste contexto, foi transferido 1,0 mL de água destilada para cada um dos microtúbulos esterilizados, em seguida, foram transferidos 0,5 por 0,5 mm² de amostras de ágar dextrose batata inoculados com material biológico após 96 horas de crescimento a 30°C, sendo por fim, armazenados na geladeira em temperaturas médias de 2°C (podendo diferir em $2\pm 1^\circ\text{C}$). Foram realizados repiques e manutenções a cada 150 dias.

3.4 Obtenção e preparação do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço/ utilizado para coleta de amostras dos inóculos em potencial diferiu do bagaço de cana-de-açúcar utilizado nos experimentos laboratoriais. Para garantir a padronização dos flocos, obteve-se o bagaço por meio de uma doação do “Recanto da Garapa” localizado no Parque das Árvores, em Araras – SP. Em seguida, o bagaço passou por um processo de preparação que incluiu lavagem, secagem a 80°C por quatro dias e moagem em moinho de facas. Desta forma, visou obter uma granulometria uniforme (0,595 mm), facilitando a manipulação e distribuição nos meios de cultivo. Em seguida, o bagaço moído foi armazenado em sacos plásticos e estocado no freezer do laboratório para preservar sua integridade até o momento de

utilização nos experimentos.

3.5 Formulação dos meios de cultivo enriquecidos com bagaço de cana-de-açúcar

Para o meio sólido, o meio nutritivo enriquecido foi preparado com as seguintes proporções: 2,4 g de ágar dextrose batata (BDA), 10,69 g de bagaço e 4,0 g de ágar (o dobro da quantidade indicada para uma preparação padrão de ágar dextrose batata) para 150,0 mL de água destilada. Essa proporção foi obtida a partir de testes experimentais, nos quais foram testadas diferentes quantidades de bagaço. Inicialmente, utilizou-se 10,0% de bagaço em relação ao volume de água destilada, porém, foi necessário adicionar uma proporção maior de água (50,0 mL) para alcançar a consistência adequada do meio.

Quanto aos meios líquidos, eles foram preparados em Erlenmeyer de 125,0 mL, onde ocorreu a inoculação das cepas. O meio nutritivo foi formulado com as seguintes proporções: 50,0 mL de água destilada, 0,6 g de caldo dextrose batata e 5,0 g de bagaço.

3.6 Crescimento em meio de cultivo sólido enriquecidos com bagaço de cana-de-açúcar

Foram conduzidos experimentos em triplicata para avaliar a taxa de crescimento dos microrganismos selecionados em meio de cultivo sólido enriquecido com bagaço de cana-de-açúcar. Para os fungos filamentosos, o tamanho do inóculo foi padronizado em 1 cm, enquanto para as leveduras, o mesmo número de linhas de esgotamento foi utilizado em todas as repetições.

As coletas de dados foram realizadas a cada 12 horas ao longo de dois dias. Posteriormente, a área ocupada pelos microrganismos foi analisada no *software* "ImageJ". Esse *software* foi responsável por calcular a área das colônias que ocupavam as placas de Petri (100x15mm), diferenciando a área das colônias do fundo em termos percentuais.

3.7 Obtenção do extrato enzimático

Nos experimentos piloto, estabeleceram-se os tempos ideais para a coleta de amostras, com base no crescimento das colônias. Verificou-se que 48 horas foram adequadas para as leveduras, enquanto 72 horas foram necessárias para os fungos filamentosos alcançarem o estágio ideal de crescimento.

O processo de cultivo começou com a inoculação dos fungos filamentosos e das leveduras nos meios de cultivo enriquecidos com bagaço, bem como nos meios de controle. Os cultivos foram mantidos a uma temperatura de 30°C, com agitação a 140 rpm. Após o período de crescimento de 48 horas para as leveduras e 72 horas para os fungos filamentosos, coletaram-se 15,0 mL de amostras dos meios de cultura.

Para separar o bagaço e o material biológico do restante do meio, foram coadas 15,0 mL das amostras, utilizando papel filtro qualitativo Unifil (11 cm de diâmetro; 80,0 g/m² de gramatura), e o filtrado foi armazenado em tubos Falcon de 50,0 mL. Em seguida, os tubos foram submetidos à centrifuga e centrifugados por 15 minutos a uma velocidade de 8800 rpm a 5°C. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e utilizado como extrato enzimático para as análises enzimáticas, seguindo o método descrito por Rosa (2014).

3.8 Determinação da atividade enzimática

A metodologia empregada para determinar as atividades enzimáticas foi adaptada de Rosa (2014), já as quantificações dos açúcares redutores liberados, seguiu-se o protocolo de Miller (1959) em leituras de 540,0 nm no espectrofotômetro, seguindo-se de procedimentos a partir da curva padrão de glicose (ANEXO A). Desta forma, os experimentos foram executados em triplicata, analisando a atividade enzimática em dois dias de cultivo para as leveduras e em três dias de cultivo para os fungos filamentosos.

3.8.1 Atividade em papel de filtro (FPase)

Segundo Rosa (2014) a medição da atividade de FPase foi realizada utilizando uma reação composta pelos seguintes componentes: 0,9 mL de tampão acetato 0,1 M, pH 5,0, uma fita de papel filtro de 1,0 cm x 6,0 cm e 0,1 mL de solução enzimática. A reação ocorreu a 55°C, sob agitação de 150 rpm.

Após 60 minutos de reação, a reação foi interrompida por meio de um banho de gelo. Em seguida, foi realizada a quantificação dos açúcares redutores liberados a partir da adição do reagente ADNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico). Para determinar uma unidade de atividade enzimática, foi feita uma comparação direta da quantidade enzimática necessária para liberar 1,0 µmol de açúcar redutor por minuto a partir de uma curva padrão de glicose.

3.8.2 Endoglucanase (CMCase)

A medição da atividade de endoglucanase (CMCase) foi determinada utilizando uma reação composta por 0,1 mL da solução enzimática e 0,9 mL da solução substrato carboximetilcelulose (40,0 g/L) em um tampão acetato 0,10 M, pH 5,0. A reação foi mantida a uma temperatura de 55°C por 10 minutos (ROSA, 2014).

Após os 10 minutos de reação, a reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL do reagente ADNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico), e os açúcares redutores liberados foram quantificados. Para determinar uma unidade de atividade enzimática, foi feita uma comparação direta da quantidade enzimática necessária para liberar 1,0 μmol de glicose por minuto em uma leitura a 540 nm, a partir de uma curva padrão de glicose.

3.9 Análise estatística

Testes t de *Student* foram empregados nos dados coletados da análise de crescimento em meio de cultivo enriquecido após as análises utilizando o *software* "ImageJ". Possibilitando dessa forma averiguar a diferença estatística entre os meios controle e os que foram enriquecidos com bagaço de cana-de-açúcar.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção são apresentados os resultados e discussões realizadas neste estudo.

4.1 Isolamento e seleção dos fungos e leveduras

No total, foram realizadas quatro coletas, resultando no isolamento de quatro fungos filamentosos e três leveduras (total de linhagens encontradas), conforme Tabela 1.

Tabela 1 - Isolamento dos fungos pela data de coleta

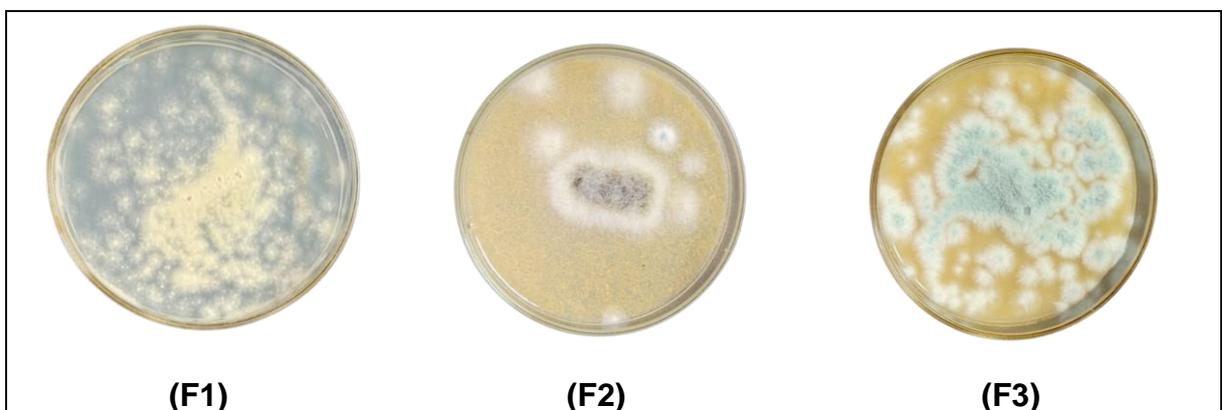
| Isolado | Data de coleta |
|----------------|-----------------------|
| F1 | 01/12/2022 |
| M1 | 01/12/2022 |
| F2 | 02/12/2022 |
| F3 | 02/12/2022 |
| F4 | 13/04/2023 |
| M2 | 14/04/2023 |
| M3 | 14/04/2023 |

Sendo os "F" fungos filamentosos e os "M", leveduras encontradas nesta busca, todos foram adicionados ao estoque do Gr3B, fornecendo material biológico para esta pesquisa e futuros estudos e experimentos. Em sua pesquisa, Rosa (2014) isolou 32 linhagens de fungos a partir de nove coletas em amostras de compostagem, bagaço de cana, materiais em decomposição, amostras de solo, favo de mel, restos de ração e gordura animal, obtendo um número médio entorno de seis (6,4) isolados por substrato. Da mesma forma, Bortolazzo (2011) isolou fungos a partir de amostras industriais de cana-de-açúcar, resultando em 14 linhagens isoladas com potencial lignocelulolíticas. Demonstrando dessa forma que os padrões de número de coletados foram semelhantes aos encontrados neste estudo (sete isolados coletados utilizando somente uma fonte de coleta).

A escolha dos microrganismos foi fundamentada na adaptação aos testes piloto em meios enriquecidos com bagaço de cana-de-açúcar. Essa abordagem resultou na

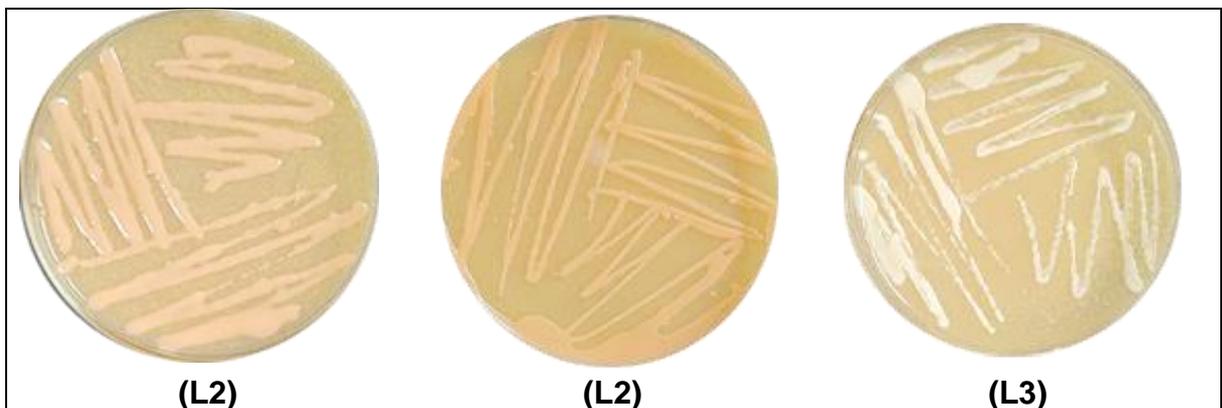
seleção de três fungos filamentosos isolados neste trabalho: F1, F2 e F3, conforme Figura 5. Além desses fungos filamentosos, foram utilizadas três linhagens de leveduras (L1, L2 e L3), Figura 6, coletadas do solo de plantações de cana-de-açúcar no campus da UFSCar, Araras, SP. Essas cepas já estavam presentes no estoque do Gr3B em estado de colônias em cultura pura, além de terem apresentado resultados positivos em relação ao crescimento em meio enriquecido com bagaço nos testes piloto.

Figura 5 - Fungos filamentosos selecionados (da esquerda para direita, F1, F2 e F3)



Fonte: Autoria própria, 2023.

Figura 6 - Leveduras selecionadas (da esquerda para direita, L1, L2 e L3)



Fonte: Autoria própria, 2023.

Dessa forma, no decorrer do estudo utilizou-se a nomenclatura das linhagens como ilustrados pelas Figuras 5 e 6. Ao empregar as linhagens ao crescimento enriquecido com bagaço, utilizou-se das nomenclaturas já determinadas quando utilizado o meio controle, já as linhagens crescidas no meio enriquecido apenas adicionou-se “- b” para facilidade de visualização.

Os dados de coleta foram apurados, utilizando informações do Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO 2022; 2023), o que possibilitou levantar informações sobre as condições pluviométricas e de temperaturas do estado de São Paulo nos períodos correspondentes às coletas.

Durante esses meses, observou-se uma grande diferença na precipitação pluviométrica total (mm), com um índice superior a "350" em dezembro de 2022, enquanto na região de Araras, onde os experimentos foram realizados, os valores variaram de "30 a 100".

Essa variação climática nas coletas realizadas em diferentes épocas foi notável. No entanto, ao contrário da precipitação pluviométrica, a temperatura máxima média do ar não apresentou diferenças significativas, mantendo-se dentro da faixa de 28 a 30°C.

A pluviometria total é crucial para avaliar a disponibilidade de água no ambiente, influenciando diretamente o crescimento e a reprodução dos fungos, bem como sua diversidade e abundância. Por outro lado, a diferença de temperatura máxima e média do ar pode impactar o metabolismo e o desenvolvimento dos fungos, afetando seus ciclos de vida e comportamento (GOULART, 2005).

A temperatura, pH e disponibilidade de água exercem influência na proliferação de microrganismos, afetando seu crescimento e reprodução. Conforme observado por Rosa (2014), às metodologias empregadas na bioprospecção de microrganismos variam de acordo com os diferentes nichos onde se busca identificá-los, o que muitas vezes resulta na falta de detalhes específicos para cada tipo de microrganismo e suas particularidades encontradas na literatura. Maheshwari, Bharadwaj e Bhat (2000) demonstram a suscetibilidade de crescimento dos fungos em diferentes temperaturas, desde 20°C até temperaturas mais elevadas.

Ao avaliar o impacto climático sobre as coletas, não foi observado um efeito significativo nos microrganismos coletados. O número de fungos filamentosos prospectados (quatro) foi próximo ao número de leveduras (três), diferindo apenas por uma estirpe adicional de fungo filamentoso em relação às leveduras.

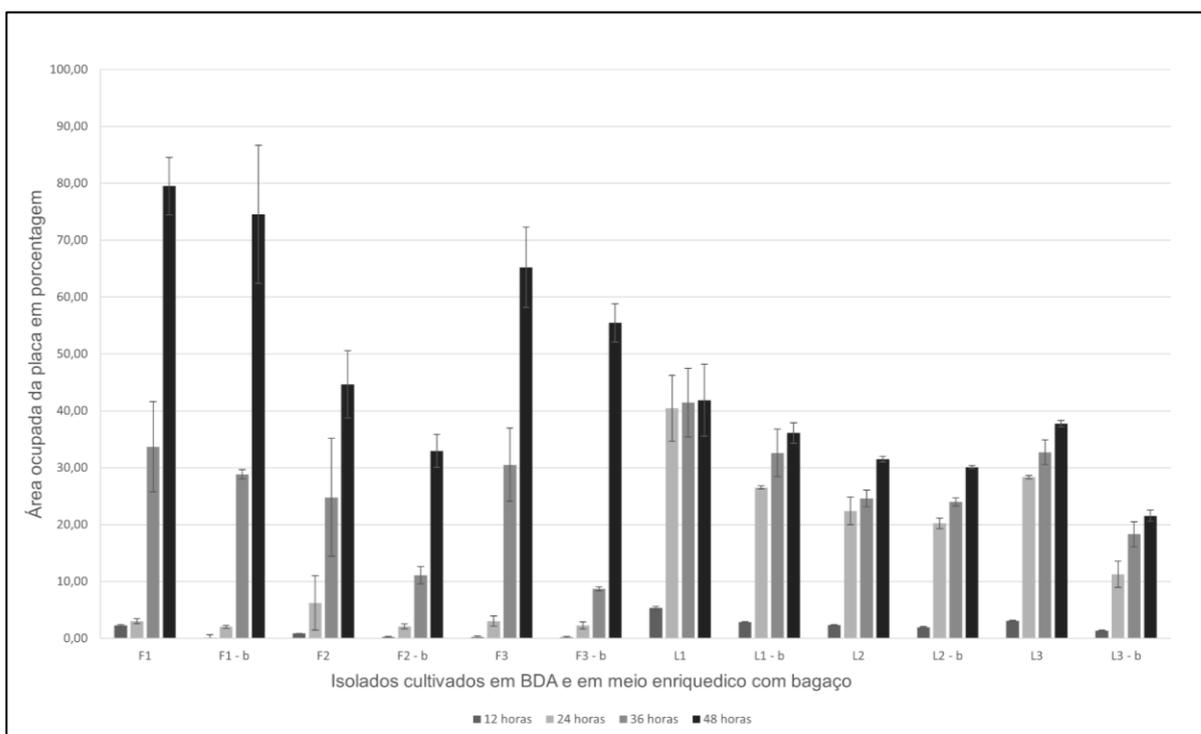
4.2 Crescimento em meio de cultivo enriquecido com bagaço

Todas as seis linhagens cresceram nos meios enriquecidos com bagaço de cana-de-açúcar, exibindo as fases de germinação, crescimento e esporulação em nível macroscópico em até 48 horas de cultivo.

Todos os fungos filamentosos apresentaram um crescimento gradual nas primeiras 24 horas, demonstrando taxas mais elevadas quando observado o intervalo entre 36 e 48 horas. Já as leveduras demonstraram um crescimento mais rápido em comparação com os fungos filamentosos, atingindo taxas próximas de seus respectivos tamanhos máximos entre 24 e 36 horas.

Em todos os casos, as médias das linhagens crescidas em meio controle demonstraram áreas maiores ocupadas em placas do que quando crescidas em meio enriquecido com bagaço de cana-de-açúcar; como demonstrado na Figura 7.

Figura 7 - Crescimento microbiano em meio de cultivo sólido enriquecido com bagaço de cana-de-açúcar



Fonte: Autoria própria (2023).

A análise dos dados foi realizada utilizando o teste t de *Student*, como demonstrado na Tabela 2, onde são comparadas as médias de crescimento de cada linhagem em meio de cultivo controle com as crescidas em meio enriquecido com bagaço de cana-de-açúcar, considerando o período de 48 horas. Esse teste estatístico é comumente utilizado para comparar duas médias e verificar se existe uma diferença significativa entre elas. Nesse contexto, ele foi aplicado para determinar se o meio enriquecido com bagaço de cana-de-açúcar teve um efeito significativo no crescimento das linhagens em relação ao meio de cultivo controle.

Tabela 2 - Teste t de *Student* com intervalo de 5% de confiança

| Isolado | Valor teste f | Valor teste t |
|----------------|----------------------|----------------------|
| F1 | 0,279438494 | 0,2820499 |
| F2 | 0,380339313 | 0,017716987 |
| F3 | 0,135336884 | 0,104774021 |
| L1 | 0,574609445 | 0,027928252 |
| L2 | 0,615384615 | 0,009536233 |
| L3 | 0,433839479 | 0,000006366 |

Todas as comparações demonstraram a característica de variância supostamente iguais perante os testes f empregados, devido os valores maiores do que 0,05. Dessa forma, após a mensuração dos dados e validação dos valores inferiores ou superiores a 0,05, apenas as linhagens F1 e F3 não demonstraram ter diferença estatística significativa (superior a 0,05) entre os dois meios de cultivo. As demais linhagens, cresceram de forma otimizada nos meios controle, quando comparados com os meios enriquecidos com bagaço de cana-de-açúcar. É relatado na literatura a utilização de pré-tratamentos químicos no material lignocelulósico visando facilitar o acesso das enzimas (CABRAL *et al.*, 2017; PASSARINHO, 2018), dessa forma, liberando com maior facilidade os açúcares fermentáveis. Entretanto, neste trabalho não foram utilizadas tais metodologias, podendo ter resultado em dificuldade para as linhagens em ter um acesso completo ao bagaço inserido no meio de cultivo.

Foi observado que a diminuição da concentração de dextrose nos meios enriquecidos com bagaço, cuja formulação foi de metade de caldo dextrose batata e a adição do bagaço de cana-de-açúcar, influenciou na diminuição nos crescimentos de todas as linhagens. Essa correlação entre suplementação do meio de cultura foi constatada por Donini *et al.* (2005), em que *Pleurotus. ssp* cultivadas *in vitro* tiveram sua massa micelial aumentada quando suplementações similares (capim elefante, palha de soja, cana-de-açúcar, sabugo de milho) foram aplicadas com dextrose. Entretanto, esses autores mantiveram as formulações originais dos meios de cultura

junto da suplementação com materiais lignocelulósicos, diferentemente do presente estudo, onde visou-se avaliar o bagaço-de-cana como fonte de carbono.

4.3 Análise enzimática

Os três fungos filamentosos foram cultivados por três dias, enquanto as leveduras foram cultivadas por dois dias, utilizando a taxa de crescimento diária mencionada na seção 4.2. Durante o cultivo dos isolados em meios líquidos, foi adicionado 5% de bagaço de cana-de-açúcar para obter o extrato enzimático de cada linhagem quando expostos a este substrato. Essa adição favoreceu a produção de enzimas lignocelulolíticas, como descrito por Pandey *et al.* (2000), o bagaço de cana-de-açúcar é composto por aproximadamente 50% de celulose, enquanto a metade restante é composta por hemicelulose e lignina, além de uma pequena parcela de cinzas, correspondendo a cerca de 2,4% da composição total.

Os resultados enzimáticos obtidos em cada meio de cultivo estão apresentados na Tabela 3. A unidade de produção da atividade enzimática (U) foi descrita como a quantidade de produção de enzimas em μmol por minuto liberado, e os dados são apresentados em U/g de substrato bruto.

As leituras demonstraram as melhores produções de endoglucanases (CMCase) sendo representadas pelas linhagens **L3 - b** (8,46 U/g), **F3 - b** (5,76 U/g) e **L1 - b** (5,58 U/g). Já no caso da FPase, a linhagem **L2 - b** (4,5 U/mL), seguida pelas linhagens **F3 - b** (3,24 U/mL) e **L3 - b** (3,24 U/mL).

Tabela 3 - Atividade enzimática de CMCase e FPase em U/mL das linhagens em 72 (fungos filamentosos) e 48 (leveduras) horas de cultivo

| Isolados | CMCase | FPase |
|---------------|-----------|-----------|
| F1 | ND | ND |
| F1 - b | 3,42 | 1,98 |
| F2 | ND | ND |
| F2 - b | 2,34 | 0,9 |
| F3 | 0,9 | ND |
| F3 - b | 5,76 | 3,24 |
| L1 | ND | 0,72 |
| L1 - b | 5,58 | 2,34 |

| Isolados | CMCase | FPase |
|-----------------|---------------|--------------|
| L2 | 0,36 | 0,54 |
| L2 - b | 3,78 | 4,5 |
| L3 | 0,32 | 0,54 |
| L3 - b | 8,46 | 3,24 |

Rosa (2014) relatou produções de 97,7 U/g em fermentação em estado sólido, em 336 horas de fermentação, utilizando farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e palha de milho, em proporções de 1:1:1. Números exponencialmente maiores dos que foram observados neste estudo.

Dos Santos *et al* (2011a) relataram números crescentes de produção de atividade enzimática em U/mL quando observada a produção entre os dias, correlacionando também a disponibilidade de água na fermentação submersa. Concluíram que as melhores condições para a linhagem de *Rhizopus sp.* apresentam seus melhores índices de produção de CMCase em 96 horas com um nível de 90,0% de água (5,070 U/g). Enquanto, para a FPase, os melhores resultados foram observados em 72 horas com uma quantidade de 95,0% de teor de água (8,211 U/g). Os resultados desse estudo foram observados em tempos de cultivo inferiores aos descritos por eles (DOS SANTOS *et al.*, 2011b).

El-Naggar *et al.* (2014) relataram que o rendimento máximo de endoglucanase foi obtido com 1,0% de bagaço de cana-de-açúcar, sugerindo que a concentração ideal para a produção enzimática de *Streptomyces albogriseolus* foi observada com 1,0% de concentração, obtendo resultados piores gradualmente conforme o aumento de concentração de bagaço-de-cana no meio. No entanto, nesta pesquisa, testou-se uma concentração de 5,0% de bagaço nos meios indutores de produção enzimática.

HANSEN *et al.* (2015) relataram a diferença de liberação enzimática quando submetidas linhagens a diferentes substratos, enfatizando a importância da apuração de melhores condições de cultivo visando a produção enzimática.

Dessa forma, a concentração de bagaço no meio, juntamente com a ausência de dextrose, pode apresentar relevância notória para o crescimento e produção enzimática de endoglucanases e FPases, como demonstrado em demais estudos.

5 CONCLUSÕES

No presente estudo, a bioprospecção de fungos filamentosos e levedura no bagaço de cana-de-açúcar mostrou-se promissora com as novas linhagens obtidas, as quais foram adicionadas ao estoque do grupo de pesquisa. Embora os meios enriquecidos com bagaço não tenham favorecido o maior crescimento das colônias em placa quando comparados aos meios controle, os experimentos de análise enzimática demonstraram o melhor desempenho das linhagens em meio de cultivo enriquecido.

O isolado L3 destacou-se especialmente, apresentando a maior liberação de glicose por minuto na produção de endoglucanases (8,46 U/g). Já para os testes de FPase, o isolado L2 mostrou o melhor desempenho (4,5 U/mL). Embora esses resultados sejam inferiores aos valores relatados na literatura quando comparado cultivos em fermentação em estado sólido, quando comparados com cultivo submerso foi possível relatar dados semelhantes, mesmo quando cultivados em menores tempos de incubação e valores reduzidos de dextrose, características relevantes conforme demonstrado na literatura. Dessa forma, o potencial desses isolados para futuras aplicações biotecnológicas na degradação de biomassa lignocelulósica não deve ser subestimado, especialmente após mais estudos de otimização serem realizados.

Sendo assim, é essencial a realização de estudos adicionais para aprimorar a compreensão dos mecanismos envolvidos na produção enzimática e nas interações entre os microrganismos e o bagaço de cana-de-açúcar. Recomenda-se também explorar outras condições de cultivo, otimizando-se os parâmetros de cultivo quando posto materiais compostos por lignocelulose para enriquecer o substrato, gerando como consequência o aumento da liberação enzimática.

Os resultados deste estudo contribuem para o conhecimento sobre a utilização de resíduos agroindustriais, como o bagaço de cana-de-açúcar, como fonte de carbono para a produção de enzimas lignocelulíticas. Essas enzimas têm um grande potencial em diversas aplicações industriais, como na produção de biocombustíveis, na indústria alimentícia e na biorremediação ambiental.

Em conclusão, as linhagens prospectadas em materiais lignocelulósicos demonstraram interação positiva com os meios enriquecidos com bagaço de cana-de-açúcar, evidenciando leituras positivas para FPase e CMCase. Esses resultados

indicam um potencial biotecnológico promissor na produção de etanol de segunda geração, através de futuros estudos com as linhagens isoladas, que demonstraram a capacidade de excretar enzimas degradadoras de resíduos agroindustriais sob as condições testadas. Estudos posteriores, otimizando as condições de cultivo e indução enzimática, poderiam se beneficiar dos dados encontrados nesta pesquisa, aprimorando as condições de busca, crescimento fúngico e indução enzimática ao utilizar o bagaço de cana-de-açúcar como promotor dessas características.

REFERÊNCIAS

- BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- CABRAL, M. M. S.; ABUD, A. K. de S.; ROCHA, M. S. R dos S.; ALMEIDA, R. M. R. G.; GOMES, M. A. Composição da fibra da casca de coco verde in natura e após pré-tratamentos químicos. **Engevista**, v. 19, n. 1, p. 99-108, 2017.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.
- CIIAGRO. Análise das condições hidrometeorológicas no mês de dezembro de 2022 no estado de São Paulo – Brasil. 2022. Disponível em:
http://www.ciiagro.org.br/pdfs/Analise_hidrometeorologica-Dezembro_22.pdf
- CIIAGRO. Análise das condições hidrometeorológicas no mês de abril de 2023 no estado de São Paulo – Brasil. 2023. Disponível em:
http://www.ciiagro.org.br/pdfs/Analise_hidrometeorologica-Abril_23.pdf
- COSTA, L. D. P; MOTA, M. E. B.; CARDOSO, A. M. Experimentação de diferentes métodos para conservação de coletâneas fúngicas. **REVISTA BRASILEIRA MILITAR DE CIÊNCIAS**, v. 6, n. 16, 2020.
- DONINI, L. P.; BERNARDI, E.; MINOTTO, DO NASCIMENTO, J. S. Desenvolvimento in vitro de *Pleurotus* spp. sob a influência de diferentes substratos e dextrose. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 331-338, 2005.
- DOS SANTOS, T. C.; AMORIM, G. M.; BONOMO, R. C. F; FRANCO, M. Determinação da atividade de CMCase e FPase da estipe fúngica *Rhizopus* sp. através da bioconversão do resíduo de seriguela (*Spondias purpúrea* L.). **Journal of Health Sciences**, v. 13, n. 3, 2011.

DOS SANTOS, T. C.; SOARES, G. A. ROCHA, T. J. O.; FERREIRA, A. N.;
PACHECO, C. S. V. Quantificação da atividade de CMCase e FPase produzidas a
partir da fermentação em estado sólido da palma forrageira. **Revista Científica do
Departamento de Química e Exatas**, v. 2, n. 2, p. 22-29, 2011.

El-Naggar, N. E.A; ABDELWAHED, N. A.M.; SABER. W. I.S.; MOHAMED, A. A.
Bioprocessamento de alguns resíduos agroindustriais para produção de
endoglucanase pela nova subsp.; *Streptomyces albogriseolus* subsp. *cellulolyticus*
cepa NEAE-J. *Revista Brasileira de Microbiologia*, v. 45, p. 743-751, 2014.

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

FLORINDO, R. N., SOUZA, V. P., MUTTI, H. S., CAMILO, C., MANZINE, L. R.,
MARANA, S. R., NASCIMENTO, A. S. Structural insights into β -glucosidase
transglycosylation based on biochemical, structural and computational analysis of
two GH1 enzymes from *Trichoderma harzianum*. *New Biotechnology*, v. 40, p. 218–
227., 2018.

GIMENEZ, A. R.; ALTOPIEDI, L. G.; CARBALLO, N. V.; SILVA, L. C. M.; LIRIA, C.
W. O aumento da produtividade e a busca pela excelência na produção do etanol
brasileiro: uma história de sucesso. **Research, Society and Development**, v. 7, n.
2, p. 01-19, 2018.

GOMES, D. N. F. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos
filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos
Guararapes, Pernambuco**. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em
Biologia dos Fungos), Universidade Federal do Paraná. Recife, 2007.

GOULART, A. C. P. Fungos em sementes de soja: detecção, importância e controle.
Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados p.72, 2005.

HANSEN, G. H.; LÜBECK, M.; FRISVALD, J. C.; LÜBECK, P. S.; BIRGITTE, A. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 9, p. 1327-1341, 2015.

IBGE. **Sidra**. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acessado em: 22 set. 2022.

INFANZÓN-RODRÍGUEZ, M. I.; MORAL, S. D.; CASTRO-MASTÍNEZ, C.; CANO-SARMIENTO, C.; GÓMEZ-RODRÍGUEZ, J.; AGUILAR-USCANGA, M.. Multi-Response Optimization Using the Desirability Function of Exoglucanases, Endoglucanases and β -Glucosidases Production by *Aspergillus Niger* ITV-02 from Delignified Sugarcane Bagasse. **Sugar Tech**, v. 25, n. 1, p. 86-98, 2023.

JEFFRIES, T. W. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. **Physiology of Biodegradative microorganisms**. Springer, Dordrecht, 1991. p. 163-176.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. Quantas espécies há no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 36-42, 2005.

LYND, L. R. e ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: analytical framework and methodological approach. **Biotechnology and bioengineering**, v. 77, n. 4, p. 467-475, 2002.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 64, n. 3, p. 461-488, 2000.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PASSARINHO, A. T. P. **Detoxificação e aproveitamento da fração líquida proveniente do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar visando produção de xilitol**. 2018. 119 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007.

RIBEIRO, C. B. e SCHIRMER, W. N. Panorama dos combustíveis e biocombustíveis no Brasil e as emissões gasosas decorrentes do uso da gasolina/etanol. **BIOFIX Scientific Journal**, v. 2, n. 2, p. 16-22, 2017.

ROSA, I. Z. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de celulases, xilanases e celobiose desidrogenase com potencial para sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar**. 2014. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. São José do Rio Preto. 2014.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química nova**, v. 35, p. 1004-1010, 2012.

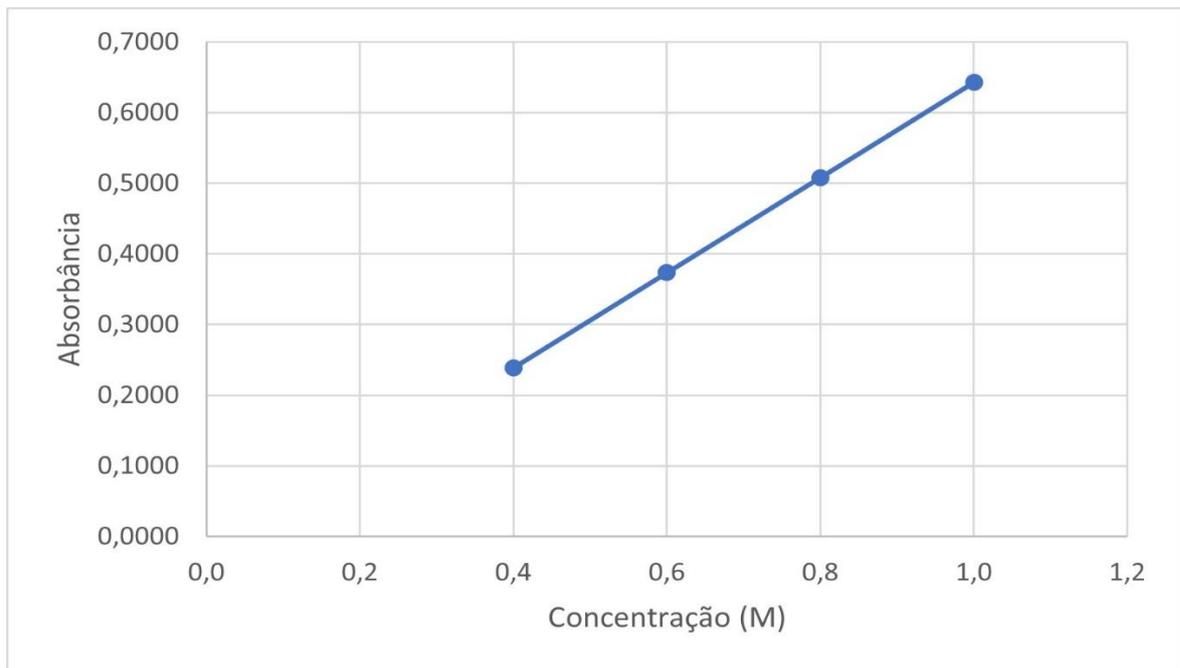
SANTOS, G. R. dos (organizador). **Quarenta anos de etanol em larga escala no Brasil: desafios, crises e perspectivas**. Brasília: IPEA, 2016.

UNIFESP. Uso de bagaço da cana abre novas possibilidades. 2023. Disponível em: <https://www.unifesp.br/reitoria/dci/edicoes-anteriores-entreteses/item/2280-uso-de-bagaco-da-cana-abre-novas-possibilidades#:~:text=O%20baga%C3%A7o%20e%20a%20palha,queima%20de%20baga%C3%A7o%20nas%20caldeiras>. Data de acesso: 03 de ago de 2023.

ANEXO A – Gráfico da curva padrão de glicose

Nesta curva de calibração utilizando o amido como substrato, observou-se a relação da absorbância com a concentração de amido em g/L. Obtendo-se a Equação 1, representada por C_{con} sendo a concentração de amido (g/L) e A_{abs} é a absorbância.

$$C_{con} = 0,6723 \times A_{abs} - 0,0298.$$



Fonte: Autoria própria (2023).