



A Produção do Conhecimento nas Ciências Biológicas

José Max Barbosa de Oliveira Junior
(Organizador)

 **Atena**
Editora

Ano 2019

José Max Barbosa de Oliveira Junior
(Organizador)

A Produção do Conhecimento nas Ciências Biológicas

Atena Editora
2019

2019 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação e Edição de Arte: Lorena Prestes e Geraldo Alves

Revisão: Os autores

Conselho Editorial

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Profª Drª Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

P964 A produção do conhecimento nas ciências biológicas [recurso eletrônico] / Organizador José Max Barbosa de Oliveira Junior. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2019.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: World Wide Web.

Inclui bibliografia

ISBN 978-85-7247-279-1

DOI 10.22533/at.ed.791192504

1. Ciências biológicas. 2. Biologia – Pesquisa – Brasil. I. Oliveira Junior, José Max Barbosa de.

CDD 574

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores.

2019

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

www.atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

A obra “*A produção do Conhecimento nas Ciências Biológicas*” consiste de uma série de livros de publicação da Atena Editora. Com 21 capítulos o volume I apresenta uma visão holística e integrada da grande área das Ciências Biológicas, com produção de conhecimento que vai de biologia molecular à biologia da conservação. Assim, os conhecimentos apresentados nos capítulos permeiam distintas temáticas dessa área, como: biotecnologia, semicondutores, avaliação físico-química, controle de proliferações, atividade celulolítica, diversidade e taxonomia, jogos didáticos e ensino de biologia, educação ambiental, saúde e qualidade de vida e restauração ecológica.

Essa amplitude de conhecimento é bem inerente às Ciências Biológicas, afinal, são tais ciências (biologia geral, genética, botânica, zoologia, ecologia, morfologia, fisiologia, bioquímica, biofísica, farmacologia, imunologia, microbiologia e parasitologia) que buscam entender as interações dos/entre diferentes seres vivos e também com o ambiente em que vivem, identificando os padrões de comportamento de cada um deles em relação as mais variadas condições ambientais e atividades antrópicas.

Recentemente o renomado pesquisador Dr. Leandro Juen fez uma afirmativa extremamente coerente e condizente com a real situação da ciência no mundo: “*nossa capacidade de gerar conhecimento é bem menor do que a velocidade da alteração e da degradação ambiental*” e, em consequência disso, muitas espécies e formas eficazes de ensino serão perdidas até mesmo antes do conhecimento de suas existências/ funções pela ciência. Essa assertiva nos faz pensar o quanto não somente a ciência aplicada, mas também a básica, são fundamentais para amenizarmos essa situação. E “*a produção do conhecimento nas Ciências Biológicas*” traz ciência: da básica à/e/ou aplicada. Assim, inspirado em um artigo de Courchamp et al. (2015), convidamos todos a refletirem sobre a importância que a ciência básica exerce na “base” da produção de conhecimento, ou seja, estudos básicos são fundamentais para entendermos o nosso complexo mundo biológico.

Mesmo que historicamente o financiamento para pesquisas básicas tenha sido em níveis inferiores aos de outras grandes categorias de pesquisa, arrisco dizer que, possivelmente poucas pesquisas na edição desse livro tiveram grande financiamento, mas que, no entanto, os 21 capítulos do livro trazem pautas de grande relevância (na área de Ciências Biológicas) para toda comunidade acadêmico-científica e sociedade civil, auxiliando na promoção de uma ciência básica e/ou aplicada de qualidade, e no estabelecimento de uma base técnica, científica e educacional acessível a todos os segmentos e atores envolvidos na área ambiental, como forma de subsidiar ações de políticas públicas, administrativas, educacionais e de conservação de maneira geral.

Por fim, convidamos todos os leitores a mergulharem no misto de boas informações que o livro traz, e que, o mesmo possa atuar como um veículo adequado para difundir e ampliar o conhecimento em Ciências Biológicas, com base nos resultados aqui dispostos. Ademais, esperamos que os mesmos resultados sejam fontes inspiradoras

para que jovens estudantes/pesquisadores(as) continuem descobrindo, criando, aperfeiçoando e contribuindo na geração de novas tecnologias e conhecimento em Ciências Biológicas, proporcionando uma ampliação das ações científicas e educacionais realizadas em prol de uma causa maior “o equilíbrio entre homem e meio ambiente”. Considerem nesse momento “meio ambiente” como um termo amplo, maleável e multifacetado, que envolve não somente as esferas “biológica” e “física”, mas também o componente antrópico (sociedade - economia, cultura, dentre outros) e todas as dinâmicas das relações que se estabelecem em todas essas esferas.

A todos(as), uma excelente leitura!

José Max Barbosa de Oliveira Junior

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR <i>Trichoderma harzianum</i> IOC 3844	
Sabrina Marques Rios Marcelo Chuei Matsudo Joyce Elise de Campos Pinto	
DOI 10.22533/at.ed.7911925041	
CAPÍTULO 2	9
AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASES POR <i>Aspergillus awamori</i> IOC 4142	
Joyce Elise de Campos Pinto Sabrina Marques Rios Marcelo Chuei Matsudo	
DOI 10.22533/at.ed.7911925042	
CAPÍTULO 3	16
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DA INTOLERÂNCIA À LACTOSE	
Maria Cristina Modesto Clementino Eliane Papa Ambrosio Albuquerque	
DOI 10.22533/at.ed.7911925043	
CAPÍTULO 4	22
PRODUÇÃO DE LEVANA E SUA APLICAÇÃO EM COSMÉTICOS	
Reginara Teixeira da Silva Gabrielly Terassi Bersaneti Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi	
DOI 10.22533/at.ed.7911925044	
CAPÍTULO 5	36
SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DA FTALOCIANINAS DE COBRE	
Carlos Alberto Mitio Hirano Paulo Sergio Calefi	
DOI 10.22533/at.ed.7911925045	
CAPÍTULO 6	41
ELABORAÇÃO E AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE MANGA EM CALDA ELABORADA COM A VARIEDADE <i>Tommy atkins</i>	
Ana Paula Costa Câmara Érica Braga de Sousa Vieira Cristiane Rodrigues de Araújo Penna Robson Rogério Pessoa Coelho Íris Braz da Silva Araújo	
DOI 10.22533/at.ed.7911925046	

CAPÍTULO 7	57
EVALUATION OF THE EFFECT OF INSETICIDES ON THE INTESTINAL MICROBIOTA OF <i>Culex quinquefasciatus</i>	
José Márcio Gomes Fernandes Adriano Guimarães Parreira Stênio Nunes Alves	
DOI 10.22533/at.ed.7911925047	
CAPÍTULO 8	67
PRODUÇÃO DE CELULASES POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS NO NORTE DE MINAS GERAIS CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA CONTENDO RESÍDUOS DE BANANEIRA	
Adrielle Mercia Alves Santos Barbhara Mota Marinho Vivian Machado Benassi	
DOI 10.22533/at.ed.7911925048	
CAPÍTULO 9	73
TABELA TAXONÔMICA SIMPLIFICADA PARA IDENTIFICAÇÃO DE VETORES DA FEBRE MACULOSA PRESENTES NO ESTADO DO TOCANTINS	
Mariana Antunes Fiorotto de Abreu Bruna Silva Resende André Moreira Rocha Tássia Silva Resende Rafaella Antunes Fiorotto de Abreu Josefa Moreira do Nascimento-Rocha	
DOI 10.22533/at.ed.7911925049	
CAPÍTULO 10	89
HIPÓTESES EXPLICATIVAS PARA OCORRÊNCIA DE ALTERAÇÕES TERATOLÓGICAS EM DIATOMÁCEAS (<i>Bacillariophyceae</i>)	
Cinthia Coutinho Rosa Favaretto Camila Akemy Nabeshima Aquino Liliane Caroline Servat Norma Catarina Bueno	
DOI 10.22533/at.ed.79119250410	
CAPÍTULO 11	95
O ENSINO DE EDUCAÇÃO AMBIENTAL DESTACANDO A PRESERVAÇÃO DA <i>Araucaria angustifolia</i>	
Patricia Bachniuk Kloc Bruna Maria Caznok Adriane Rodrigues de Moraes Leite Vilcinéia Leszak Silmara Ap. Meira Bandeira Fabiane Fortes	
DOI 10.22533/at.ed.79119250411	

CAPÍTULO 12	105
ENSINANDO EVOLUÇÃO COM O ZOOLOGICO: USO DE ESPAÇO NÃO FORMAL PARA O ENSINO	
Hudson Rodrigo da Cruz Monteiro	
Ananda Souza Lima	
Manoela Volkweis Lombardi	
Davi Rios Valdez	
Natasha Araújo Tavares	
DOI 10.22533/at.ed.79119250412	
CAPÍTULO 13	111
JOGO DIDÁTICO: DESCOBRINDO AS AVES	
Alan Marques Galdino	
Henrique Rezende Untem	
Maria Aparecida de Sousa Perrelli	
DOI 10.22533/at.ed.79119250413	
CAPÍTULO 14	123
DESENVOLVIMENTO DE UM APLICATIVO MÓVEL PARA A CARACTERIZAÇÃO DE ÁREAS ENDÊMICAS DE <i>Schistosoma mansoni</i> NO BRASIL	
Davi Viegas Melo	
Guilherme Silva Miranda	
João Gustavo Mendes Rodrigues	
Arthur Cantanhede Lima	
Neuton Silva Sousa	
DOI 10.22533/at.ed.79119250414	
CAPÍTULO 15	131
JÚRI SIMULADO INTERDISCIPLINAR E A SALA DE AULA: TRABALHANDO O PROTAGONISMO E A AUTONOMIA DO EDUCANDO	
Alessandra Martino Ramos de Medeiros	
Rodrigo de Mello	
Lenise Aparecida Martins Garcia	
DOI 10.22533/at.ed.79119250415	
CAPÍTULO 16	139
ROSCA, A RECEITA DE APRENDIZAGEM EM AULAS SOBRE FERMENTAÇÃO: UMA EXPERIÊNCIA EM SALA DE AULA DO ENSINO MÉDIO	
Ana Isabel Ribeiro	
DOI 10.22533/at.ed.79119250416	
CAPÍTULO 17	142
PRINCIPAIS MOTIVOS LIGADOS A QUEDA EM IDOSOS NO MUNICÍPIO DE CRUZ ALTA/RS	
Giovani Sturmer	
Nathália Arnoldi Silveira	
Mylene Stefany Silva Dos Anjos	
Fabiana de Cássia Romanha Sturmer	
DOI 10.22533/at.ed.79119250417	

CAPÍTULO 18	148
UNIVERSIDADE VERSUS EDUCAÇÃO BÁSICA: O DIÁLOGO ENTRE PROFESSORES EM FORMAÇÃO E ESTUDANTES QUE PODEM APRENDER SAÚDE	
Samuel Santos Braga Hermann Vanesca Viana de Oliveira Liziane Martins	
DOI 10.22533/at.ed.79119250418	
CAPÍTULO 19	153
AValiação CLÍNICA EM SERPENTES CATIVAS NO CENTRO DE REABILITAÇÃO DE VIDA SILVESTRE EM GUADALAJARA, JALISCO – MÉXICO	
Marina Gonçalves Lima Fernanda de Cássia Gonçalves Alves Luiz Humberto Guimarães Riquelme Junior Daniely Ayabe Curcio Magyda Arabia Araj Dahroug Moussa Paula Helena Santa Rita	
DOI 10.22533/at.ed.79119250419	
CAPÍTULO 20	169
SMART CEMETERY (NECROPOLIS) PARA SMART CITY	
Josilaine Aparecida da Silva Thais Cristina Silva Ferreira Paulo Sergio de Sena	
DOI 10.22533/at.ed.79119250420	
CAPÍTULO 21	179
UTILIZAÇÃO DE PLANTAS NATIVAS NA RESTAURAÇÃO ECOLÓGICA EM UM TRECHO DE ECOSSISTEMA DE RESTINGA	
Suelen Rodrigues da Conceição Christiano Marcelino Menezes Laila Nazem Mourad	
DOI 10.22533/at.ed.79119250421	
SOBRE O ORGANIZADOR	188

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR *Trichoderma harzianum* IOC 3844

Sabrina Marques Rios

Universidade Federal de Itajubá, Instituto
Recursos Naturais
Itajubá-MG

Marcelo Chuei Matsudo

Universidade Federal de Itajubá, Instituto
Recursos Naturais
Itajubá-MG

Joyce Elise de Campos Pinto

Universidade Federal de Itajubá, Instituto
Recursos Naturais
Itajubá-MG

RESUMO: Este projeto visa produzir enzimas celulases pelo fungo *Trichoderma harzianum* IOC 3844, cultivado em diferentes meios e condições, para posterior realização de hidrólise enzimática de biomassa microalgal, que pode servir de substrato para produção de biocombustíveis de terceira geração. Inicialmente, foi realizada a reativação e determinação de um meio padrão de cultivo para o fungo. Em seguida, selecionaram-se possíveis meios para induzir a produção enzimática, testando dois tipos de substratos, o bagaço de cana-de-açúcar e carboximetilcelulose, combinados a duas fontes de nutrientes diferentes, testados em dois tempos de cultivo, 96 e 168 horas, ambos com pH inicial entre 5 e 5,5, temperatura entre 30 e 32°C e agitação de

120 rpm. Os resultados de atividade enzimática foram analisados estatisticamente por ANOVA e Teste de Tukey, determinando o meio de carboximetilcelulose associado à solução salina como melhor condição, com atividade enzimática de, em média, 0,100 U.mL⁻¹ para celulases totais.

PALAVRAS-CHAVE: *Trichoderma harzianum*, celulases, produção enzimática, biocombustível.

ABSTRACT: This project aims to produce enzymes by the fungus *Trichoderma harzianum* IOC 3844, grown in various medium and conditions, for subsequent enzymatic hydrolysis of microalgae biomass, which can serve as substrate for the production of third generation biofuels. Initially, the reactivation and determination of a standard culture medium for the fungus were performed. Then, the selection of a medium to induce an enzymatic production was made by testing two types of substrates, sugarcane bagasse and carboxymethylcellulose, combined with two different nutrient sources, tested at two culture times, 96 and 168 hours, both in initial pH between 5 and 5.5, temperature between 30 and 32°C and agitation of 120 rpm. The results of the enzymatic activity were statistically analyzed through ANOVA and Tukey's test, determining the carboxymethylcellulose medium associated to the saline solution as best condition, with an

enzymatic activity of, in average, 0,100 U.mL⁻¹ for total cellulases.

KEYWORDS: *Trichoderma harzianum*, cellulases, enzyme production, biofuels.

1 | INTRODUÇÃO

Os fungos são microrganismos largamente explorados industrialmente e têm grande utilidade na produção de alimentos, na indústria farmacêutica e no tratamento biológico de efluentes, além de sua importância agrícola e ecológica, auxiliando na manutenção do equilíbrio do ambiente, decompondo restos vegetais e auxiliando no crescimento de plantas (Abreu et al., 2014). Fungos filamentosos são muito utilizados industrialmente na produção de enzimas hidrolíticas. As espécies de *Trichoderma* são conhecidas por sua alta capacidade de adaptação e crescimento nos mais diversos meios, o que reflete na sua grande utilidade industrial. A *Trichoderma harzianum* espécie é frequentemente encontrada em materiais celulósicos e, portanto, espera-se que seja uma grande produtora de enzimas celulolíticas. Atualmente, muitos estudos vêm sendo realizados para otimizar a produção de celulases por fungos do gênero *Trichoderma*, e um dos maiores produtores desta enzima no mercado é a espécie *Trichoderma reesei* (Florencio, 2011).

Naturalmente, os fungos filamentosos produtores de celulases sintetizam estas enzimas com o objetivo de degradar material celulósico, como madeira, como forma de obtenção de carbono, considerando que são microrganismos que vivem associados a ambientes ricos em celulose. O mecanismo de ação das celulases na degradação de celulose ocorre por sinergia entre os três principais tipos dessa enzima: endocelulases (endoglucanases), exocelulases (exoglucanases) e β -glicosidases. As endoglucanases são responsáveis por iniciar a hidrólise atacando a região amorfa da molécula de celulose, liberando novas extremidades, diminuindo o grau de polimerização da molécula e aumentando sua solubilidade. As exoglucanases, por sua vez, atuam sobre extremidades livres da molécula, liberando celobioses (celobiohidrolases) ou monômeros de glicose (celodextrinases). As celobiohidrolases são as enzimas exoglucanases mais comuns e são responsáveis por tornar as partes cristalinas da molécula de celulose em amorfas, o que aumenta a área de contato para a ação enzimática. As β -glicosidases atuam nos terminais apenas de celobioses e celodextrinas, gerando monômeros de glicose (Rodrigues, 2014). Entender esse mecanismo de ação é de extrema importância para a determinação de atividade enzimática em testes de produção em laboratório.

Como a celulose é um composto extracelular para o fungo e não é assimilada por ele em sua forma polimérica, as enzimas celulases produzidas por esses fungos são excretadas no meio. Este fato é de grande importância para a produção biotecnológica de enzimas celulolíticas, pois diminui o custo de produção, uma vez que não será necessária nenhuma etapa adicional de extração das enzimas (rompimento celular,

por exemplo), e determina que meios artificiais para indução de produção de celulases devem ser ricos em celulose.

O presente trabalho visa avaliação da produção de enzimas hidrolíticas a partir do fungo filamentoso *Trichoderma harzianum*, para possibilitar posterior hidrólise enzimática da biomassa microalgal.

2 | METODOLOGIA

Reativação e Cultivo do Fungo

A reativação do fungo (IOC 3844), cedido pela Fundação Oswaldo Cruz, foi realizada conforme as instruções fornecidas pela própria instituição. A determinação de um meio de cultivo padrão foi realizada através da seleção de cinco meios testes, sendo dois líquidos e três em estado sólido: Extrato de levedura e Extrato de malte, formulados por Pinheiro (2015), Ágar malte 2%, de acordo com Pereira (2012), e dois meios industrialmente preparados, meio Sabouraud e meio Ágar Batata Dextrose (BDA).

Os tubos contendo suspensão de líofilos foram incubados por 25 dias à temperatura ambiente, sob radiação luminosa. Após esse primeiro cultivo de reativação, realizaram-se dois repiques até que se determinasse o meio de cultivo padrão. Com o meio padrão já determinado, foram realizados repiques periódicos, a cada 30 dias aproximadamente, apenas no meio padrão e sob as mesmas condições iniciais, até o final da pesquisa.

Produção Enzimática

Foram testados, inicialmente, quatro diferentes meios de produção enzimática. Os dois primeiros são alguns dos meios com melhores resultados obtidos por Silva et al. (2009), o primeiro se trata do substrato Carboximetilcelulose como fonte de carbono associado a proteína de soja, como fonte de nutrientes, o segundo utiliza Bagaço de cana como fonte de carbono, também associado a proteína de soja. O terceiro meio de produção enzimática foi preparado com base no meio definido por Sales et al. (2010), que consiste na utilização do bagaço de cana-de-açúcar como substrato, concentração de 1% por apresentar melhores resultados no mesmo experimento, associado a uma solução salina responsável por fornecer os macro e micronutrientes necessários ao desenvolvimento do microrganismo. A composição do meio é: 0,2 g.L⁻¹ KH₂PO₄; 0,13 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 0,03 g.L⁻¹ CO(NH₂)₂; 0,03 g.L⁻¹ MgSO₄·7H₂O; 0,03 g.L⁻¹ CaCl₂·2H₂O; 0,5 mg.L⁻¹ FeSO₄·7H₂O; 0,156 mg.L⁻¹ MnCl₂; 0,14 mg.L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O; 0,14 mg.L⁻¹ CoCl₂·6H₂O; 10 g.L⁻¹ bagaço de cana-de-açúcar.

O quarto meio testado foi formulado pelo presente trabalho e segue a lógica de utilização de uma fonte de carbono associado a uma fonte de nutrientes. Através de uma união entre as duas referências utilizadas, idealizou-se a utilização de

carboximetilcelulose como fonte de carbono associado a solução salina do meio anterior como fonte de nutrientes e, para tanto, a concentração de substrato utilizada também foi de 1%.

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado na preparação dos meios foi processado em laboratório, conforme Sales et al (2010), através de moagem em multiprocessador doméstico. Após preparados, corrigiu-se o pH de todos os meios para entre 5 e 5,5, e os mesmos foram esterilizados em autoclave.

Para preparo do inóculo do fungo da espécie , realizou-se cultivo em placa de Petri contendo meio ágar malte (Pereira, 2012). Cinco discos de micélio de 1,2 cm de diâmetro foram inoculados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL de meio (Ebinuma, 2013). Foram testados dois períodos de cultivo: 96 horas (Silva et al, 2009) e 168 horas (Ebinuma, 2013), ambos com temperatura entre 30 e 32°C, com pH inicial entre 5 e 5,5 e agitação de 120 rpm.

Determinação de Atividade Enzimática

Após o tempo de cultivo, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante obtido foi utilizado como extrato para os testes de determinação da atividade de celulasas totais, endoglucanases e exoglucanases. Em todos esses testes utilizou-se uma solução tampão citrato de sódio, preparada conforme Dorigan et al. (2016). O teste para determinação da atividade de celulasas totais seguiu a metodologia descrita por Ghose (1987), utilizando filtro de papel Whatman No. 1 em tiras de 6 cm X 1 cm, cortadas em pedaços de 1 cm x 1cm como substrato. O testes enzimáticos de endoglucanases foi realizado conforme o ensaio de Ghose (1987), utilizando carboximetilcelulose como substrato. Para a realização dos testes enzimáticos de exoglucanases, seguiu-se a metodologia utilizada por Mawadza et al. (2000), utilizando a solução substrato e o tempo de reação determinados por Sales et al. (2010).

Avaliação Estatística da Produção de Enzimas

Os cultivos em diferentes meios para produção de enzimas foram realizados em triplicata e os resultados de atividades enzimáticas foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de TuKey, a fim de verificar a existência de diferenças significativas entre as variáveis estudadas, ao nível de 95% de confiança ($p \leq 0,05$) utilizando o software Minitab 17.

3 | RESULTADOS

Reativação e Cultivo do Fungo

A reativação do fungo *Trichoderma harzianum* se deu perfeitamente em todos os cinco meios testados. Dessa forma, a determinação de um meio de cultivo padrão foi feita após três cultivos, considerando maior crescimento aparente e, principalmente,

o meio que apresentasse maior flexibilidade. O crescimento se deu muito bem nos meios sólidos Sabouraud e Ágar Malte. No meio BDA, entretanto, o microrganismo não se desenvolveu muito bem. Nos meios líquidos, o fungo apresentou melhor desenvolvimento aparente no meio Extrato de Malte, em relação ao Extrato de Levedura. Dessa forma, selecionou-se os meios à base de malte como principais para continuação da pesquisa, sendo o Ágar Malte o principal meio utilizado e o Extrato de Malte como meio auxiliar, para ser utilizado na produção enzimática, caso necessário.

Determinação de atividade enzimática

Através dos testes de atividade de celulases totais, endo e exoglucanases, foi possível construir curvas padrão, cuja equação fornece a concentração de açúcares redutores na amostra de acordo com a absorbância apresentada. A partir da concentração de açúcares redutores (ART) em $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, foi possível calcular a atividade enzimática (ATV) das amostras de acordo com a equação (1) a seguir:

$$ATV = \frac{ART \times V_{total} \times d}{t \times V_{enzima} \times MM_{glicose}} \quad (1)$$

Onde V_{TOTAL} é o volume reacional total presente no tubo, ou seja, o volume de substrato somado ao volume de solução enzimática (V_{ENZIMA}), ambos em mL, t é o tempo de reação, d é o fator de diluição e $MM_{GLICOSE}$ é a massa molar da glicose. Para todas as atividades enzimáticas, uma unidade (U) equivale à quantidade de enzima para formar $1 \mu\text{mol}$ de glicose por minuto de reação (Sales et al., 2010).

Avaliação da produção enzimática

Com os dados obtidos através do cálculo de atividades enzimáticas foi possível realizar ANOVA (Análise de variância) e teste de Tukey de diferença estatisticamente significativa. Neste caso adotou-se um intervalo de confiança de 95%. Os quadros aqui avaliados foram os meios de produção enzimática, e os valores comparados foram as médias aritméticas apresentadas em cada ensaio (realizado em triplicata). Vale ressaltar que para essa análise, os dados com valores negativos foram zerados. Os valores negativos significam que a Absorbância apresentada pela amostra é tão baixa que não é contemplada no intervalo de absorbâncias para o qual a curva foi construída, o que acarreta num valor não confiável de atividade enzimática.

Meio	Atividade Celulases Totais em U/mL	
	96 h	168 h
CMC + PS	0,000±0,000 ^A	0,000±0,000 ^B
CMC + SSAL	0,096±0,063 ^A	0,100±0,010 ^A
BCA + PS	0,000±0,000 ^A	0,002±0,003 ^B
BCA + SSAL	0,006±0,009 ^A	0,035±0,044 ^{AB}
Meio	Atividade Endoglucanases em U/mL	
	96 h	168 h
CMC + PS	0,096±0,073 ^A	0,387±0,501 ^A
CMC + SSAL	0,434±0,019 ^A	0,590±0,097 ^A
BCA + PS	0,032±0,001 ^A	0,054±0,038 ^A
BCA + SSAL	0,565±0,291 ^A	0,300±0,078 ^A
Meio	Atividade Exoglucases em U/mL	
	96 h	168 h
CMC + PS	0,000±0,000 ^A	0,433±0,606 ^A
CMC + SSAL	0,098±0,138 ^A	0,015±0,021 ^A
BCA + PS	0,000±0,000 ^A	0,870±1,230 ^A
BCA + SSAL	0,006±0,009 ^A	0,000±0,000 ^A

Tabela 1. Atividades enzimáticas obtidas em 96h e 168h nos diferentes meios avaliados.

Fonte: autor.

Legenda: CMC: Carboximetilcelulose; PS: Extrato de proteína de soja; SSAL: Solução salina de acordo com Sales et al. (2010); BCA: Bagaço de cana-de-açúcar.

^{AB} Valores que não compartilham letra são significativamente diferentes de acordo com o teste Tukey ($P > 0,05$)

A Tabela 1 apresenta os valores das médias aritméticas e desvio padrão dos ensaios de atividade enzimática para cada meio de produção enzimática testado e as respectivas análises de variância e Teste de Tukey. O teste foi realizado por colunas e, dentro destas, os valores que apresentam letras iguais não têm diferença estatisticamente significativa entre si.

4 | DISCUSSÃO

Como é possível perceber na Tabela 1, o único teste que apresentou resultado relevante foi o de celulases totais, para o qual, no cultivo de 168 horas, o meio contendo Carboximetilcelulose combinado à solução salina empregada por Sales et al. (2010) foi o único que apresentou diferença estatisticamente significativa com relação aos demais meios testados, embora não tenha apresentado diferença significativa com relação ao meio contendo bagaço de cana-de-açúcar associado à mesma solução salina, este último meio, porém, não apresentou diferença significativa com relação aos demais.

Nos demais testes, os diferentes meios não apresentam influencia etatisticamente

significativa sobre a produção de enzimas (endoglucanases e exoglucanases) de acordo com ANOVA ($p > 0,05$), o que torna os resultados inconclusivos para a determinação de um meio ideal. Dessa forma o meio contendo CMC associado à solução salina foi tomado como ideal, com base no resultado do teste de celulases totais, apenas. O tempo de cultivo de 168 horas também foi determinado ideal pela mesma razão.

O resultado apresentado pelo meio ideal foi de $0,100 \text{ U.mL}^{-1}$ de celulases totais, em média. Este valor é baixo quando comparado aos resultados apresentados pelo meio que associa carboximetilcelulose e proteína de soja nos testes de endoglucanases, de no máximo $0,45 \text{ U.mL}^{-1}$, realizados por Sales et al. (2010), por exemplo, que foi uma das referências para a produção enzimática no presente trabalho. Quando comparado à outra referência, de Silva et al. (2009), entretanto, o resultado é satisfatório e bem próximo do valor de atividade mais alto apresentado no mesmo teste destes autores, de $0,11 \text{ U.mL}^{-1}$, na concentração 1% de substrato, exatamente como utilizado nesta pesquisa. Dessa forma, embora o resultado apresentado seja satisfatório, seria importante avaliar outros parâmetros (como concentração de substrato, temperatura e pH) para aumentar a produção enzimática no meio escolhido como ideal.

Seriam interessantes também ensaios adicionais para se avaliar meio contendo bagaço de cana-de-açúcar como substrato associado à solução salina, já que foi o meio que apresentou resultados próximos ao meio padrão (média de $0,035 \text{ U.mL}^{-1}$ de celulases totais), porém, desta vez, realizando um pré-processamento do bagaço de cana-de-açúcar através de hidrólise ácida, como forma de aumentar a área de contato do substrato para o microrganismo.

5 | CONCLUSÕES

A produção de enzimas celulases por fungo *Trichoderma harzianum* foi testada em quatro meios diferentes, dois deles contendo bagaço de cana-de-açúcar como substrato e os outros dois com carboximetilcelulose como substrato. O meio contendo carboximetilcelulose associado à solução salina empregada por Sales et al. (2012), foi desenvolvido nesta pesquisa e apresentou os melhores resultados de atividade enzimática (média de $0,100 \text{ U.mL}^{-1}$ de celulases totais), sendo assim, foi escolhido como o meio ideal. Entretanto, a diferença entre os meios não foi tão grande e seria interessante variar outros parâmetros como concentração de substrato, temperatura e pH para otimizar a produção enzimática neste meio tomado como ideal. Outra maneira interessante de comprovar a superioridade produtiva do meio padrão seria comparar, novamente, a produção enzimática com o meio contendo bagaço de cana-de-açúcar como substrato associado à solução salina, já que foi o meio que apresentou resultados próximos ao meio padrão (média de $0,035 \text{ U.mL}^{-1}$ de celulases totais), porém, desta vez, realizando um pré-processamento do bagaço de cana-de-açúcar através de hidrólise ácida, como forma de aumentar a área de contato do substrato para o microrganismo.

6 | AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro, e ao técnico Paulo Sérgio Marques pelo apoio ao longo da pesquisa.

REFERÊNCIAS

Abreu, Jéssica A. S.; et al. Fungos de Interesse: Aplicações Biotecnológicas. Rev. Uningá, v. 21 (2015) 55-59.

Dorigan, Ana Maria A.; et al. Imuno-histoquímica. USP (2016)

Ebinuma, Valéria C. S. Produção e extração de colorantes naturais de *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275.USP. 2013.

Florencio, Camila. Microrganismos produtores de celulases: seleção de isolados de *Trichoderma* spp. UFSCAR. 2011.

Ghose, T.K. Measurement of cellulase activities. Pure and Applied Chemistry, v.59, p.257-268, 1987.

Mawadza, C.; Hatti-kaul, R.; Zvauya, R.; Mattiasson, B. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. Journal of Biotechnology, v.83, p.177-187, 2000.

Pereira, Vanessa M. Avaliação de potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização da produção de celulases por *Aspergillus sulphureus* (Fresen.) Whemer. UFLA. 2012

Pinheiro, Jessika B. Prospecção de fungos e meios de cultura alternativos para a produção de exopolissacarídeos. UFSJ. 2015

Rodrigues, Rosilene Souza. Produção, purificação e caracterização de celulases e hemicelulases do fungo da podridão branca PF-2. Universidade Federal de Viçosa. 2014.

Sales, Marília R.; et al. Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus*. Rev. Pesq. agropec. bras. v. 45. Brasília. (2010) 1290-1296.

Silva, L.D.; Lopes, F.C.; Silveira, S.T.; Brandelli, A. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus phoenicis* in grape waste using response surface methodology. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.152, p.295-305, 2009.

SOBRE O ORGANIZADOR

JOSÉ MAX BARBOSA DE OLIVEIRA JUNIOR é graduado em Ciências Biológicas (Licenciatura Plena) pela Faculdade Araguaia (FARA). Mestre em Ecologia e Conservação (Ecologia de Sistemas e Comunidades de Áreas Úmidas) pela Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT). Doutor em Zoologia (Conservação e Ecologia) pela Universidade Federal do Pará (UFPA) e Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG). Atualmente é Pós-Doutorando na Universidade do Algarve (UAlg-Portugal), no grupo de Investigação do Centro de Ciências do Mar, Faculdade de Ciências, Ecoreach –Ecologia de ecossistemas ribeirinhos, estuarinos e costeiros. É professor Adjunto I da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), lotado no Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas (ICTA). Coordenador do Laboratório Multidisciplinar de Gestão Ambiental. Orientador nos programas de Pós-Graduação stricto sensu em Sociedade, Ambiente e Qualidade de Vida (PPGSAQ-UFOPA); Sociedade, Natureza e Desenvolvimento (PPGSND-UFOPA); Biodiversidade (PPGBEES-UFOPA) e Ecologia (PPGECO-UFPA/EMBRAPA). Membro de corpo editorial dos periódicos Enciclopédia Biosfera e Vivências. Tem vasta experiência em ecologia e conservação de ecossistemas aquáticos continentais, integridade ambiental, ecologia geral, avaliação de impactos ambientais (ênfase em insetos aquáticos). Áreas de interesse: ecologia, conservação ambiental, agricultura, pecuária, desmatamento, avaliação de impacto ambiental, insetos aquáticos,

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-279-1



9 788572 472791