ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS COM ATIVIDADE DE CELULASE ISOLADOS EM ÁREAS DE FLORESTA AMAZÔNICA MERIDIONAL

Ilio Fealho de Carvalho¹, Cintia Graciele da Silva², Jaqueline Aline Gerhardt³,
Rubens Monti⁴, Maurecilne Lemes da Silva⁵

¹ Professor Doutor do Departamento de Ciências Biológicas, Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT, Tangará da Serra, MT, Brasil. (iliocarv@gmail.com)

² Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Vegetal Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT, Tangará da Serra, MT, Brasil.

³ Graduada em Ciências Biológicas, Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT. Tangará da Serra, MT, Brasil.

⁴ Professor Doutor do Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Ciências Farmacêutica, Universidade do Estado de São Paulo – UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

⁵ Professora Doutora do Departamento de Ciências Biológicas, Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT, Tangará da Serra, MT, Brasil.

Recebido em: 08/09/2015 – Aprovado em: 14/11/2015 – Publicado em: 01/12/2015

DOI: http://dx.doi.org/10.18677/Enciclopedia_Biosfera_2015_251

RESUMO

As celulasas produzidas por fungos filamentosos atuam sobre materiais celulósicos levando a degradação das fibras de celulose em açúcares como a glicose, celobiose e outros oligômeros. O trabalho teve por objetivo isolar e selecionar fungos filamentosos de diferentes áreas de floresta na região do médio norte do Estado de Mato Grosso com atividade de celulase. Foram isoladas 145 linhagens de amostras de solo e avaliadas o potencial de atividade de celulase pela técnica do halo de hidrólise do carboximetilcelulose (CMC) utilizado como fonte de carbono. Destas 50,68% das linhagens apresentaram índice enzimático (Ie) e 49,31% não apresentaram halo de hidrólise ou não cresceram. As linhagens com (Ie) foram avaliadas para a produção de endoglucanase (CMCase) em meio sintético contendo CMC. Foi obtido um percentual de 94,59% de linhagens produtoras da enzima CMCase. As linhagens 12, 26, 42, 45, 60, 63 e 72 se destacaram como melhores produtoras de CMCase com atividade variando de 0,63 a 0,8 U.mL⁻¹.

PALAVRAS CHAVE: Floresta Amazônica, Índice enzimático, Atividade de celulase.

SELECTION OF FILAMENTOUS FUNGI WITH CELLULASE ACTIVITIES, ISOLATED FROM DE AMAZON FOREST

ABSTRACT

The cellulases produced by filamentous fungi act on cellulosic materials leading to degradation of the cellulose fibers in sugars such as glucose, cellobiose and other oligomers. The study aimed to isolate select filamentous fungi with cellulase activity from different areas of forest in the middle north of the State of Mato Grosso. We isolated 145 strains from soil samples and evaluated the potential of cellulase activity

using the halo technique of hydrolysis of carboxymethylcellulose (CMC) as a carbon source. 50.68% of the strains showed enzymatic index (Ie) and 49.31% did not present hydrolysis halo or did not grow. Strains with (Ie) were evaluated for the production of endoglucanase (CMCase) in a synthetic medium containing CMC. It was obtained from a percentage of 94.59% enzyme-producing strains CMCase. The lines 12, 26, 42, 45, 60, 63 and 72 they stood out as best CMCase-producing with activity ranging 0.63 to 0.8 U.mL⁻¹.

KEY WORDS: Amazon forest, enzymatic index, cellulase activity.

INTRODUÇÃO

O solo é considerado um reservatório natural para os micro-organismos, onde aqueles com capacidade de secretar enzimas, como as celulases que atuam na decomposição da biomassa lignocelulósica, realizam atividade primordial no ciclo do carbono (DAMASO et al., 2012; VALENCIA & CHAMBERGO, 2013). As celulases produzidas por fungos filamentosos atuam sobre materiais celulósicos levando a degradação das fibras de celulose em açúcares como a glicose, celobiose e outros oligômeros (DAMASO et al., 2012).

A hidrólise enzimática da celulose é catalisada por enzimas altamente específicas que constituem um complexo celulolítico, denominado de hidrolases, que clivam as ligações O-glicosídicas. A sua classificação é de acordo com seu local de atividade no substrato celulósico e compreende três grandes grupos de enzimas, as endoglucanases (EnG), que clivam ligações internas da fibra celulósica, as exoglucanases (ExG) que atuam na região externa da celulose e as β -glicosidases (BG) que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (CASTRO & JUNIOR, 2010).

As enzimas produzidas por micro-organismos tiveram a sua produção comercialmente em meados de 1980 e usado com êxito em escala industrial para catalisar vários processos químicos, como a produção de detergentes, alimentos e bebidas, ração animal, têxteis, papel e celulose e produtos biomédicos (CASTRO & JUNIOR, 2010; RIBEIRO et al., 2014). Neste contexto, os fungos filamentosos tem despertado o interesse para bioprospecção por apresentarem crescimento rápido, facilidade nas condições de cultivo, por serem bons produtores de enzimas extracelulares com grande potencial de utilização na indústria (SIMÕES & TAUK-TORNISIELO, 2005).

As celulases são utilizadas industrialmente na bioconversão de resíduos de lignocelulose e transformados em açúcar fermentável que pode ser aplicado para produção de etanol de segunda geração (GOMES et al., 1993). A produção deste tipo de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos demonstra viabilidade de produção para o setor de biocombustíveis, por ser considerada uma fonte de energia renovável. Entretanto, a hidrólise da biomassa lignocelulósica incluem processos de pré tratamento com tecnologia de enzimas para a conversão da celulose e hemicelulose em açúcares fermentáveis. As formas de obtenção das enzimas é o maior obstáculo devido ao alto custo de produção (HE JUNA, et al., 2013; VALENCIA & CHAMBERGO, 2013).

O Brasil possui uma grande biodiversidade que pode ser explorado para estudos com micro-organismos que tenham atividade celulolíticas. O bioma Amazônico ocupa aproximadamente metade do território brasileiro e considerada a maior reserva de diversidade biológica com solo e clima que favorecem o crescimento de micro-organismos (THIEME et al., 2007). O objetivo do trabalho foi

isolar e selecionar fungos filamentosos de áreas de floresta da Amazônia Meridional do Estado de Mato Grosso visando à obtenção de linhagens promissoras para produção de enzimas celulolíticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e coleta de amostras de solo

As atividades foram realizadas no município de Tangará da Serra, localizado no médio norte do Estado do Mato Grosso, nos meses de Maio e Julho de 2010 nas Fazendas São Marcelo (F1) (14°46'46,70"S, 57°51'38, 04" O), Fazenda Bahia (F2) (14°37'27,15"S, 57°25'15,84" O) e Fazenda Paraíso: (F3) (14°40'7,91"S, 57°23'14,15" O), conforme figura 1. As áreas de coletas possuem vegetação com características estacionais semidecíduais e submontanas (RADAM BRASIL 1982).

FIGURA 1: Mapa indicando as áreas de estudo localizadas nas Fazendas, município de Tangará da Serra – MT.

Foram realizadas duas coletas em cada ponto, totalizando seis amostras, sendo que cada amostra composta de solo foi constituída por cinco subamostras, obtidas da camada superficial do solo até 15 cm de profundidade, entre espaços de 3 a 10 metros e posteriormente, colocadas em sacos de polietileno esterilizados e armazenadas em caixas térmicas contendo gelo para a conservação conforme ADELL et al., (2002).

Isolamento e manutenção

As subamostras foram homogeneizadas e retirado 5,0 g, para a composição da amostra com 25,0 g para cada ponto. O isolamento foi realizado através da técnica de diluição seriada e alíquotas das suspensões foram inoculadas em placas

de Petri contendo meio BDA (Batata Dextrose Agar) contendo 200 mg.L⁻¹ do antibiótico cloranfenicol e incubadas em estufa tipo BOD a 28 °C por quatro dias. Após as linhagens foram purificadas e estocadas em tubos contendo meio BDA mantidas a 4 °C, segundo ADELL et al., (2002).

Seleção das linhagens

As 145 linhagens de fungos isoladas foram avaliadas para selecionar as melhores produtoras de enzimas celulases. As linhagens foram inoculadas com alça tipo agulha em placas de Petri contendo meio sintético contendo (CMC) carboximetilcelulose (10,0 g.L⁻¹) como única fonte de carbono, NaNO₃ (3,0 g.L⁻¹), K₂HPO₄ (1,0 g.L⁻¹), MgSO₄ (0,5 g.L⁻¹), KCl (0,5 g.L⁻¹), FeSO₄·7H₂O (10,0 mg.L⁻¹), ágar (20,0 g.L⁻¹). O pH foi ajustado em ± 6,8 e incubadas por 5 dias a 28 °C, em estufa bacteriológica. Após as placas foram submetidas a choque térmico por 16 h a temperatura de 50 °C. Posteriormente, adicionou-se 10 mL de solução corante vermelho congo a 2,5 g.L⁻¹ em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8,0. Decorrido 30 minutos a solução foi descartada e as culturas foram lavadas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M no mesmo tampão de acordo com NOGUEIRA & CAVALCANTE (1996).

O índice enzimático foi mensurado com um paquímetro em a relação ao diâmetro do halo de degradação e o diâmetro do halo da colônia de acordo com RUEGGER & TAUKE-TORNISIELO (2004). As colônias que apresentaram índice enzimático foram selecionadas para avaliação da produção de endoglucanase (CMCase).

Avaliação da atividade de CMCase

Para a avaliação da produção de CMCase, as 74 linhagens fúngicas selecionadas foram cultivadas meio sintético contendo (CMC) (10,0 g.L⁻¹), NaNO₃ (3,0 g.L⁻¹), K₂HPO₄ (1,0 g.L⁻¹), MgSO₄ (0,5 g.L⁻¹), KCl (0,5 g.L⁻¹), FeSO₄·7H₂O (10,0 mg.L⁻¹) e ágar (20,0 g.L⁻¹), pH ajustado em 5,0 e esterilizados a 121 °C por 15 minutos. Após cada frasco foi inoculados com 2 mL de uma suspensão 1 x 10⁷ esporos.mL⁻¹ e incubados em cultivo estático em estufa Bacteriológica (BOD) a temperatura de 28 °C, durante 14 dias, de acordo com RUEGGER & TAUKE-TORNISIELO (2004). O cultivo foi realizado em duplicatas.

Determinação da produção de CMCase

A atividade de CMCase foi determinada através da mistura de 10 mL de tampão acetato de sódio 50Mm pH 5,0, 5mL extrato enzimático e 1,0% de CMC. Após, a mistura foi incubada a 50 °C, por 90 minutos. Nos tempos determinados alíquotas de 0,5 mL da mistura foram retiradas e transferidas para tubos, onde a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS) e os conteúdos foram fervidos por 5 minutos. Após o resfriamento foi adicionado 5 mL de água destilada, e a mistura foi lida em espectrofotômetro na absorvância de 540 nm. A quantidade de açúcar redutor liberado foi determinado usando a glicose como padrão de acordo com a metodologia de MILLER (1959). Uma unidade de atividade da enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de produto formado por minuto nas condições do ensaio. Para avaliação da produção enzimática das linhagens de fungos filamentosos mais promissores foi realizado o tratamento estatístico através do Teste agrupamento Scott-Knott.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação da atividade de celulase das 145 linhagens isoladas e cultivadas em meio contendo CMC utilizando-se a coloração com vermelho congo pode-se identificar que 50,68% (74) das linhagens apresentaram (le) índice enzimático e 49,30% (72) não apresentaram halo ou não cresceram. As linhagens que se destacaram na atividade de hidrólise de CMC foram às linhagens 26 com 9,26, 12 com 7,0 e a 19 com 6,35, revelando maiores índices enzimáticos e diferindo estatisticamente das demais linhagens avaliadas, conforme observado na Tabela 1.

Os resultados obtidos neste estudo possibilitam inferir que o ambiente onde as coletas foram realizadas favoreceu a obtenção de linhagens produtoras de celulases, tendo em vista que a floresta Amazônica são áreas com muita serapilheira, ou seja, rico em biomassa o que favorece e estes ambientes são preferencias para o desenvolvimento de fungos com atividade devido a sua capacidade de produção e secreção de enzimas lignocelulósicas para degradação da biomassa (VALÊNCIA et al., 2013). De acordo com RIBEIRO et al. (2014) o Brasil tem uma grande diversidade de micro-organismos por compreender um vasto território físico, onde existem grandes áreas de florestas e a diversidade vegetal, e ainda poucos estudados. Os autores enfatizam que além de identificar fungos filamentosos produtores de celulase, podem ainda encontrar outros fungos com excelentes produtores de xilanases e lacases.

As linhagens que apresentaram (le) cultivadas em meio contendo CMC como fonte de carbono foram avaliadas para produção de CMCase. Os resultados obtidos demonstraram que sete linhagens, identificadas como 12, 26, 42, 45, 60, 63 e 72 apresentaram produção enzimática de CMCase variando de 0,63 a 0,8 U.mL⁻¹, deferindo estatisticamente das demais linhagens avaliadas (Tabela 2). Observamos que os resultados para a atividade de CMCase destas linhagens poderiam ser melhoradas com a suplementação de outras fontes de carbono. EI-HADI et al., (2014) relatam a produção de CMCase por *Aspergillus horatai* em meio líquido, após 96h de cultivo, conseguiram obter uma produção máxima de 0,23 U.mL⁻¹, entretanto, quando suplementaram o meio com lactose a atividade de CMCase aumento para 1,18 U.mL⁻¹. Isto indica que vários fatores podem afetar a bioconversão da celulose, como o tempo de cultivo, quantidade do inóculo, valores de pH, temperatura ideal e meio de cultivo.

RUEGGER & TAU-K-TORNISIELO (2004) em estudos com fungos filamentosos isolados de amostras de solo e selecionados através da técnica de halo da hidrólise enzimática observaram le somente em 45% das linhagens de fungos. Já LIAO et al., (2015) cultivando a linhagem *Penicillium oxalicum* GZ-2 em meio contendo casca de arroz obtiveram uma atividade para CMCase de 2,0 U.mL⁻¹ e JUNG et al., (2015) em estudo com outra linhagem de *Penicillium* sp. isolado de amostras de solo cultivado em meio mineral contendo celulase microcristalina como fonte de carbono apresentou atividade enzimática para CMCase de 1,27 U.mL⁻¹.

Atualmente, as celulases estão sendo aplicadas na produção de etanol de segunda geração em que incluem tecnologia de enzimas e de processos de pré tratamento de resíduos para conversão de celulose/hemicelulose em açúcares fermentáveis (DIAS et al., 2011). Outra tendência é o grande interesse no desenvolvimento de tecnologias limpas e sustentáveis que possibilitem a utilização de produtos de interesse biotecnológico e de processos, com o menor impacto ambiental possível (JEGATHEESAN et al., 2009).

TABELA 1 Atividade da celulase através do índice enzimático de fungos filamentosos cultivados em meio sintético (CMC). Øh = média do diâmetro do halo (mm); Øc = média do diâmetro da colônia (mm); le = índice enzimático.

Linhagens	Øh	Øc	IE	Linhagens	Øh	Øc	IE
1	20,25	12,25	1,57 a	38	55,25	22,50	2,74 b
2	17,75	11,25	1,49 a	39	33,25	25,50	1,29 a
3	9,00	8,50	1,38 a	40	43,25	35,25	2,79 b
4	13,25	12,70	1,32 a	41	38,75	19,75	1,63 a
5	13,00	10,00	1,32 a	42	20,50	9,50	2,45 b
6	7,75	7,50	1,48 a	43	28,75	10,00	3,15 b
7	22,00	17,25	1,32 a	44	20,75	15,75	1,55 a
8	41,50	40,00	1,38 a	45	56,25	49,75	1,12 a
9	11,50	6,75	1,70 a	46	12,75	11,50	1,25 a
10	28,75	23,50	1,23 a	47	24,00	11,25	2,48 b
11	16,30	11,50	2,43 b	48	15,00	7,75	1,23 a
12	25,00	3,75	7,00 c	49	18,25	10,25	1,56 a
13	6,00	3,25	1,53 a	50	6,50	5,00	1,45 a
14	20,25	8,00	1,28 a	51	17,75	12,50	1,46 a
15	62,75	54,50	1,15 a	52	18,25	10,00	1,47 a
16	32,25	13,00	2,42 b	53	26,75	15,25	1,34 a
17	13,50	3,25	2,65 b	54	24,00	12,25	1,95 b
18	38,20	28,70	1,39 a	55	28,00	17,25	1,76 a
19	11,00	6,00	6,35 c	56	60,50	55,25	2,31 b
20	18,00	8,75	1,54 a	57	20,00	8,75	1,34 a
21	21,25	11,50	2,27 b	58	30,50	11,00	1,27 a
22	59,50	56,70	1,91 b	59	12,74	8,75	2,05 b
23	9,75	4,00	1,17 a	60	33,75	28,50	2,22 b
24	29,75	12,50	2,39 b	61	13,00	7,25	1,93 b
25	27,00	22,25	1,40 a	62	19,25	13,25	2,03 b
26	21,00	8,25	9,26 d	63	25,75	25,75	1,14 a
27	33,75	13,50	1,47 a	64	22,00	9,25	1,93 b
28	23,00	7,75	2,75 b	65	25,50	20,75	1,61 a
29	17,25	11,75	1,51 a	66	25,00	18,25	1,98 b
30	26,25	8,25	3,59 b	67	20,50	14,25	1,43 a
31	54,50	38,50	2,40 b	68	20,75	10,75	1,86 b
32	57,25	48,50	2,13 b	69	10,50	3,75	2,20 b
33	18,00	17,00	1,05 a	70	22,75	10,00	1,60 a
34	23,00	14,50	1,99 b	71	23,25	11,25	2,09 b
35	16,25	10,75	2,48 b	72	16,00	12,25	2,20 b
36	47,25	32,75	1,25 a	73	21,25	17,25	2,05 b
37	54,00	30,00	2,73 b	74	13,25	11,50	1,82 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 2. Determinação da atividade de CMase das linhagens de fungos filamentosos, cultivados em meio sintético (CMC).

Linhagens	U.mL ⁻¹	Linhagens	U.mL ⁻¹
1	0,26 b	38	0,43 d
2	0,43 d	39	0,33 c
3	0,26 b	40	0,40 d
4	0,54 e	41	0,18 b
5	0,01 a	42	0,63 f
6	0,40 d	43	0,34 c
7	0,32 c	44	0,22 b
8	0,32 c	45	0,63 f
9	0,50 b	46	NO a
10	0,23 b	47	0,24 b
11	0,45 c	48	0,30 c
12	0,74 f	49	0,40 d
13	0,44 d	50	0,47 d
14	0,50 e	51	0,33 c
15	0,05 a	52	0,52 e
16	0,28 b	53	0,27 b
17	0,24 b	54	0,13 b
18	0,25 b	55	0,16 b
19	0,23 b	56	0,33 b
20	0,44 d	57	0,33 c
21	0,25 f	58	0,34 c
22	0,22 b	59	0,01 a
23	0,33 b	60	0,63 f
24	0,11 a	61	0,20 a
25	0,20 a	62	0,21 b
26	0,80 f	63	0,63 f
27	0,47 d	64	NO a
28	0,34 c	65	0,24 b
29	0,23 b	66	0,22 b
30	0,30 a	67	NO a
31	0,24 b	68	NO a
32	0,33 c	69	0,12 a
33	0,24 b	70	0,16 b
34	0,25 b	71	0,34 c
35	0,25 b	72	0,70 f
36	0,27 b	73	0,07 a
37	0,16 b	74	0,13 b

NO = atividade enzimática não observada. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

GERHARDT; et al, (2015) em estudos com fungos filamentosos isolados da região Amazônica no norte do Estado de Mato Grosso, cultivaram oito linhagens de fungos pré selecionados em meio contendo CMC como fonte de carbono e avaliaram a atividade de CMCase, constataram que as linhagens de *Aspergillus* I e *Penicillium* II apresentaram atividade de CMCase de 0,71U.mL⁻¹ e 0,61 U.mL⁻¹, e

estas linhagens foram consideradas promissoras na atividade celulase. Ribeiro et al., (2014) destacam a importância de estudos com fungos isolados da floresta Amazônica produtores de celulasas e que ainda existem micro-organismos desconhecidos que podem ser excelentes produtores destas enzimas.

CONCLUSÃO

Das 146 linhagens de fungos filamentosos avaliadas 74 linhagens apresentaram índice enzimático, sendo que a linhagem 26 se destacou com maior índice enzimático 9,26. Entretanto, as linhagens que apresentaram índice enzimático a maioria produziram a enzima CMCase, indicando que a técnica através do halo de degradação de CMC é promissora para a seleção de fungos filamentosos com atividade celulolítica. As linhagens mais promissoras tiveram uma produção de CMCase variando de 0,74 U.mL⁻¹ a 0,80 U.mL⁻¹.

REFERÊNCIAS

- ADELL, C.; LUCON, C. M. M.; KOIKE, C. M. Biodiversidade do Gênero *Trichoderma* no estado de São Paulo - Aspectos enzimáticos e potencial biocontrolador. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, Supl. p. 188-191, 2002.
- CASTRO, A. M.; JUNIOR, N. P. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n.1, p. 181-188, 2010.
- DAMASO, M. C. T.; TERZI, S. C.; FARIAS, A. X.; OLIVEIRA, A. C. P.; FRAGA, M. E.; COURI, S. Selection of cellulolytic fungi isolated from diverse substrates. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n.4, p. 513-520, 2012.
- DIAS, M.O.; CUNHA, M.P.; JESUS, C.D.; ROCHA, G.J.; PRADELLA, J.G.; ROSSELL, C.E; FILHO, R.M.; BONOMI, A. Second generation ethanol in Brazil: can it compete with electricity production? **Bioresource Technology**, n.102, p. 8964–8971, 2011.
- EL-HADI, A. A.; EL-NOUR, S. A.; HAMMAD, A.; KAMEL. Z.; ANWAR, M. Optimization of cultural and nutritional conditions for carboxymethylcellulase production by *Aspergillus hortai*. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, p. 23-28, 2014.
- GERHARDT, J. A.; CARVALHO, I. F.; SILVA, M. L.; POLIZELI, M. L. T. M.; ALNOCH, R. C. Avaliação da atividade celulolítica de fungos filamentosos isolados de amostras de solo da região norte do estado de Mato Grosso. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n.21, p. 1971-1981, 2015.
- GOMES, J.; PURKARTHIOFER, H.; KAPLOMILLER, J.; SINNNER, M.; STEINER, W. Production of high level of cellulase-free xylanase by the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus* in laboratory and pilot scales using lignocellulosic materials. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 39, p. 700-707, 1993.

JUNA, H.; GUANGYEB, H., DAIWEN, C. Insights into enzyme secretion by filamentous fungi: Comparative proteome analysis of *Trichoderma reesei* grown on different carbon sources. **Journal of Proteomics**, v. 89, p. 191-201, 2013.

JEGATHEESAN, V., LIOW, J.L., SHU, L., KIM, S.H., AND VISVANATHAN, C. *The need for global coordination in sustainable development*. **Journal of Cleaner Production**, v. 7, n.17, p. 637-643, 2009.

JUNG. Y. R.; PARK. J. M.; HEO. S.Y.; HONG. W. K.; LEE. S. M.; OH. B. R.; PARK. S. M.; SEO. J.W.; KIM. C. H. Cellulolytic enzymes produced by a newly isolated soil fungus *Penicillium* sp. TG2 with potential for use in cellulosic ethanol production. **Renewable Energy**, v. 76, p. 66-71, 2015.

LIAO, H.; FAN, X.; MEI, X.; WEI, Z.; RAZA, W.; SHEN, Q.; XU, Y. Production and characterization of cellulolytic enzyme from *Penicillium oxalicum* GZ-2 and its application in lignocellulose saccharification. **Biomass and Bioenergy**, v. 74, p. 122-134, 2015.

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

NOGUEIRA, E. B. S.; CAVALCANTI, M. A. Q. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. **Revista de Microbiologia**, v. 27, n.1. p. 7-9, 1996.

RADAMBRASIL, Projeto: levantamento de recursos naturais. Brasil. **Boletim Técnico**. Ministério das Minas e Energia. Folha SD. 1 Cuiabá. Rio de Janeiro, v. 26, p. 25-175, 1982.

RIBEIRO, L. F. C.; RIBEIRO, L. F.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M.L.T.M. Screening of Filamentous Fungi for Xylanases and Cellulases Not Inhibited by Xylose and Glucose. **British Biotechnology Journal**, v. 4, n.1, p. 30-39, 2014.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO. S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n.2, p. 205-211, 2004.

SIMÕES, M. L. G.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Comparação da técnica tradicional e do método turbidimétrico automatizado no cultivo em diferentes fontes de carbono de fungos filamentosos isolados de solo de área de caatinga. **Holos Environment**, v. 5, n.2, p. 94-103, 2005.

THIEME, M.; LEHNER, B.; ABELL, R.; HAMILTON, S. K.; KELLNDORFER, J.; POWELL, G. Fresh water conservation planning in data-poor areas: an example from a remote Amazonia basin (Madre de Dios River, Peru and Bolivia). **Biological Conservation**, v. 135, n.4, p. 484-501, 2007.

VALENCIA, E. Y.; CHAMBERGO, F.S.; Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 9-18, 2013.