

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CONSERVAÇÃO E  
MANEJO DE RECURSOS NATURAIS – NÍVEL MESTRADO

SANDRA SCHMIDT DE MORAES

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO DE XILANASE EXTRACELULAR POR  
*Penicillium brefeldianum* UTILIZANDO BAGAÇO DE CERVEJARIA E SUA  
APLICAÇÃO

CASCATEL-PR  
FEVEREIRO/2016

SANDRA SCHMIDT DE MORAES

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO DE XILANASE EXTRACELULAR POR  
*Penicillium brefeldianum* UTILIZANDO BAGAÇO DE CERVEJARIA E SUA  
APLICAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Conservação e Manejo de Recursos Naturais – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais

Área de Concentração: Conservação e Manejo de Recursos Naturais

Orientadora: Marina Kimiko Kadowaki

CASCADEL-PR  
FEVEREIRO / 2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M827p

Moraes, Sandra Schmidt de

Produção, caracterização de xilanase extracelular por *Penicillium brefeldianum* utilizando bagaço de cervejaria e sua aplicação. / Sandra Schmidt de Moraes. Cascavel, 2016.

32 p.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marina Kimiko Kadowaki

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2016

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Conservação e Manejo de Recursos Naturais

1. Celulases. 2. Fungos. 3. Hemicelulase. 4. Hidrólise. 5. Resíduos. I. Kadowaki, Marina Kimiko. II. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. III. Título.

CDD 21.ed. 572.3

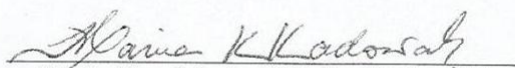
CIP-NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Beijo – CRB 9<sup>a</sup>/965

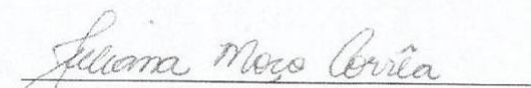
**SANDRA SCHMIDT DE MORAES**


**“Produção, Caracterização de Xilanase Extracelular por *Penicillium brefeldianum*  
Utilizando Bagaço de Cervejaria e Sua Aplicação”.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação stricto sensu em Conservação e Manejo de Recursos Naturais-Nível de Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, pela comissão Examinadora composta pelos membros:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Marina Kimiko Kadowaki

Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente/Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Juliana Moço Corrêa  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Samara Ernandes  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Aprovada em 26 de Fevereiro de 2016.

Local da defesa: Unioeste, Prédio de Salas de Aula, sala 56, Cascavel-PR.

*A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.*

(Albert Einstein)

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus pelo dom da Vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais da Unioeste, seus servidores, docentes e colegas, pela oportunidade de realização do mestrado e pelo auxílio prestado.

A Fundação Araucária pela concessão de 11 meses da bolsa de estudo.

A minha querida orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marina Kimiko Kadowaki pelos ensinamentos, paciência, amizade e tudo o que compartilhamos neste caminho trilhado. O valor é incomensurável!.Obrigada!

Aos professores da Bioquímica: Alexandre, Rita e José Luis por toda ajuda dispensada e também pelas boas risadas, obrigada!

Aos meus amados colegas de laboratório, pela paciência, pela amizade, pela parceria incondicional, pelos incontáveis momentos de descontração, pelos momentos de stress que também não foram poucos, pelos “empurrões” nos momentos de desânimo, pela companhia, pela troca de experiências e por tudo mais que eu possa ter esquecido... mas principalmente por serem pessoas tão maravilhosas! Obrigada Vanessa!!! Obrigada Carla!! Obrigada Giovane! Obrigada Juliana! Obrigada Jaina! Obrigada Letícia! Obrigada Laysa! Obrigada Carol! Obrigada Débora! Sem vocês o caminho teria sido muito mais difícil!

Obrigada também aos colegas que já passaram por aqui e deixaram imensas saudades! Diandra, Alesandra, Taiomara, Josielle, Luciana, Fabíola, Paulo e Ariane! Obrigada a todos!

Á minha mãe e irmã, pelo apoio incondicional, compreensão e amor!

Obrigada a todos os meus amigos em especial as minhas amadas Naissara, Siliane, Rozilda e Liziane por sempre acreditarem em mim!

Á minha filha Verônica e ao meu esposo Claudiomiro pelo carinho e amor! Pela paciência e compreensão das minhas ausências! Pelo apoio incondicional!

Obrigada a todos que de alguma maneira contribuíram para elaboração deste trabalho!

## SUMÁRIO

RESUMO .....	i.
ABSTRACT .....	ii.
INTRODUÇÃO.....	09
MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
Isolamento, identificação e manutenção do microrganismo.....	10
Condições de cultivo.....	11
Ensaio enzimáticos.....	11
Efeito do pH e temperatura sobre a atividade de xilanase.....	11
Gel SDS-PAGE e zimograma .....	12
Pré-tratamento dos resíduos com NaOH.....	12
Sacarificação enzimática de resíduos .....	12
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	13
Identificação taxonômica do fungo.....	13
Influência do tempo de cultivo na produção de enzimas .....	13
Efeito do pH e temperatura na atividade de xilanase.....	14
Zimograma .....	14
Sacarificação enzimática dos resíduos com extrato bruto de <i>P. brefeldianum</i> .....	14
CONCLUSÕES.....	16
REFERÊNCIAS .....	16
FIGURAS.....	19
Figura 1. Produção de enzimas hemicelulolíticas e pectinolítica do extrato bruto de <i>P. brefeldianum</i> em cultivo líquido suplementado com 1% (p/v) de bagaço de cervejaria em condições estacionárias a 28°C .....	19
Figura 2. Produção de enzimas do complexo celulolítico do extrato bruto de <i>P. brefeldianum</i> em cultivo líquido suplementado com 1% (p/v) de bagaço de cervejaria em condições estacionárias a 28°C.....	19

Figura 3. Influência do pH (a), temperatura (b), estabilidade do pH (c) e estabilidade térmica (d) na atividade de xilanase do <i>P. brefeldianum</i> obtida de cultivo líquido suplementado com 1% (p/v) de bagaço de cerveja em condições estacionárias por 9 dias a 28°C.....	20
Figura 4. Zimograma do extrato bruto enzimático de <i>P. brefeldianum</i> obtido de cultivo líquido estacionário utilizando bagaço de cervejaria como fonte de carbono. <b>Linha M</b> - marcador de peso molecular (Fosforilase b (97 kDa), Albumina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anidrase Carbônica (30 kDa), Inibidor de tripsina (20,1kDa) e $\alpha$ -lactalbumina (14,4kDa). <b>Linha Xil</b> – extrato bruto enzimático.....	21
Figura 5. Efeito de sacarificação enzimática de agro-resíduos (pré-tratados ou não com NaOH) com extrato bruto de <i>P.brefeldianum</i> . a) açúcares redutores obtidos após sacarificação dos resíduos <i>in natura</i> (sem tratamento com alcali); b) açúcares redutores obtidos após sacarificação enzimática dos resíduos pré-tratados com NaOH 1% a 30°C por 12 horas. c) Açúcares redutores obtidos após sacarificação dos resíduos pré-tratados com NaOH 1% a 121°C por 30 minutos....	22
Figura 6. Produção de pentoses após sacarificação enzimática com extrato bruto de <i>P. brefeldianum</i> dos resíduos <i>in natura</i> (controle) e pré-tratados com NaOH .....	23
ANEXO I. Normas para publicação científica no periódico Semina: Ciências Agrárias, UEL .....	24



## **Produção, Caracterização de xilanase extracelular por *Penicillium brefeldianum* utilizando bagaço de cervejaria e sua aplicação**

### **Resumo**

A produção de enzimas xilanolíticas tem sido amplamente explorada nos últimos anos por diversas espécies de fungos filamentosos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de xilanases por *Penicillium brefeldianum*, um fungo filamentoso isolado da Mata Atlântica do Paraná, utilizando bagaço de cervejaria para avaliar seu potencial na sacarificação de resíduos agroindustriais. O extrato enzimático foi obtido a partir de cultivo líquido contendo 1% de bagaço de cervejaria (p/v) e cultivado em condições estacionárias a 28° por 9 dias. O fungo apresentou versatilidade em produzir diversas enzimas tais como: xilanase (830 U mL<sup>-1</sup>), pectinase (295 U mL<sup>-1</sup>), β-glicosidase (29,45 U mL<sup>-1</sup>), avicelase (13,71 U mL<sup>-1</sup>) β-xilosidase (3,46 U mL<sup>-1</sup>), celulase (1,89 U mL<sup>-1</sup>) e Fpase (0,60 U mL<sup>-1</sup>). A xilanase produzida por esse fungo apresentou pH ótimo de atividade enzimática de 4,5 e estabilidade de 98% na faixa de pH 2,5 a 8,0 por até 96 horas. A temperatura ótima de atividade da xilanase foi 55°C com meia vida de 90 minutos. No processo de sacarificação enzimática de resíduos (bagaço de cana, bagaço de cervejaria, palha de arroz, palha de milho, palha de trigo, sorgo biomassa) com extrato bruto de *P. brefeldianum* foi obtido que o bagaço de cervejaria apresentou melhor resultado sem qualquer tipo de pré-tratamento, exibindo 35% de sacarificação. Porém, o pré-tratamento dos resíduos com NaOH 1% a 30°C por 12 horas ou a 121°C e pressão de 1 atm por 30 minutos resultaram em melhores rendimentos de açúcares redutores totais. E dentre os resíduos sacarificados, o bagaço de cervejaria (60%) liberou maior quantidade de açúcares totais, seguido de palha de trigo (58,73%), palha de milho (58%) sorgo biomassa (54%) e sorgo com baixa lignina (35%). Entretanto, as pentoses produzidas após sacarificação mostraram que o tratado com NaOH (121°C e pressão de 1 atm) apresentou 7,35 vezes mais pentoses quando comparado ao *in natura*, seguido de casca de arroz (5,52 vezes) e sorgo biomassa (4,39 vezes). Dessa forma, o fungo filamentoso *P. brefeldianum* isolado da Mata Atlântica do Oeste do Paraná foi capaz de utilizar o bagaço de cervejaria como indutor de hemicelulases, celulases e pectinases, além disso, exibiu potencial de sacarificação de resíduos agroindustriais para produção de açúcares redutores.

**Palavras chave:** Celulases, Fungos, Hemicelulase, Hidrólise, Resíduos

## **Production, Characterization of extracellular xylanase by *Penicillium brefeldianum* using brewers spent grain and its application**

### **Abstract**

The production of xylanolytic enzymes have been widely explored in the past few years by several species of filamentous fungi. The objective of this study was to evaluate the production of xylanases by *Penicillium brefeldianum* an isolated filamentous fungus of Parana Atlantic Forest using brewers spent grain and evaluate its potential in the agro-waste saccharification. The enzyme extract was obtained from liquid culture using 1% (w / v) brewers spent grain in modified under stationary conditions at 28 ° for 9 days. The fungus had large capacity in the production of xylanase (830 U mL<sup>-1</sup>), pectinase (295 U mL<sup>-1</sup>), β-xylosidase (3,46 U mL<sup>-1</sup>), FPase (0,60 U mL<sup>-1</sup>), avicelase (13, 71 U ml<sup>-1</sup>), cellulase (1.89 U mL<sup>-1</sup>) and β -glycosidase (29,45 U mL<sup>-1</sup>). The optimum pH of 4.5 was found for xylanase and stability in 98% range of 2.5 to 8.0 for 96 hours. The optimum temperature was 55 °C with a half life of 90 minutes. The zymogram of the crude extract of *P. brefeldianum* exhibited three bands of xylanase activity with molecular masses of 60 and 97kDa. *P. brefeldianum* crude enzymatic extract was used for saccharification of various waste (sugarcane bagasse, brewers spent grain, rice straw, corn stover, wheat straw, sorghum biomass and sorghum low-lignin) untreated and previously treated with NaOH 30°C for 12h (NaOH30) and at 121°C for 30 minutes (NaOH121). The best results were obtained with waste treated under high pressure and temperature (121°C). Among waste, wheat straw showed higher amount of total sugar (63%) released after the enzymatic hydrolysis, followed brewers spent grain (60%), corn straw (58%), sorghum biomass (54%) and sorghum low-lignin (35%). The pentose released after saccharification showed that sorghum low-lignin treated at high temperature and pressure was the best substrate releasing 7,35 times more pentose compared to sorghum low-lignin untreated, followed by straw rice (5,52x) and sorghum biomass (4,39x). Thus, the filamentous fungus *P. brefeldianum* isolated from the West of Paraná Atlantic Forest was able to use the brewers spent grain as inductor of various degrading enzymes the cell wall, and furthermore, showed potential for saccharification of lignocellulosic biomass from agro-waste.

**Keywords:** Cellulases, Fungi, Hemicellulase, Hydrolysis, Waste.

## Introdução

O Brasil produziu em 2014, quatorze bilhões de litros de cerveja, mantendo o terceiro lugar no ranking mundial de produção, atrás apenas da China e Estados Unidos (CERVBRASIL, 2015). Consequentemente, essas indústrias cervejeiras produzem elevadas quantidades de resíduos e o bagaço de malte é o principal subproduto, pois a cada 100 litros de cerveja produzida, são gerados entre 14 a 20 kg desse subproduto (MUSSATO et al., 2006; CORDEIRO et al., 2012). Apesar das grandes quantidades de bagaço geradas ao longo do ano pelas indústrias cervejeiras brasileiras, este resíduo ou subproduto, que consiste basicamente da casca do grão de cevada obtido após a fervura do malte moído para preparação do mosto, é uma fonte interessante de material lignocelulósico, pois contém açúcares (glicose, xilose e arabinose) e até o momento, tem recebido pouca atenção quanto ao seu uso, exceto como ração animal (AQUARONE, 2001; MUSSATO e ROBERTO, 2006).

Atualmente, grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos são gerados anualmente, oriundos de atividades agrícolas, pelas indústrias de papel celulose, indústrias de madeira, resíduos de fibras de indústrias têxteis, resíduos de cereais, e ainda resíduos sólidos urbanos (OKAFOR et al., 2007). Somente na América Latina, 500 milhões de toneladas de resíduos e subprodutos agroindustriais foram produzidas ao ano, sendo o Brasil responsável por mais da metade desse número (SOUZA et al., 2007). Dentro desse contexto, há um interesse crescente da comunidade científica no uso eficiente desses resíduos agroindustriais para, inclusive, dar um destino ecologicamente correto.

Nesse sentido, a bioconversão de materiais lignocelulósicos para produtos de alto valor agregado podem necessitar de etapas de pré-tratamento (mecânicos, químicos ou biológicos) e hidrólise dos polímeros para produzir moléculas facilmente metabolizáveis como hexoses ou pentoses, para obtenção de produtos químicos. Além do etanol, vários outros produtos podem ser obtidos a partir da sacarificação de biomassa lignocelulósica, por exemplo: a xilose contida em hemiceluloses pode ser transformada em furanos, ácidos orgânicos de cadeia curta (ácidos fórmico, acético e propionico) e xilitol (SANCHEZ, 2009).

Resíduos lignocelulósicos podem ser utilizados como substratos para crescimento de fungos, bem como na indução de várias enzimas, entre elas, as celulasas, pectinases, hemicelulasas (xilanases) e ligninases através de cultivo em estado sólido ou submerso (MARTINS et al., 2011; SHARMA e KUMAR, 2013). Xilanases são hidrolases capazes de catalisar a hidrólise do xilano e, devido à sua estrutura heterogênea, demandam de um complexo xilanolítico para sua total degradação. Os componentes desse sistema que têm sido mais extensivamente estudados são as endoxilanases e as  $\beta$ -xylosidases, dependendo de sua origem biológica, uma ou mais isoformas de endo-1,4- $\beta$ -xilosidase (1,4- $\beta$ -D-xilano-hidrolase, EC 3.2.1.8) clivam o xilano randomicamente em suas ligações  $\beta$ -1,4 em pequenos fragmentos como xilotriose e xilobiose (KRONBAUER et al., 2007). A xilanase é uma enzima industrialmente importante devido às suas aplicações biotecnológicas tais como: bioconversão de material lignocelulósico e agro-resíduos em produtos fermentescíveis, clarificação de sucos, melhoramento da consistência de cerveja e a digestibilidade de rações para animais (WONG et al., 1988; MOTTA et al., 2013).

Vários organismos são produtores de xilanase, incluindo bactérias, fungos e protozoários. Destes, os fungos são particularmente interessantes devido a capacidade de secretar elevadas quantidades de enzimas

para o meio extracelular quando comparadas às bactérias (NIGAM, 2013; OKAFOR et al., 2007). Os gêneros que compreendem as espécies de fungos: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* são exemplos de microrganismos que podem produzir isoenzimas xilanolíticas. *Penicillium* está entre o gênero mais comum de microrganismos saprófitos encontrados na natureza e numerosas espécies são de especial valor para a humanidade, como por exemplo, o *Penicillium notatum*, produtor de antibióticos como a penicilina, e outros como o *Penicillium roqueforti* e *Penicillium camemberti* importante na indústria de alimentos onde estão associados com a produção de tipos específicos de queijo (CHÁVEZ, 2006).

A produção de enzimas xilanolíticas pelo fungo do gênero *Penicillium* tem sido explorada ao longo dos anos (ABDEL-SATER e EL-SAID, 2001; KNOB e CARMONA, 2010; KROGH et al., 2004; MEDEIROS et al., 2007; TERRASAN et al., 2010), entretanto, ainda não existem relatos do uso de *Penicillium brefeldianum* (sinônimo: *Eupenicillium brefeldianum* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser>) em bioprocessos para a produção de enzimas ou sacarificação de biomassa lignocelulósica. O *P. brefeldianum* é um fungo filamentosso saprófito comumente encontrado em solos, tem sido descrito como produtor de Brefeldina A, um antibiótico de lactona envolvida na inibição do transporte de proteínas do retículo endoplasmático ao Complexo de Golgi (WANG et al, 2012) e também como produtor de uma substância fungicida capaz de prevenir o desenvolvimento da doença de manchas foliares de couve mostarda, causadas por *Alternaria brassicicola* (CHEN et al, 2014). Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi investigar a produção de xilanase por *P. brefeldianum* utilizando bagaço de cervejaria como fonte de carbono e avaliar potencial de sacarificação enzimática dos resíduos agroindustriais.

## Material e Métodos

### *Isolamento, identificação e manutenção do microrganismo*

O microrganismo utilizado neste estudo foi isolado a partir de amostras de solo do Refugio Biológico Bela Vista (bioma Mata Atlântica) localizado no município de Foz do Iguaçu-Paraná e mantido no acervo do laboratório de Bioquímica de Microrganismo da Universidade do Oeste do Paraná de Cascavel – PR. O fungo foi identificado taxonomicamente pela Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco (PE, Brasil) bem como pela análise dos produtos amplificados utilizando *primers* para genes ribossomais utilizando a metodologia descrita por White et al. (1990). O fragmento de DNA da região ITS (*Internal Transcrible Spaces*) foi amplificada com o par de oligonucleotídeos ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' direto) e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' reverso). Os produtos de PCR foram analisados em géis de agarose 1,0% e revelados com brometo de etídio. A purificação do produto de PCR e a determinação da sequência utilizando os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4 foram realizadas pela empresa Helixxa® (Campinas-SP, Brasil), em seguida foram comparadas com outras sequências depositadas no banco de dados do Centro Nacional de Informações em Biotecnologia (NCBI) utilizando a ferramenta básica de alinhamento local (BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> website) para identificação taxonômica em nível de espécie.

### *Condições de cultivo*

O cultivo para obtenção do extrato enzimático por *P. brefeldianum* foi realizado em Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL meio mineral Czapek pH 7,0 (WISEMAN, 1975), suplementados com 1% (p/v) de bagaço de cervejaria como fonte de carbono. Esterilizou-se o meio em autoclave durante 20 min a 121°C e inoculados com 1mL de suspensão de  $1 \times 10^5$  esporos/mL. As culturas foram incubadas a 28°C em câmara incubadora BOD por até 12 dias em condições estacionárias. As culturas foram filtradas com auxílio de bomba a vácuo com funil de Büchner, e o filtrado obtido foi utilizado para determinação de atividade enzimática. Todos os cultivos foram realizados em triplicata.

### *Ensaio enzimáticos*

As atividades de xilanase foram quantificadas adicionando 50µl de enzima (diluída quando necessária) e 50µl do substrato xilano beechwood 1% (Sigma-Aldrich) e incubadas a 55°C por 10 minutos. As atividades de celulase (CMCase), avicelase, mananase e amilase foram analisadas incubando-se 50µl de enzima e 50µl de substratos (Carboximetilcelulose 1%, avicel 1%, LBG (locust bean gum) 0,5% e amido 1%, respectivamente) dissolvidos em tampão citrato de sódio 50mM pH 4,5, e incubadas a 40°C por 30 minutos. As condições de ensaio de pectinase (PGase) utilizou 50 µl de pectina cítrica (1%) com 50µl de enzima e incubados a 40°C por 10 minutos. A atividade de celulase em papel de filtro (FPase) foi ensaiada adicionando-se 500µl de enzima em 500µl de substrato, contendo 1% de papel filtro Whatman nº 1 picado (5mm) e incubadas a 40°C por 60 minutos. Em seguida, interromperam-se as reações por aquecimento em banho fervente por 5 minutos e após diluiu-se com 1mL de água destilada. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 540 nm.

As atividades enzimáticas foram quantificadas pelos açúcares redutores liberados nas reações pela adição da solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico - DNS (MILLER, 1959), utilizando glicose, xilose ou ácido monogalacturônico como padrão. Definiu-se a unidade de atividade enzimática como sendo a quantidade de micromoles de açúcares redutores liberados por 1mL em 1 minuto ( $U mL^{-1}$ ), nas condições de ensaio. As atividades de  $\beta$ -xilosidase e  $\beta$ -glicosidase foram determinadas utilizando como substratos o p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilanopiranosideo (pNPX) e p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosideo (pNPG), respectivamente. A mistura consistiu de 125µL de pNPX e pNPG a 2mM preparado em tampão acetato de sódio 50mM pH 4,5 e 25µL de extrato bruto de *P. brefeldianum*. Incubou-se a reação em banho maria por 60 minutos e esta foi interrompida por adição de 500µL de solução saturada de tetraborato de sódio, quantificada a 410nm. Uma unidade de atividade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de nitrofenol por minuto. Todas as dosagens enzimáticas foram realizadas em triplicata.

### *Efeito de pH e temperatura sobre a atividade de xilanase*

Os ensaios para determinação de pH ótimo e temperatura na atividade de xilanase, foram realizados com extrato bruto de *P. brefeldianum*. Para analisar a influencia do pH na atividade da enzima, incubou-se o extrato bruto com 1% (p/v) de xilano de beechwood em tampão McIlvaine em diferentes valores de pH (2,5;

3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5). Para a determinação da temperatura ótima o extrato enzimático foi incubado em pH ótimo, em temperaturas que variaram de 37°C, 40 a 80°C, com intervalos de 5°C. A análise da estabilidade térmica de xilanase realizou-se nas mesmas temperaturas, por até 6 horas de reação. A estabilidade ao pH foi analisada incubando a enzima a 4° C com tampão McIlvaine, nos mesmos valores de pH testados por até 192 horas. Ao longo do tempo, as alíquotas foram retiradas e submetidas a ensaios enzimáticos a temperatura e pH ótimos para quantificação da atividade residual de xilanase pelo método de ácido 3,5-dinitrosalicílico - DNS (MILLER, 1959). Os resultados foram expressos como atividade relativa, sendo o tempo zero considerado como 100% de atividade. As dosagens foram realizadas em triplicata.

#### *Gel SDS-PAGE e Zimograma*

O gel de eletroforese foi preparado na concentração de 7,5% de acrilamida e polimerizado em placas de vidro (9,5 x 8,0 cm) à temperatura ambiente. A eletroforese (SDS-PAGE) foi realizada à temperatura ambiente com tampão Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e SDS 0,1%, pH 8,3, sob corrente de 40 mA e 180V. As amostras analisadas foram diluídas na proporção 1:1 em tampão de amostra (glicerol 20% (v/v), SDS 4% (p/v), azul de bromofenol 0,002% e Tris 0,12 M, pH 6,8). Após a corrida, o gel foi dividido, sendo uma parte do gel corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 para análise de bandas proteicas do extrato bruto e a outra metade para análise de atividade da enzima (zimograma) conforme a metodologia de Rehm et al. (1998) com algumas modificações. O gel de zimograma foi incubado durante 30 minutos em 0,5% (v/v) de Triton X-100 em temperatura ambiente. Após a lavagem em água destilada, o gel foi incubado com o substrato xilano 1% em tampão em condições ótimas de pH e temperatura por 30 minutos, corado com vermelho de congo 0,2% em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,0 e lavado com NaCl 1M até o aparecimento da banda de atividade enzimática.

#### *Pré-tratamento dos resíduos com NaOH*

Os resíduos agroindustriais como o bagaço de cana, resíduo de cervejaria, casca de arroz, palha de milho, palha de trigo, sorgo biomassa e sorgo com baixa lignina, foram lavados e secos em estufa a 80°C e, em seguida, foram realizados os pré-tratamentos conforme a metodologia descrita por Saha e Ghosh (2014), com algumas modificações. Os resíduos foram submetidos a dois tratamentos com NaOH 1% numa relação de 1:10 sólido/liquido; 1) tratamento com NaOH 1% em estufa a 30°C durante 12 horas; 2) tratamento com NaOH 1% e autoclavados a 121°C e 1 atm de pressão por 30 minutos. Após o pré-tratamento com NaOH, os resíduos foram lavados com água destilada até a neutralidade e secos em estufa a 80°C.

#### *Sacarificação enzimática de resíduos*

Os resíduos foram dissolvidos em tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,5) na concentração de 1% (p/v), suplementados com 2,5 U mL<sup>-1</sup> extrato bruto de *P. brefeldianum* e incubados a 40°C em incubadora com agitação orbital de 100 rpm. As Alíquotas foram retiradas nos tempos zero, 2, 4, 6 e 12 horas e aquecidas em

banho fervente por 5 minutos, centrifugadas a 5.000 rpm a 4°C por 10 minutos. O processo de sacarificação dos resíduos foi monitorado por meio da quantificação de açúcares redutores totais pelo método de DNS (MILLER, 1959). Calculou-se a porcentagem de sacarificação conforme a metodologia de Baig et al. (2004). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A quantificação de pentoses livres foi analisada conforme o método de orcinol-férrico com o reativo de Bial (MORITA E ASSUMPCÃO, 2007). A reação foi composta de 500µL do reativo Bial com 1mL da amostra após sacarificação enzimática, em seguida, a mistura foi fervida até obter uma coloração verde azulada, utilizando-se do espectrofotômetro para a leitura das absorvâncias, a 660nm. Os dados foram normalizados, onde utilizou-se como branco da reação o tratamento sem adição de enzima, tendo a D-xilose como padrão.

## Resultados e Discussão

### *Identificação taxonômica do fungo*

O fungo filamentososo isolado da Mata Atlântica do Oeste do Paraná – Brasil, foi identificado taxonomicamente em nível de espécie por meio de análise morfológica pela Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco, bem como por amplificação e sequenciamento das regiões ITS do DNA ribossomal do fungo. A sequência obtida de 539pb mostrou 100% de similaridade com outras linhagens da espécie de *Penicillium brefeldianum*, e encontra-se depositada no banco de dados do NCBI (BLAST:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com código de acesso KU560628.

### *Influência do tempo de cultivo na produção de enzimas*

O estudo da produção de enzimas xilanolíticas por *P. brefeldianum* foi realizado previamente com alguns resíduos agroindustriais (palha de milho, bagaço de cervejaria, bagaço de cana e farelo de trigo), para definir a melhor fonte de carbono. Os resultados apontaram o bagaço de cervejaria como melhor indutor para a produção de xilanase. Assim, o extrato bruto do fungo obtido de cultivo líquido estacionário com bagaço de cervejaria foi utilizado para dosagens enzimáticas de: xilanase, celulase, pectinase, avicelase, Fpase, mananase, amilase, β-Xilosidase e β-Glicosidase. A atividade enzimática de xilanase com maior valor foi a observada no 9º dia de cultivo exibindo 830 U mL<sup>-1</sup> (Fig.1). Similarmente, Saha e Gosh (2014) avaliando o efeito de agro-resíduos na produção de xilanase por *P. citrinum* com farelo de trigo, obtiveram a atividade máxima de 878 U mL<sup>-1</sup> porém, em 48hs de cultivo submerso.

Kronbauer (2007) também investigou a produção de xilanases testando vários resíduos com *A. casingii* e obteve sua maior atividade (9,22 U mg<sup>-1</sup>) no 4º dia de fermentação em cultivo sólido utilizando bagaço de cervejaria. Este fungo produz também valores significativos de β-xilosidase (3,46 U mL<sup>-1</sup>) no 6º dia de cultivo. Em relação à produção de mananase, a maior atividade observada foi de 1,86 U mL<sup>-1</sup> no 8º dia de cultivo. A atividade amilásica não foi detectada no extrato bruto desse fungo. A pectinase teve sua produção aumentada gradualmente, atingindo a máxima atividade no 11º dia com 295 U mL<sup>-1</sup> revelando potencial deste fungo em produzir também enzimas pectinolíticas. A maior atividade de celulase encontrada no extrato bruto foi de 1,89 U mL<sup>-1</sup> no 7º dia de cultivo (Fig. 2). No entanto, valores de FPase (0,60 U mL<sup>-1</sup>),

$\beta$ -glicosidase (29,45 U mL<sup>-1</sup>) e avicelase (13,71 U mL<sup>-1</sup>) foram também determinados, sugerindo que *P. brefeldianum* é capaz de secretar enzimas do complexo celulolítico. Atividades enzimáticas de xilanase, CMCase,  $\beta$ -glicosidase e Fpase também foram descritas por Grigorevski-Lima et al. (2012) com o fungo *Trichoderma atroviride* 676 em cultivo de bagaço de cana (3% p/v) no 2º e 4º dias de cultivo. Falkoski et al. (2012) relataram a produção de xilanase, Fpase,  $\beta$ -glicosidase,  $\beta$ -xilosidase e mananase com cultivo de sabugo de milho por *Pycnoporus sanguineus* no 5º dia de fermentação, com destaque para produção de mananase (4,25U mL<sup>-1</sup>).

#### *Efeito do pH e temperatura na atividade de xilanase*

O pH ótimo encontrado para a xilanase do *P. brefeldianum* foi 4,5, um pH na faixa ácida (Fig. 3a). Porém, este pH ótimo é o mesmo encontrado por Knob e Carmona (2008) para xilanase de *P. sclerotiorum*. Terrasan e colaboradores (2013) também obtiveram pH ótimo na faixa ácida (5,0) com a xilanase produzida por *P. janczewskii*. A xilanase de *P. brefeldianum* exibiu também atividade enzimática em pH ácido (2,5 a 6,5) e exibiu 98% de atividade relativa numa ampla faixa de pH (2,5 a 8,0) por até 96 horas de incubação (Fig. 3b). Similarmente, Liao et al. (2012) relataram que a xilanase de *P.oxalicum* GZ-2 se manteve 90% na faixa de pH de 4,0 a 9,0 sendo a mais alta atividade observada em pH 4,0, porém o tempo de incubação foi de apenas 30 minutos.

A temperatura ótima encontrada para xilanase do *P. brefeldianum* foi 55°C (Fig. 3c). Esta temperatura está na faixa entre 50 e 60°C, muito comum entre as xilanases produzidas pelos gêneros *Penicillium* (CHAVEZ et al., 2006; KNOB E CARMONA, 2010; LIAO et al., 2012). A xilanase produzida por *P. brefeldianum* (Fig. 3d) manteve 100% da sua atividade na temperatura de 37°C, 90% a 40°C e 80% de atividade relativa a 45°C, por 6 horas; enquanto que a 50°C, a enzima manteve 100% da atividade enzimática durante 4 horas. Entretanto, a meia vida na temperatura ótima (55°C) foi de apenas 90 minutos. O conhecimento sobre a estabilidade térmica de enzimas é um parâmetro de extrema relevância para diferentes aplicações industriais.

#### *Zimograma*

No zimograma realizado com extrato bruto de *P. brefeldianaum* foi detectado multiplicidade de atividade xilanásica. A figura 4 mostra que o bagaço de cervejaria induziu a produção de três xilanases extracelulares de pesos moleculares distintos. A presença de múltiplas xilanases tem sido reportada em outras espécies de *Penicillium*.

Takenishi e Tsujisaka (1973) isolaram três endoxilanases a partir de *Penicillium janthinellum* em cultivos com farelo de trigo. Liao et al. (2012) constatou que *Penicillium oxalicum* cultivado em palha de trigo induziu a produção de 14 isoformas de xilanases em culturas com palha de trigo, 11 em culturas com palha de arroz e 10 em palha de milho. Segundo Chavez et al. (2002), a indução da expressão de xilanases mostrou ser dependente do tipo e da composição da fonte de carbono utilizada. A produção de várias xilanases é uma ocorrência comum em microrganismos devido à necessidade de conjunto de enzimas com



diferentes especificidades de substrato para hidrolisar o xilano eficientemente (BISCHOFF et al., 2009; CHAVEZ et al., 2002).

#### *Sacarificação enzimática dos resíduos com extrato bruto de *P. brefeldianum**

Os resíduos, bagaço de cana, bagaço de cervejaria, casca de arroz, palha de milho, palha de trigo, sorgo biomassa e sorgo com baixa lignina *in natura* (sem qualquer pré-tratamento) e pré-tratados com NaOH 1(%) a condições de alta temperatura e pressão (121°C e 1 atm) ou incubados em estufa a 30°C, foram submetidos ao processo de sacarificação enzimática com extrato bruto produzido por *P. brefeldianum*.

Dentre os resíduos testados *in natura*, o bagaço de cervejaria apresentou o melhor resultado, exibindo 35% de sacarificação (fig 5a). Este resíduo, oriundo do processo de aquecimento, cuja temperatura atinge 78°C para promover o processamento dos componentes de malte e do amido na indústria cervejeira, deve alterar a conformação das fibras, facilitando a ação de sacarificação enzimática desse resíduo.

Além disso, o pré-tratamento alcalino dos mesmos melhora na sacarificação enzimática, quando comparado ao controle (resíduos *in natura* não tratados com NaOH) (fig 5), conforme observado na diferença de rendimento do açúcar redutor entre os resíduos *in natura* (controle) aos tratados com NaOH (1%) a 121°C e pressão de 1 atm (Fig 5a e 5c). Como observado na figura 5c, a produção de açúcar redutor foi inexistente no processo de sacarificação do bagaço de cana *in natura* (sem pré-tratamento alcalino), enquanto que no resíduo pré-tratado com NaOH a alta temperatura e pressão (121°C e 1 atm de pressão) apresentou sacarificação de 38%.

Entretanto, o processo de sacarificação enzimática que exibiu melhores resultados foram os obtidos com resíduos pré-tratados com NaOH a 121°C e pressão de 1 atm. O bagaço de cervejaria liberou maior quantidade de açúcares totais (60%), seguido por palha de trigo (58,73%), palha de milho (58%) sorgo biomassa (54%) e sorgo com baixa lignina (35%) (Fig. 5c). O mesmo comportamento se repetiu com os resíduos pré- tratados com NaOH a 30°C, porém com menor produção de açúcares redutores. O rendimento máximo foi detectado com bagaço de cervejaria (39%), seguido por palha de trigo (38%), palha de milho (37%) e sorgo biomassa (28%) (Fig. 5b).

Essa diferença nos resultados de liberação de açúcares redutores entre as duas condições é atribuído somente na diferença de temperatura de pré-tratamento dos resíduos com NaOH 1%. Além disso, o tratamento com NaOH proporcionou a deslignificação dos resíduos, facilitando acesso para as enzimas de *P. brefeldianum* no processo de sacarificação dos resíduos, e assim resultou no aumento da liberação de açúcares redutores.

MCIntosh e Vancov (2010) obtiveram resultados similares quanto a liberação de açúcares totais da palha de sorgo pré-tratada com NaOH 2% a 121°C durante 60 minutos; resultando um rendimento 5,6 vezes maior em comparação com amostras pré-tratadas a 60°C na ausência de álcali. O tratamento alcalino é considerado o método mais eficaz para uso em resíduos agroindustriais para posterior aplicação na produção de etanol, pois produz baixos níveis de compostos como furfural e hidroximetilfurfural, que são inibidores do processo de fermentação (ALVIRA et al., 2010; FALKOSKI, et al., 2012). O sucesso da sacarificação de materiais lignocelulósicos está, principalmente, na retirada prévia de compostos inibidores bem como na

utilização de altas dosagens de enzima e uma reação de fermentação prolongada para suprimir elementos hostis (lignina, sais e outros inibidores), pois, segundo MCIntosh e Vancov (2010) estas condições duras e adversas também são conhecidas por impactar negativamente a produção de etanol.

O bom desempenho de sacarificação dos resíduos agroindustriais na presença de extrato enzimático de *P.brefeldianum* pode ser explicado também pela atividade elevada de enzimas hemicelulolíticas e pectinolíticas. A elevada quantidade de xilanase e pectinase presentes no extrato bruto não atuam diretamente na hidrólise da celulose, mas auxiliam na remoção de polissacarídeos não celulósicos (hemicelulose e pectina), que revestem as fibras de celulose, facilitando, dessa forma, o acesso de celulasas ao substrato (GOTTSCHALK et al., 2010).

Na figura 6 encontram-se os resultados de análise das pentoses após 12 horas de sacarificação enzimática dos resíduos. Pode-se observar que a formação das pentoses foi maior nos resíduos pré-tratados com NaOH a 121°C com alta pressão. A quantidade de pentoses produzidas foi elevada em todos os resíduos quando comparado ao controle (sem pré-tratamento com NaOH), porém o sorgo com baixa lignina foi o resíduo que mais se destacou, liberando 7,35 vezes mais açúcares, seguido da casca de arroz (5,52), sorgo biomassa (4,39), palha de milho (3,40), bagaço de cana (3,10), bagaço de cervejaria (2,52) e palha de trigo (2,42). A temperatura elevada (121°C) do pré-tratamento com NaOH e tempo de incubação com extrato enzimático de *P. brefeldianum* melhoraram o processo de sacarificação desses resíduos, e conseqüentemente a produção de pentoses. De acordo com MCIntosh e Vancov (2010), a temperatura elevada de pré-tratamento e o tempo de incubação somado a concentração de álcali resulta no aumento da liberação de xilose a partir da palha de sorgo ( pré-tratado com NaOH 2% a 121°C durante 60 minutos).

## Conclusão

O fungo filamentoso *P. brefeldianum* isolado recentemente do solo da Mata Atlântica do Oeste do Paraná foi ótimo produtor de enzimas, principalmente do complexo xilanolítico utilizando bagaço de cervejaria como fonte indutora. A elevada produção de xilanase por *P. brefeldianum*, bem como a estabilidade ao pH e a temperatura por períodos prolongados, mostraram-se promissoras para aplicações industriais e biotecnológicas. O extrato bruto do fungo foi capaz de sacarificar vários tipos de resíduos lignocelulósicos mostrando seu potencial na produção de açúcares fermentescíveis para uso na produção de etanol de 2ª geração.

## Referências

- ABDEL-SATER, M. A.; EL SAID, A. H. M. Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrial wastes. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 47, p. 15-21, 2001.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4851-4861, 2010.
- AQUARONE, E.; BORZANI W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. *Biotechnologia industrial*. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, v. 4, 2001.

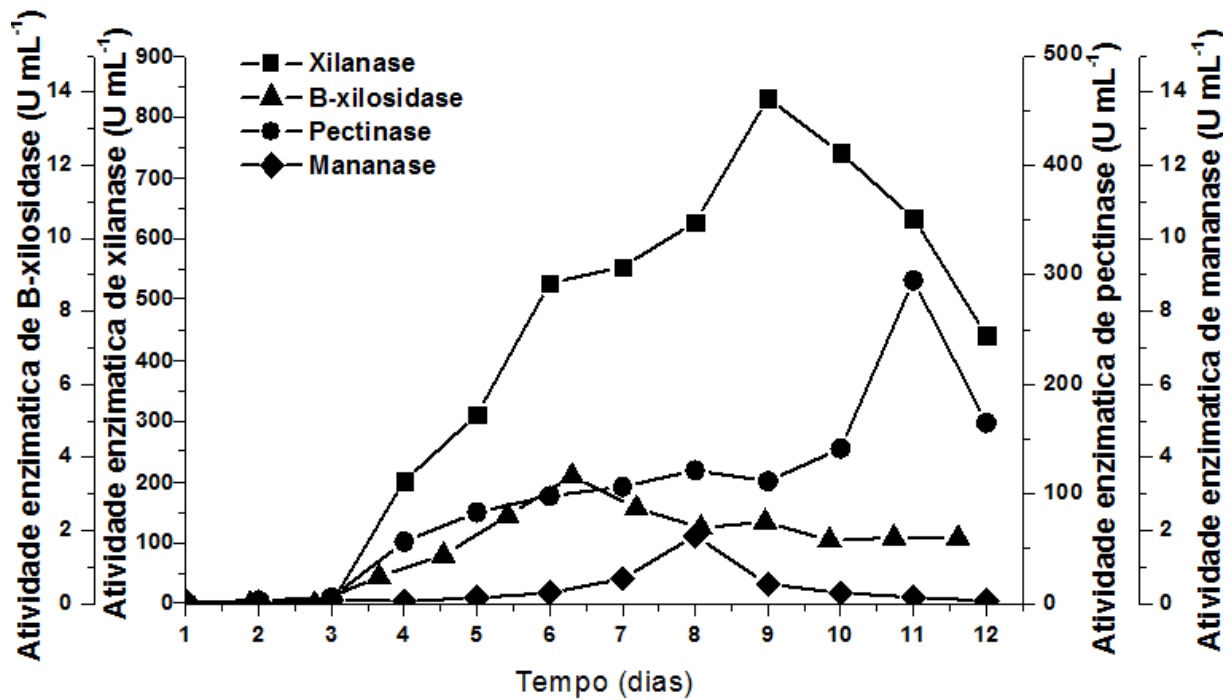
- BAIG, M. M. V.; BAIG, M. L. B.; BAIG, M. I. A.; YASMEEN, M. Saccharification of banana agro-waste by cellulolytic enzymes. *African Journal Biotechnology*, v. 3, p. 447–450, 2004.
- BISCHOFF, K. M.; WICKLOW, D.T.; JORDAN, D.B.; REZENDE, S.T.; LIU, S.; HUGHES, S.R.; RICH, J.O. Extracellular hemicellulolytic enzymes from the maize endophyte *Acremonium zeae*. *Current Microbiology*, v. 58, p. 499-503, 2009.
- CERVBRASIL - Associação da indústria da Cerveja. Anuário 2014. Disponível em: <[http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/ANUARIO\\_CB\\_2015\\_WEB.pdf](http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/ANUARIO_CB_2015_WEB.pdf)>. Acesso em: 15 mai. 2016.
- CHAVEZ, R.; NAVARRO, C.; CALDERON, I.; PEIRANO, A.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. Secretion of endoxylanase A from *Penicillium purpurogenum* by *Saccharomyces cerevisiae* transformed with genomic fungal DNA. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, v. 212, p. 237-241, 2002.
- CHAVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *Journal of Biotechnology*, v. 123, p. 413–433, 2006.
- CHEN, Y.T.; KO W.H. Characterization of a fungicidal substance produced by *Eupenicillium brefeldianum* isolated from soil for plant disease control and its significance in nature *Botanical Studies*, v. 55, n. 39, 2014.
- CORDEIRO, L. G.; EL-AOUAR, Â. A.; GUSMÃ, R. P. *Characterization of the bagasse coming from malt beer*. Revista Verde, Mossoró , v. 7, n. 3, p. 20-22, 2012.
- FALKOSKI, D. L., GUIMARÃES, V. M., ALMEIDA, M. N., ALFENAS, A. C., COLODETTE, J. L., REZENDE, S. T. Characterization of Cellulolytic Extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and Its Application in Biomass Saccharification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 166, p. 1586-1603, 2012.
- GOTTSCHALK, L. M. F., OLIVEIRA, R. A., BOM, E. P. S. Cellulases, xylanases, B-glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biochemical Engineering Journal*, v. 51, p. 72-78, 2010.
- GRIGOREVSKI-LIMA, A. L.; OLIVEIRA, M. M. Q.; NASCIMENTO R. P. ;BOM, E. P. S.; COELHO, R. R. R. Production and partial characterization of cellulases and xylanases from *Trichoderma atroviride* 676 using lignocellulosic residual biomass. *Applied Biochemical Biotechnology*, v. 4 n. 169, p. 1373-85, 2013.
- KNOB, A.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of two extracellular xylanases from *Penicillium sclerotiorum*: a novel acidophilic xylanase. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 162, n. 2, p. 429–443, 2010.
- KROGH, K. B. R.; MORKEBERG, A.; FRISVAD, J. C.; OLSSON, L. Screening genus *Penicillium* for producers of cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 113, n. 16, p.389-401, 2004.
- KRONBAUER, E. A. W. ; PERALTA, R. M.; OSAKU, C. A.; KADOWAKI, M. K. Produção de xilanase por *Aspergillus casielus* com diferentes fontes de carbono. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, Curitiba v. 25, n. 2, p. 207-216, 2007.
- LIAO, H.; XU, C.; TAN, S.; WEI, Z.; LING, N.; YU, G.; RAZA, W.; ZHANG, R.; SHEN, Q.; XU, Y. Production and characterization of acidophilic xylanolytic enzymes from *Penicillium oxalicum* GZ-2. *Bioresource Technology*, v. 123, p. 117–124, 2012.
- MARTINS, D. A. B.; PRADO H. F. A.; LEITE, R. S. R., FERREIRA H.; Moretti M. M. S., Silva, R. ; GOMES, E. Agroindustrial Wastes as Substrates for Microbial Enzymes Production and Source of Sugar for Bioethanol Production. *Integrated Waste Management, Mr. Sunil Kumar*, v. 2, 2011. InTech: Available from:<http://www.intechopen.com/books/integrated-waste-management-volume-ii/agroindustrial-wastes-assubstrates-for-microbial-enzymes-production-and-source-of-sugar-for-bioetha>.

- MCINTOSH, S.; VANCOV, T. Enhanced enzyme saccharification of Sorghum bicolor straw using dilute alkali pretreatment. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 6718-6727, 2010.
- MEDEIROS, R. G.; SILVA JR, F. G.; BÁO, S. N.; HANADA, R.; FERREIRA, E. X. Application of Xylanases from Amazon Forest Fungal Species in Bleaching of Eucalyptus Kraft Pulps. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 50, n. 2, p. 231-238, 2007.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytic Chemistry*, v. 3, n. 31, p. 426-428, 1959.
- MORITA, T.; ASSUMPTÇÃO, R. M. V. *Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação, purificação com indicadores de segurança e de descarte de produtos químicos*, 2ed. São Paulo: Blucher, 2007, 724p.
- MOTTA F. L.; ANDRADE C. C. P.; SANTANA M. H. A. A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications, Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization, Dr. Anuj Chandel (Ed.), 2013, InTech, , DOI: 10.5772/53544. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/sustainable-degradation-of-lignocellulosic-biomass-techniques-applications-and-commercialization/a-review-of-xylanase-production-by-the-fermentation-of-xylan-classification-characterization-and-app>> Acesso em: 16 maio 2016.
- MUSSATTO, S. I. ; DRAGONE, G. ; ROBERTO, I. C. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, v. 43 p. 1-14, 2006.
- MUSSATTO S. I.; ROBERTO I. C. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. *Journal of Chemical technology and Biotechnology*, v. 81, p. 268-274, 2006.
- NIGAM, P. S. Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications. *Biomolecules*, v. 3, p. 597-611, 2013.
- OKAFOR, U. A.; OKOCHI, V. I.; ONYEGEME-OKERENTA, B. M.; NWODO-CHINEDU, S. Xylanase production by *Aspergillus niger* ANL 301 using agro-wastes. *African Journal of Biotechnology*, v. 6, n. 14, p. 1710-1714, 2007.
- SAHA, S. P.; GHOSH, S. Optimization of xylanase production by *Penicillium citrinum* xym2 and application in saccharification of agro-residues. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 3, p. 188-196, 2014.
- SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 185-194, 2009.
- SHARMA, M.; KUMAR, A. Xylanases: An Overview. *British Biotechnology Journal*, v. 3, n. 1, p. 1-28, 2013.
- SOUZA, O.; SOUZA, M. T. C.; SANTOS, I. E. *Tratamento químico de resíduos agrícolas com solução de uréia na alimentação de ruminantes*. Revista Capril Virtual, 2007. Disponível em: <[http://www.caprilvirtual.com.br/artigos\\_pdf.php?recordID=96](http://www.caprilvirtual.com.br/artigos_pdf.php?recordID=96)> Acesso em: 14 maio 2016.
- TERRASAN, C. R. F.; TEMER, B.; DUARTE, M. C. T.; CARMONA, E. C. Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4139-4143, 2010.
- WANG, Y.J.; XUE F.; WU, Y. F.; XUE Y P.; ZHENG Y.G. Development of macrolide lactone antibiotic brefeldin A fermentation process with *Eupenicillium brefeldianum* ZJB082702. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 114 n. 3, p. 262-267, 2012.
- WISEMAN, A. *Handbook of enzyme Biothechnology*. John Wiley and Sons Ltd., p. 148, 1975.

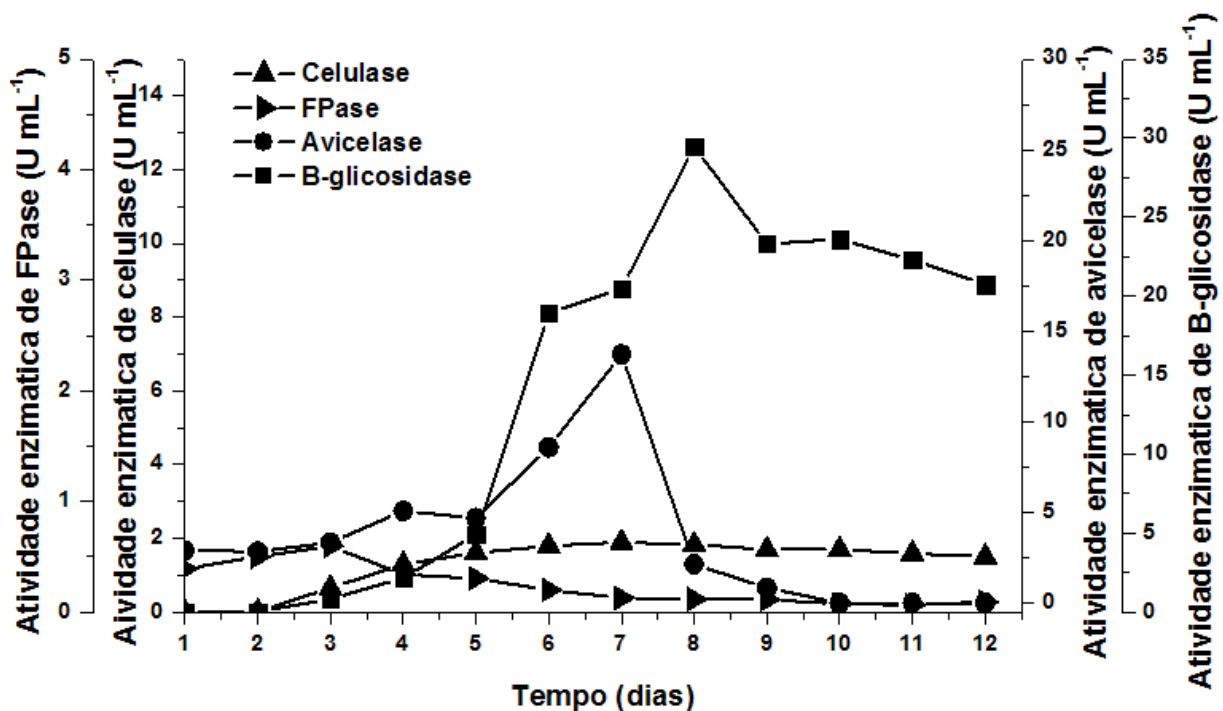
WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Shinsky, J.J., White, T.J. PCR Protocols: A guide to methods and applications. New York, Academic Press, p. 315-322, 1990.

WONG, K. K.; TAN, L. U.; SADDLER, J. N. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiological Reviews*, v. 52 p. 305-317, 1988.

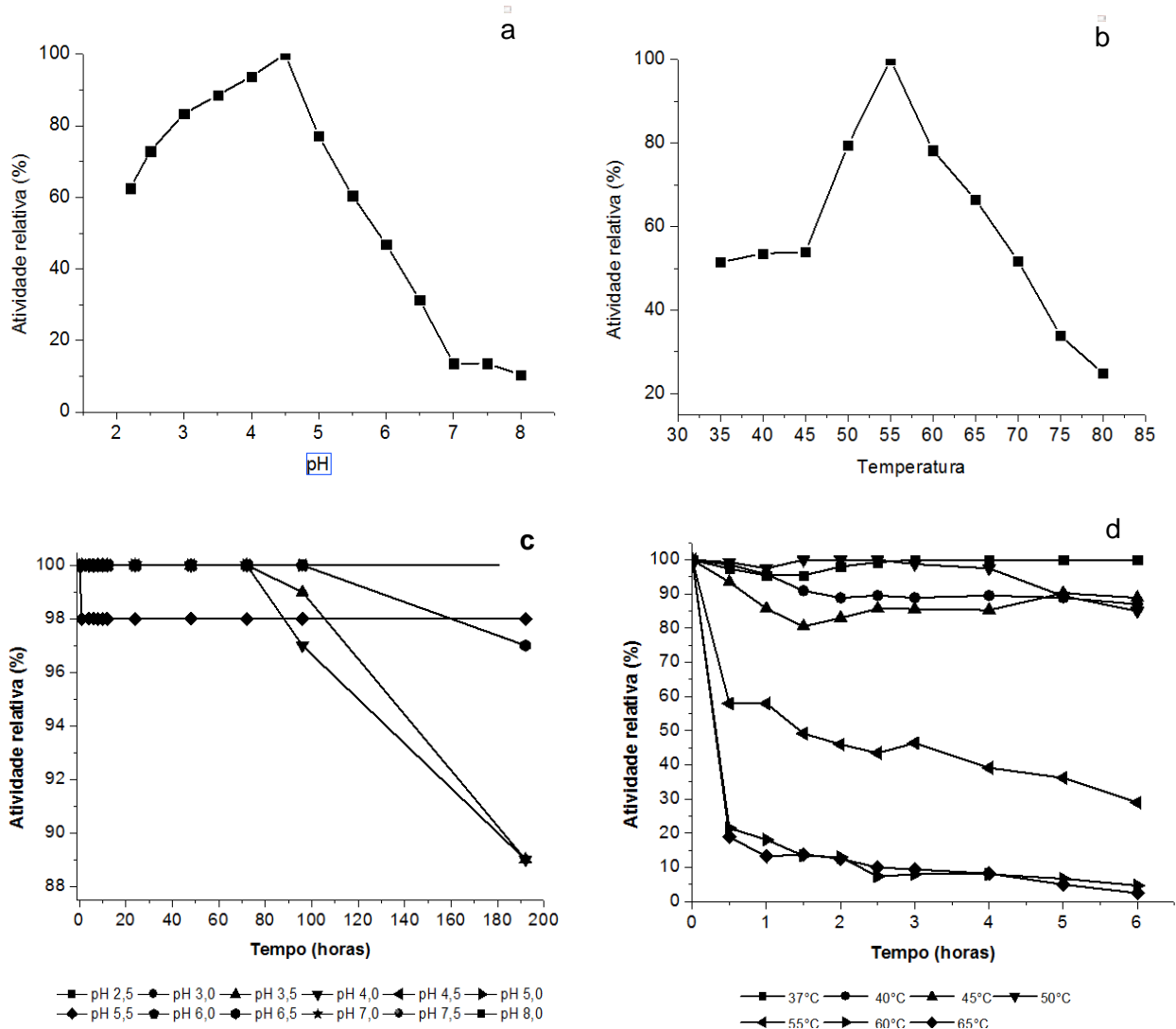
**Figura 1** Produção de enzimas hemicelulolíticas e pectinolítica do extrato bruto de *P. brefeldianum* em cultivo líquido suplementado com 1% (p/v) de bagaço de cervejaria em condições estacionárias a 28°C



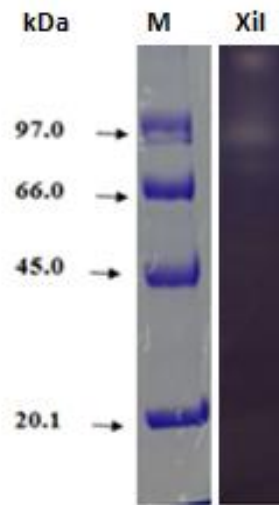
**Figura 2.** Produção de enzimas do complexo celulolítico do extrato bruto de *P. brefeldianum* em cultivo líquido suplementado com 1% (p/v) de bagaço de cervejaria em condições estacionárias a 28°C



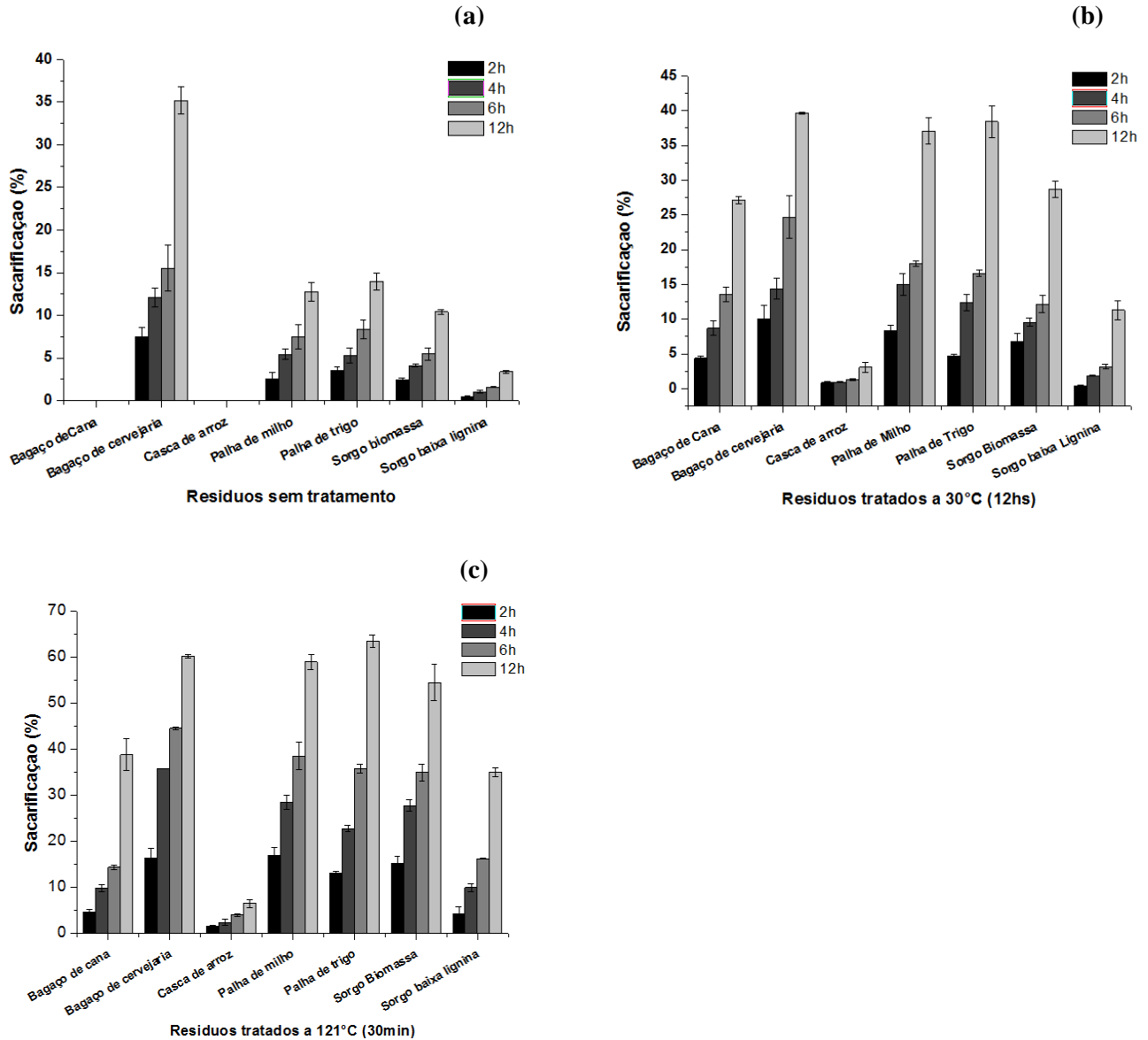
**Figura 3.** Influência do pH (a), temperatura (b), estabilidade do pH (c) e estabilidade térmica (d) na atividade de xilanase do *P. brefeldianum* obtida de cultivo líquido suplementado com 1% (p/v) de bagaço de cerveja em condições estacionárias por 9 dias a 28°C.



**Figura 4.** Zimograma do extrato bruto enzimático de *P. brefeldianum* obtido de cultivo líquido estacionário utilizando bagaço de cervejaria como fonte de carbono. **Linha M** - marcador de peso molecular (Fosforilase b (97 kDa), Albumina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anidrase Carbônica (30 kDa), Inibidor de tripsina (20,1kDa) e  $\alpha$ -lactalbumina (14,4kDa)). **Linha Xil** – extrato bruto enzimático.

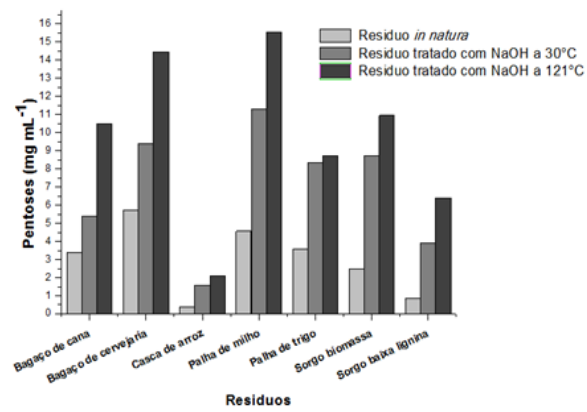


**Figura 5.** Efeito de sacarificação enzimática de agro-resíduos (pré-tratados ou não com NaOH) com extrato bruto de *P.brefeldianum*. a) açúcares redutores obtidos após sacarificação dos resíduos *in natura* (sem tratamento com alcali); b) açúcares redutores obtidos após sacarificação enzimática dos resíduos pré-tratados com NaOH 1% a 30°C por 12 horas. c) Açúcares redutores obtidos após sacarificação dos resíduos pré-tratados com NaOH 1% a 121°C por 30 minutos.





**Figura 6.** Produção de pentoses após sacarificação enzimática com extrato bruto de *P. brefeldianum* dos resíduos *in natura* (controle) e pré-tratados com NaOH



## Anexo I

*Artigo elaborado e formatado conforme as normas para publicação científica no periódico Semina: Ciências Agrárias, UEL.*

### **Normas editoriais para publicação na Semina: Ciências Agrárias, UEL.**

**Os artigos poderão ser submetidos em português ou inglês**, mas somente serão publicados em inglês. Os artigos submetidos em português, após o aceite, deverão ser obrigatoriamente **traduzidos para o inglês**.

**Os artigos enviados para a revista até dezembro/2013 que estão em tramitação poderão ser publicados em português, entretanto, se traduzidos para o inglês terão prioridade na publicação.**

Todos os artigos, após o aceite deverão estar acompanhados (como documento suplementar) do comprovante de tradução ou correção de um dos seguintes tradutores:

AmericanJournalExperts

Editage

Elsevier

<http://www.proof-reading-service.com>

<http://www.academic-editing-services.com/>

<http://www.publicase.com.br/formulario.asp>

O autor principal deverá anexar no sistema o **documento comprobatório** dessa correção na página de submissão em “**Docs. Sup.**”

### **OBSERVAÇÕES:**

1) Os manuscritos originais submetidos à avaliação são inicialmente apreciados pelo Comitê Editorial da Semina: Ciências Agrárias. Nessa análise, são avaliados os requisitos de qualidade para publicação na revista, como: escopo; adequação às normas da revista; qualidade da redação; fundamentação teórica; atualização da revisão da literatura; coerência e precisão da metodologia; contribuição dos resultados; discussão dos dados observados; apresentação das tabelas e figuras; originalidade e consistência das conclusões. Se o número de trabalhos com manuscrito ultrapassar a capacidade de análise e de publicação da Semina: Ciências Agrárias, é feita uma comparação entre as submissões, e são encaminhados para assessoria Ad hoc, os trabalhos considerados com maior potencial de contribuição para o avanço do conhecimento científico. Os trabalhos não aprovados nesses critérios são arquivados e os demais são submetidos a análise de pelo menos dois assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo, sem a identificação do(s) autor(es). Os autores cujos artigos forem arquivados, não terão direito à devolução da taxa de submissão.

2) Quando for o caso, deve ser informado que o projeto de pesquisa que originou o artigo foi executado obedecendo às normas técnicas de biosegurança e ética sob a aprovação da comissão de ética envolvendo seres humanos e/ou comissão de ética no uso de animais (nome da Comissão, Instituição e nº do Processo).\_

### **NÃO SERÃO ACEITOS MANUSCRITOS EM QUE:**

- a) O arquivo do artigo anexado do trabalho contenha os nomes dos autores e respectiva afiliação;
- b) Não tenha sido realizado o **cadastro completo** de todos os autores nos metadados de submissão; **Exemplo:** Nome completo; Instituição/Afiliação; País; Resumo da Biografia/Titulação/função.
- c) Não tenha sido incluído no campo COMENTÁRIOS PARA O EDITOR, um texto que aponte a relevância do trabalho (importância e diferencial em relação a trabalhos já existentes), em até 10 linhas;
- d) Não estejam acompanhados de documento comprobatório da taxa de submissão, em documento suplementar “**Docs. Sup.**” no ato da submissão;

e) Não estejam acompanhados dos seguintes documentos suplementares: gráficos, figuras, fotos e outros, EM VERSÃO ORIGINAL. (Formato JPEG; TIFF; EXCEL)

f) Não constem no artigo original: título, resumo e palavras-chave em português e inglês, tabelas e figuras.

### **RESTRICÇÃO POR ÁREA:**

#### **PARA A ÁREA DE AGRONOMIA NÃO SERÃO ACEITOS MANUSCRITOS EM QUE:**

- a) Os experimentos com cultura in vitro sejam limitados ao melhoramento dos protocolos já padronizados ou que não forneçam novas informações na área;
- b) Os experimentos de campo não incluam dados de pelo menos dois anos ou de várias localidades dentro do mesmo ano;
- c) Os experimentos se refiram apenas a testes sobre a eficiência de produtos comerciais contra agentes bióticos, abióticos ou estresses fisiológicos;
- d) Envolvam apenas bioensaios (screening) de eficácia de métodos de controle de insetos, ácaros ou doenças de plantas, exceto se contiverem contribuição importante sobre mecanismos de ação numa perspectiva de fronteira do conhecimento;
- e) O objetivo seja limitado a registrar a ocorrência de espécies de pragas ou patógenos ou associações entre hospedeiros em novas localidades dentro de regiões geográficas onde eles já sejam conhecidos. Registros de espécies ou associações conhecidas só serão considerados em novas zonas ecológicas. Os registros de distribuição devem se basear em ecossistemas, e não em fronteiras políticas.

#### **PARA A ÁREA DE VETERINÁRIA**

- a) A publicação de relatos de casos é restrita e somente serão selecionados para tramitação àqueles de grande relevância ou ineditismo, com real contribuição ao avanço do conhecimento para a área relacionada.

#### **Categorias dos Trabalhos**

- a) Artigos científicos: no máximo 20 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas;
- b) Comunicações científicas: no máximo 12 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 16 citações e no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura;
- b) Relatos de casos: No máximo 10 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 12 citações e no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura;
- c) Artigos de revisão: no máximo 25 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas.

#### **Apresentação dos Trabalhos**

Os originais completos dos artigos, comunicações, relatos de casos e revisões podem ser escritos em português ou inglês no editor de texto Word for Windows, em papel A4, com numeração de linhas por página, espaçamento 1,5, fonte Times New Roman, tamanho 11 normal, com margens esquerda e direita de 2 cm e superior e inferior de 2 cm, respeitando-se o número de páginas, devidamente numeradas no canto superior direito, de acordo com a categoria do trabalho.

*Figuras (desenhos, gráficos e fotografias) e Tabelas* serão numeradas em algarismos arábicos e devem ser incluídas no final do trabalho, imediatamente após as referências bibliográficas, com suas respectivas chamadas no texto. Além disso, as figuras devem apresentar boa qualidade e deverão ser anexadas nos seus formatos originais (JPEG, TIF, etc) em “Docs Supl.” na página de submissão. Não serão aceitas figuras e tabelas fora das seguintes especificações: Figuras e tabelas deverão ser apresentadas nas larguras de 8 ou 16

cm com altura máxima de 22 cm, lembrando que se houver a necessidade de dimensões maiores, no processo de editoração haverá redução para as referidas dimensões.

**Observação:** Para as tabelas e figuras em qualquer que seja a ilustração, o título deve figurar na parte superior da mesma, seguida de seu número de ordem de ocorrência em algarismo arábico, ponto e o respectivo título.

Indicar a fonte consultada abaixo da tabela ou figura (elemento obrigatório). Utilizar fonte menor (Times New Roman 10).

Citar a autoria da fonte somente quando as tabelas ou figuras não forem do autor.

Ex: **Fonte:** IBGE (2014), ou **Source:** IBGE (2014).

### **Preparação dos manuscritos**

#### **Artigo científico:**

Deve relatar resultados de pesquisa original das áreas afins, com a seguinte organização dos tópicos: Título; Título em inglês; Resumo com Palavras-chave (no máximo seis palavras, em ordem alfabética); Abstract com Key words (no máximo seis palavras, em ordem alfabética); Introdução; Material e Métodos; Resultados e Discussão com as conclusões no final da discussão ou Resultados; Discussão e Conclusões separadamente; Agradecimentos; Fornecedores, quando houver e Referências Bibliográficas. Os tópicos devem ser destacados em negrito, sem numeração, quando houver a necessidade de subitens dentro dos tópicos, os mesmos devem ser destacados em itálico e se houver dentro do subitem mais divisões, essas devem receber números arábicos. (Ex. **Material e Métodos...** *Áreas de estudo...1. Área rural...2. Área urbana*).

O trabalho submetido não pode ter sido publicado em outra revista com o mesmo conteúdo, exceto na forma de resumo em Eventos Científicos, Nota Prévia ou Formato Reduzido.

#### **A apresentação do trabalho deve obedecer à seguinte ordem:**

**1. Título do trabalho,** acompanhado de sua tradução para o inglês.

**2. Resumo e Palavras-chave:** Deve ser incluído um resumo informativo com um mínimo de 200 e um máximo de 400 palavras, na mesma língua que o artigo foi escrito, acompanhado de sua tradução para o inglês (*Abstract e Key words*).

**3. Introdução:** Deverá ser concisa e conter revisão estritamente necessária à introdução do tema e suporte para a metodologia e discussão.

**4. Material e Métodos:** Poderá ser apresentado de forma descritiva contínua ou com subitens, de forma a permitir ao leitor a compreensão e reprodução da metodologia citada com auxílio ou não de citações bibliográficas.

**5. Resultados e Discussão:** Devem ser apresentados de forma clara, com auxílio de tabelas, gráficos e figuras, de modo a não deixar dúvidas ao leitor, quanto à autenticidade dos resultados e pontos de vistas discutidos.

**6. Conclusões:** Devem ser claras e de acordo com os objetivos propostos no trabalho.

**7. Agradecimentos:** As pessoas, instituições e empresas que contribuíram na realização do trabalho deverão ser mencionadas no final do texto, antes do item Referências Bibliográficas.

#### **Observações:**

**Notas:** Notas referentes ao corpo do artigo devem ser indicadas com um símbolo sobrescrito, imediatamente depois da frase a que diz respeito, como notas de rodapé no final da página.

**Figuras:** Quando indispensáveis figuras poderão ser aceitas e deverão ser assinaladas no texto pelo seu número de ordem em algarismos arábicos. Se as ilustrações enviadas já foram publicadas, mencionar a fonte e a permissão para reprodução.

**Tabelas:** As tabelas deverão ser acompanhadas de cabeçalho que permita compreender o significado dos dados reunidos, sem necessidade de referência ao texto.

### **Grandezas, unidades e símbolos:**

- a) Os manuscritos devem obedecer aos critérios estabelecidos nos Códigos Internacionais de cada área.
- b) Utilizar o Sistema Internacional de Unidades em todo texto.
- c) Utilizar o formato potência negativa para notar e inter-relacionar unidades, e.g.: kg ha<sup>-1</sup>. Não inter-relacione unidades usando a barra vertical, e.g.: kg/ha.
- d) Utilizar um espaço simples entre as unidades, g L<sup>-1</sup>, e não g.L<sup>-1</sup> ou gL<sup>-1</sup>.
- e) Usar o sistema horário de 24 h, com quatro dígitos para horas e minutos: 09h00, 18h30.

### **8. Citações dos autores no texto**

Deverá seguir o sistema de chamada alfabética seguidas do ano de publicação de acordo com os seguintes exemplos:

- a) Os resultados de Dubey (2001) confirmaram que .....
- b) De acordo com Santos et al. (1999), o efeito do nitrogênio.....
- c) Beloti et al. (1999b) avaliaram a qualidade microbiológica.....
- d) [...] e inibir o teste de formação de sincício (BRUCK et al., 1992).
- e) [...]comprometendo a qualidade de seus derivados (AFONSO; VIANNI, 1995).

### **Citações com dois autores**

Citações onde são mencionados dois autores, separar por ponto e vírgula quando estiverem citados dentro dos parênteses.

Ex: (PINHEIRO; CAVALCANTI, 2000).

Quando os autores estiverem incluídos na sentença, utilizar o (e)

Ex: Pinheiro e Cavalcanti (2000).

### **Citações com mais de dois autores**

Indicar o primeiro autor seguido da expressão et al.

Dentro do parêntese, separar por ponto e vírgula quando houver mais de uma referência.

Ex: (RUSSO et al., 2000) ou Russo et al. (2000); (RUSSO et al., 2000; FELIX et al., 2008).

**Para citações de diversos documentos de um mesmo autor**, publicados no mesmo ano, utilizar o acréscimo de letras minúsculas, ordenados alfabeticamente após a data e sem espaçamento.

Ex: (SILVA, 1999a, 1999b).

**As citações indiretas de diversos documentos de um mesmo autor**, publicados em anos diferentes, separar as datas por vírgula.

Ex: (ANDRADE, 1999, 2000, 2002).

**Para citações indiretas de vários documentos de diversos autores**, mencionados simultaneamente, devem figurar em ordem alfabética, separados por ponto e vírgula.

Ex: (BACARAT, 2008; RODRIGUES, 2003).

**9. Referências:** As referências, redigidas segundo a norma NBR 6023, ago. 2000, e reformulação número 14.724 de 2011 da ABNT, deverão ser listadas na ordem alfabética no final do artigo. **Todos os autores participantes dos trabalhos deverão ser relacionados, independentemente do número de participantes.** A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo, bem como opiniões, conceitos e afirmações são da inteira responsabilidade dos autores.

**Observação:** Consultar os últimos fascículos publicados para mais detalhes de como fazer as referências do artigo.

As outras categorias de trabalhos (Comunicação científica, Relato de caso e Revisão) deverão seguir as mesmas normas acima citadas, porém, com as seguintes orientações adicionais para cada caso:

### **Comunicação científica**

Uma forma concisa, mas com descrição completa de uma pesquisa pontual ou em andamento (nota prévia), com documentação bibliográfica e metodologias completas, como um artigo científico regular. Deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key words; Corpo do trabalho sem divisão de tópicos, porém seguindo a sequência - introdução, metodologia, resultados e discussão (podem ser incluídas tabelas e figuras), conclusão e referências bibliográficas.

### **Relato de caso**

Descrição sucinta de casos clínicos e patológicos, resultados inéditos, descrição de novas espécies e estudos de ocorrência ou incidência de pragas, microrganismos ou parasitas de interesse agrônomo, zootécnico ou veterinário. Deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key words; Introdução com revisão da literatura; Relato do (s) caso (s), incluindo resultados, discussão e conclusão; Referências Bibliográficas.

### **Artigo de revisão bibliográfica**

Deve envolver temas relevantes dentro do escopo da revista. O número de artigos de revisão por fascículo é limitado e os autores somente poderão apresentar artigos de interesse da revista mediante convite de membro(s) do comitê editorial da Revista. No caso de envio espontâneo do autor (es), é necessária a inclusão de resultados relevantes próprios ou do grupo envolvido no artigo, com referências bibliográficas, demonstrando experiência e conhecimento sobre o tema.

O artigo de revisão deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key words; Desenvolvimento do tema proposto (com subdivisões em tópicos ou não); Conclusões ou Considerações Finais; Agradecimentos (se for o caso) e Referências Bibliográficas.

### **Outras informações importantes**

1. A publicação dos trabalhos depende de pareceres favoráveis da assessoria científica "Ad hoc" e da aprovação do Comitê Editorial da Semina: Ciências Agrárias, UEL.

2. Não serão fornecidas separatas aos autores, uma vez que os fascículos estarão disponíveis no endereço eletrônico da revista (<http://www.uel.br/revistas/uel>).

4. Transferência de direitos autorais: Os autores concordam com a transferência dos direitos de publicação do referido artigo para a revista. A reprodução de artigos somente é permitida com a citação da fonte e é proibido o uso comercial das informações.

5. As questões e problemas não previstos na presente norma serão dirimidos pelo Comitê Editorial da área para a qual foi submetido o artigo para publicação.

6. *Numero de autores:* Não há limitação para número de autores, mas deverão fazer parte como co-autores aquelas pessoas que efetivamente participaram do trabalho. Pessoas que tiveram uma pequena participação no artigo deverão ser citadas no tópico de Agradecimentos, bem como instituições que concederam bolsas e recursos financeiros.

### Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores devem verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão rejeitadas e aos autores informados da decisão.

1. Os autores devem informar que a contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao Editor".
2. Devem informar ainda que o material está corretamente formatado e que os Documentos Suplementares estão anexados, ESTANDO CIENTE que a **formatação incorreta importará na SUSPENSÃO do processo de avaliação SEM AVALIAÇÃO DE MÉRITO.**
3. **Devem ser preenchidos dados de autoria de todos os autores no campo Metadados durante o processo de submissão.**

Utilize o botão "**incluir autor**"

1. **No passo seguinte preencher os metadados em inglês.**

Para incluí-los, após salvar os dados de submissão em português, clicar em "**editar metadados**" no topo da página - alterar o idioma para o inglês e inserir: título em inglês, abstract e key words. Salvar e ir para o passo seguinte.

1. **A identificação de autoria** do trabalho deve ser removida do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos), conforme instruções disponíveis em [Assegurando a Avaliação Cega por Pares](#).
2. Os arquivos para submissão devem estar em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapassem 2MB)

O texto deve estar em folha A4, com linhas numeradas, espaço 1,5; fonte Time New roman de tamanho 11;

1. Atestar que foram seguidas todas as normas éticas, em caso de pesquisa com seres vivos, estando de posse dos documentos comprobatórios de aprovação pela comissão de ética envolvendo seres humanos e/ou comissão de ética no uso de animais caso sejam solicitados.
2. **Efetuar o pagamento da Taxa de Submissão de artigos e anexar o comprovante como documento suplementar "Docs. Sup."**

### Declaração de Direito Autoral

Os **Direitos Autorais** para artigos publicados nesta revista são de direito do autor. Em virtude da aparecerem nesta revista de acesso público, os artigos são de uso gratuito, com atribuições próprias, em aplicações educacionais e não-comerciais.

A revista se reserva o direito de efetuar, nos originais, alterações de ordem normativa, ortográfica e gramatical, com vistas a manter o padrão culto da língua e a credibilidade do veículo. Respeitará, no entanto, o estilo de escrever dos autores.

Alterações, correções ou sugestões de ordem conceitual serão encaminhadas aos autores, quando necessário.

As opiniões emitidas pelos autores dos artigos são de sua exclusiva responsabilidade.

### **Política de Privacidade**

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

<b>Semina:</b>	<b>Ciências</b>	<b>Agrárias</b>
Londrina	-	PR
ISSN		1676-546X
E-ISSN		1679-0359
<a href="mailto:semina.agrarias@uel.br">semina.agrarias@uel.br</a>		

### Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao Editor".
2. Informo que o material está corretamente formatado e que os Documentos Suplementares serão carregados, ESTANDO CIENTE que **aformatação incorreta importará na SUSPENSÃO do processo de avaliação SEM AVALIAÇÃO DO MÉRITO.**
3. **Devem ser preenchidos dados de autoria de todos os autores no processo de submissão.**

Utilize o botão "**incluir autor**"

4. **No passo seguinte preencher os metadados em inglês.**

Para incluí-los, após salvar os dados de submissão em português, clicar em "**editar metadados**" no topo da página - alterar o idioma para o inglês e inserir: título em inglês, abstract e key words. Salvar e ir para o passo seguinte.

5. A **identificação de autoria** do trabalho foi removida do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos), conforme instruções disponíveis em [Assegurando a Avaliação Cega por Pares](#).
6. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapassem 2MB).

O texto está em espaço 1,5; fonte Time New roman de tamanho 11; emprega itálico em vez de sublinhado (exceto em endereços URL);



O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para Autores, na seção Sobre a Revista.

7. Atesto que foram seguidas todas as normas éticas, em caso de pesquisa com seres vivos, estando de posse dos documentos comprobatórios de aprovação por Comitê de Ética e Termo de Livre consentimento caso sejam solicitados. Tendo sido citado no texto a obediência aos preceitos éticos cabíveis.
8. Deve ser incluído no campo **COMENTÁRIOS PARA O EDITOR**, um texto que aponte a relevância do trabalho (importância e diferencial em relação a trabalhos já existentes), em até 10 linhas
9. **Taxa de Submissão de novos artigos**

#### Declaração de Direito Autoral

Os **Direitos Autorais** para artigos publicados nesta revista são de direito do autor. Em virtude da aparecerem nesta revista de acesso público, os artigos são de uso gratuito, com atribuições próprias, em aplicações educacionais e não-comerciais.

A revista se reserva o direito de efetuar, nos originais, alterações de ordem normativa, ortográfica e gramatical, com vistas a manter o padrão culto da língua e a credibilidade do veículo. Respeitará, no entanto, o estilo de escrever dos autores.

Alterações, correções ou sugestões de ordem conceitual serão encaminhadas aos autores, quando necessário. Nesses casos, os artigos, depois de adequados, deverão ser submetidos a nova apreciação.

As opiniões emitidas pelos autores dos artigos são de sua exclusiva responsabilidade.

#### Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

#### **Semina: Ciências Agrárias**

Londrina

ISSN 1676-546X

E-ISSN 1679-0359

[semina.agrarias@uel.br](mailto:semina.agrarias@uel.br)

PR