

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
PPGBIOTEC

Dissertação

**Revisão sobre aplicações
biotecnológicas de enzimas
produzidas pelo fungo
Leucoagaricus gongylophorus
Singer (Moller) (Leucocoprinae:
Agaricaceae) cultivado por
formigas cortadeiras**

Laysa Peneda Simões

Ouro Preto
2018



UFOP

Laysa Peneda Simões

Revisão sobre aplicações biotecnológicas das enzimas produzidas pelo fungo *Leucoagaricus gongylophorus* Singer (Moller) (Leucocoprinae: agaricaceae) cultivado por formigas cortadeiras

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração Genômica e Proteômica

Orientador: Prof Dr Maykon Passos Cristiano

Ouro Preto

2018

S51r

Simões, Laysa Peneda.

Revisão sobre aplicações biotecnológicas das enzimas produzidas pelo fungo *Leucoagaricus gongylophorus* Singer (Moller) (Leucocoprinae: Agaricaceae) cultivado por formigas cortadeiras [manuscrito] / Laysa Peneda Simões. - 2018.

75f.: il.: color; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Maykon Passos Cristiano.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Área de Concentração: Genômica e Proteômica.

1. Formiga-cortadeira . 2. Celulase. I. Cristiano, Maykon Passos. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 565.79

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 28 dias do mês de junho do ano de 2018, às 14:30 horas, nas dependências do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (Iceb), foi instalada a sessão pública para a defesa de dissertação da mestranda Laysa Peneda Simões, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Maykon Passos Cristiano (Presidente - UFOP), pelo Prof. Leandro Marcio Moreira (Membro - UFOP), pela Profa. Tânia Maria Fernandes Salomão (Membro - Externo). Dando início aos trabalhos, o presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de dissertação, concedeu à mestranda Laysa Peneda Simões 40 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Revisão Sobre Aplicações Biotecnológicas das Enzimas Produzidas Pelo Fungo *Leucocoprinus gongylophorus* Singer (Möller) (Leucocoprineae: Agaricaceae) Cultivado Por Formigas Cortadeiras", na área de concentração: Genômica e Proteômica. Terminada a exposição, o presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da dissertação, na seguinte ordem: Primeiro, Profa. Tânia Maria Fernandes Salomão; segundo, Prof. Leandro Marcio Moreira; terceiro, Prof. Maykon Passos Cristiano. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, o presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a mestranda foi aprovada por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da dissertação deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela mestranda. Ouro Preto, 28 de junho de 2018.

Presidente: Maykon Passos Cristiano

Membro: Tânia Maria Fernandes Salomão

Membro: [Assinatura]

Mestrando: Laysa Peneda Simões

Dedico à minha princesa Alícia, que me
inspira a viver e a buscar novos caminhos.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente a Deus por me permitir realizar esse trabalho e ser o meu guia de todas as horas.

Aos meus pais, Teka e Ivacy, por viabilizar e sempre incentivarem os meus estudos e não medirem esforços para que mais essa etapa fosse concluída.

A minha mãe por ser conselheira, amiga, melhor avó e apoiar todas as decisões tomadas.

As minhas irmãs pelo carinho, amizade e companheirismo sempre.

Ao meu sobrinho, João que foi o melhor presente que minha irmã me deu.

Ao meu marido, Alisson, por todo amor, apoio, compreensão, ajuda, amizade e incentivo durante todo o mestrado e por sempre acreditar em mim.

A minha filha, Alícia, razão de todo esforço e incentivo para que me torne cada vez melhor. Obrigada por cada sorriso, cada demonstração de afeto e por trazer luz para minha vida e me desculpe pelas ausências.

Aos meus amigos por estarem sempre presentes e incentivando meus sonhos.

Aos colegas de laboratório, pela boa convivência e compartilhamento de conhecimento e experiências.

A UFOP, por ser a universidade em que conclui minha graduação e que tive a oportunidade de seguir meus estudos no mestrado.

Agradeço, enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o meu conhecimento e para a minha trajetória até esse momento.

Resumo

As enzimas além de serem essenciais aos seres vivos, apresentam diversas aplicabilidades no setor industrial que tem interesse em enzimas com características específicas para os processos. Tal aplicabilidade somada à necessidade de ampliar os conhecimentos sobre enzimas oportuniza os cientistas a investigar diversos organismos produtores e enzimas com o objetivo de identificar quais enzimas são produzidas e em qual quantidade, bem como suas características e suas aplicações. Melhorar a produção de enzimas tanto em quantidade quanto em qualidade empregando substratos mais adequados aliado ao uso de técnicas moleculares é o foco de muitos desses estudos. No presente estudo, foi realizada uma revisão bibliográfica que tem como foco enzimas produzidas pelo fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, que é cultivado por formigas cultivadoras de fungo. A revisão aborda também a agricultura nos coleópteros, térmitas e formigas, enfatizando as hipóteses do surgimento do cultivo do fungo pelas formigas, cuidado das formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* e a relação simbiótica entre eles. Na relação entre formiga-fungo, a formiga fornece o substrato necessário para que o fungo se desenvolva e em troca as formigas recebem nutrientes que são degradados, em parte, pelas enzimas do fungo. As enzimas produzidas pelo fungo *Leucoagaricus gongylophorus* ainda são pouco estudadas e suas propriedades são, portanto, desconhecidas. O potencial biotecnológico dessas enzimas, porém produzidas por outros microorganismos, são empregados em diversos processos industriais. A presente revisão descreve sobre características das enzimas rhamnogalacturano hidrolase, celulase, alpha-amilase, endo-1,4-β-xilanase e arabinofuranosidase bem como sobre microorganismos produtores dessas enzimas, principais substratos utilizados na produção das mesmas e aplicações biotecnológicas em curso ou tem potencial para possíveis aplicações.

Palavras-chave: Formigas cultivadoras de fungo, Agricultura, produção de enzimas, Rhamnogalacturano Hidrolase, Celulase, alpha-amilase, endo-1,4-β-xilanase, arabinofuranosidase

Abstract

In addition to being essential to living organisms, enzymes have several applications in the industrial sector that are interested in enzymes with specific characteristics for the processes. This applicability, coupled with the need to expand knowledge about enzymes, enables scientists to investigate various organisms and enzymes in order to identify which enzymes are produced and in what quantity, as well as their characteristics and applications. Improving enzyme production in both quantity and quality by employing more suitable substrates combined with the use of molecular techniques is the focus of many of these studies. In the present study, a literature review was conducted focusing on enzymes produced by the fungus *Leucoagaricus gongylophorus*, which is cultivated by fungus-growing ants. The review also deals with coleopterans, termites and ants, emphasizing the hypothesis of the emergence of fungus cultivation by ants, care of the ants of the genera *Atta* and *Acromyrmex* with the fungus *Leucoagaricus gongylophorus* and the symbiotic relationship between them. In the relation between ant-fungus, the ant provides the necessary substrate for the fungus to develop and in exchange the ants receive nutrients that are degraded, in part, by the fungus enzymes. The enzymes produced by the fungus *Leucoagaricus gongylophorus* are still poorly studied and their properties are therefore unknown. The biotechnological potential of these enzymes, however produced by other microorganisms, are employed in several industrial processes. The present review describes the characteristics of the enzymes rhamnogalacturan hydrolase, cellulase, alpha-amylase, endo-1,4- β -xylanase and arabinofuranosidase as well as microorganisms that produce these enzymes, the main substrates used in their production and current biotechnological applications. potential applications.

Keywords: Fungus cultivating ants, Agriculture, enzyme production, Rhamnogalacturan Hydrolase, Cellulase, alpha-amylase, endo-1,4- β -xylanase, arabinofuranosidase

Lista de figuras

Figura 1: Fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> retirado de um ninho de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> mantida em laboratório coletada no Parque Estadual do Rio Doce (A); colônia de formiga <i>Acromyrmex</i> sp. com o fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> coletado na Fazenda Itapoã da Vallourec (B). Fonte: Arquivo pessoal	11
Figura 2: Fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> retirado da colônia de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> mantida em laboratório com a estrutura do gongilídeo(A) e gongilídeo em destaque (B)	15
Figura 3: Enzimas encontradas no sistema digestivo das formigas cortadeiras.....	21
Figura 4: Estrutura da fração sobrenadante de sulfato de amônio de polissacarídeos de semente de linhaça extraídos com KOH (KPI-ASF) que contém a estrutura do Rhamnogalacturanano I (RG-I)	28
Figura 5: Representação esquemática da estrutura das regiões lisas e ramificadas da pectina, incluindo pectinases, mostrando a ação da enzima Rhamnogalacturanano hidrolase.....	28
Figura 6: Estrutura de arabinoxilano de trigo solúveis em água, indicando o ponto de ação da enzima Arabinofurnosidase.....	30
Figura 7: Estrutura da celulose e ação da enzima celulase	34
Figura 8: Estrutura de um xilano hipotético e local de ação da enzima endo-1,4- β -xilanasase	39
Figura 9: Estrutura do amido composta por unidades de glicose unidas por ligações α -1-4 e α -1-6 e local de ação da enzima α -amilase	44

Lista de tabelas

Tabela 1: Classificação das enzimas.....	19
Tabela 2: Enzimas produzidas pelo fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	22
Tabela 3: Organismos produtores de Rhamnogalacturanano hidrolase.....	29
Tabela 4: Organismos produtores de alpha-L-arabinofuranosidase	31
Tabela 5: Organismos produtores de celulase	35
Tabela 6: Organismos produtores de endo-1,4-xilanase.....	39
Tabela 7: Organismos produtores de alpha-amilase	Erro! Indicador não definido.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	0
1.1 Insetos e realização da agricultura	1
1.2 Formigas	4
1.2.1 Formigas Cultivadoras de Fungo e Origem do Cultivo do Fungo	5
1.3 Formigas cultivadoras de fungos e outros micro-organismos associados.....	11
1. O FUNGO <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	14
2.1 Cultivo do fungo em laboratório	17
2. ENZIMAS	18
3.1 Enzimas produzidas por <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	20
3. HIDROLASES	25
4.1 Rhamnogalacturonano hidrolase	26
4.2 Celulase	34
4.3 Endo-1,4- β -xilanase	38
4.4 α -amilase	44
5. PERSPECTIVAS	49
6. REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia é definida de maneira simplificada pela *Biotechnology Innovation Organization* (BIO) como a “tecnologia baseada na biologia - a biotecnologia utiliza processos celulares e biomoleculares para desenvolver tecnologias e produtos que ajudam a melhorar nossas vidas e a saúde de nosso planeta.” (BIO, 2018)

A biotecnologia é utilizada a mais de 6.000 anos quando o homem começou a utilizar micro-organismos para produção de alimentos e bebidas mas, recentemente, os avanços biotecnológicos permitiram uma melhoria em diversos setores como na área da saúde, meio ambiente, agricultura e indústrias em geral com recursos mais eficientes e com menor impacto ambiental (BIO, 2018; Monteiro e Silva, 2009).

Nas indústrias, o processamento de seus produtos envolvem modificações da matéria prima utilizando frequentemente reações químicas. Porém, o uso de produtos químicos em processos industriais pode ser oneroso, além de gerar resíduos que afetam o meio ambiente. Uma alternativa aos produtos químicos com a capacidade de substituir diversos processamentos é o uso de enzimas (Monteiro e Silva, 2009). As enzimas, devido a sua capacidade de catalisar reações e dessa forma acelerar os processos químicos, apresentam vantagens em relação aos catalizadores químicos devido a fácil obtenção podendo ser produzidas em larga escala para o uso industrial (Monteiro e Silva, 2009).

As enzimas podem ser obtidas a partir de todos seres vivos, entretanto, aquelas derivadas de micro-organismos são vantajosas devido a facilidade de manipulação, por não depender de fatores sazonais, utilizar substratos de baixo custo ou resíduos agrícolas e a possibilidade de otimizar processos para a produção em alta escala e como consequência realizar melhoramentos genéticos dos micro-organismos (Monteiro e Silva, 2009).

Em virtude do grande interesse mundial no uso de enzimas, torna-se necessário a busca por novos micro-organismos produtores das enzimas de interesse procurando obter enzimas com as características mais adequadas para cada processo que exige, dentre muitos fatores, de pH e a temperatura diferentes.

O cultivo do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* pelas formigas cortadeiras do gênero *Atta* e *Acromyrmex*, e a sua aplicação na biotecnologia é a base para o presente estudo que envolve uma revisão bibliográfica sistemática para estabelecer uma relação inseto/fungo, propiciar uma leitura analítica da organização social e ambiental dos processos que envolvem as relações simbióticas entre micro-organismos e as formigas, da agricultura e cultivo de fungos em laboratório, bem como enzimas e sua utilização nas indústrias química e alimentar.

Surge então a motivação para a presente revisão para compreender as aplicações buscando as relações entre as técnicas e os processos, com interesse específico no potencial biotecnológico procurando entender: 1) quais enzimas são produzidas por esse fungo 2) aplicações biotecnológicas que as enzimas apresentam 3) as vantagens de utilização das enzimas.

O presente estudo relata sobre a realização da agricultura pelos insetos, principalmente pelas formigas cultivadoras de fungo, a origem do cultivo do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* e as enzimas rhamnogalacturanano hidrolase, α -L-arabinofuranosidase, endo-1,4- β -xilânase, celulase, α -amilase produzidas por eles.

Cabe ainda destacar que, a execução deste trabalho foi desenvolvida com o método dedutivo, com base na coleta do *corpus* utilizando-se pesquisas documentais e bibliográfica nas obras referenciadas, consultas aos sites indicados, que possibilitaram uma bibliografia secundária. Dos referenciais teóricos analisados, foram citados alguns conceitos relevantes e essenciais para a elaboração da revisão.

1.1 Insetos e realização da agricultura

Os insetos são invertebrados encontrados em diversos ambientes, alguns até considerados inóspito para outros seres vivos. Pertencentes ao subfiló Hexápoda, tem como característica geral a organização social, além do seu corpo ser dividido em cabeça, tórax e abdômen, três pares de pernas, cada uma conectada a um segmento do tórax, um par de antenas, e mandíbulas, maxilas e lábio, e um par de olhos compostos (Wheeler *et al.*, 2001).

A classe Insecta é diversa e abundante, com um número estimado de 2 a 5 milhões de espécies (Macedo, 2015), e é estimado que haja cerca de 10 quintilhão de insetos vivos, podendo ser considerado o grupo com maior biomassa animal terrestre (Wilson, 2012). Apresenta 29 ordens, onde quatro delas - Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, e Lepidoptera – detém 81% das espécies descritas (Footitt e Adler, 2009). Seus integrantes são principalmente terrestres, podendo ocupar qualquer nicho terrestre. Organismos que habitam ambientes aquáticos também são conhecidos, não sendo encontrados apenas na região sublitoral. O sucesso da sua ampla distribuição geográfica e o grande número de espécies são atribuídos às características adaptativas durante a evolução, que permitiram sua diversificação como o consumo de plantas, o tamanho pequeno, voo, metamorfose completa e altas taxas de especiação (Mayhew, 2007).

Os insetos apresentam associações com outros indivíduos como os fungos, que historicamente compartilham habitats semelhantes e só recentemente aumentou o interesse na relação inseto-fungo com número crescente de estudos nesta área. Essas relações podem ser positivas (mutualísticas) ou negativas para os insetos (Vega e Blackwell, 2005).

Ao se observar as interações em um ecossistema, constata-se que as relações simbióticas entre microorganismos e outros organismos permite que os hospedeiros exerçam diferentes capacidades fisiológicas além de poderem evoluir conjuntamente (Aylward *et al.*, 2013).

A formação de associações simbióticas com micro-organismos benéficos que conferem novas capacidades fisiológicas a seus hospedeiros tem sido descrita como uma forma de inovação evolutiva e até permite que alguns animais ocupem nichos ecológicos que, de outro modo, estariam indisponíveis (Alonso e Agosti, 2000; Alonso, 2011). A formação desse tipo de relação, aumenta a capacidade dos animais de obter acesso aos nutrientes da biomassa vegetal, uma fonte abundante de energia nos ecossistemas terrestres, uma vez que as paredes celulares das plantas são compostas por polímeros recalcitrantes que a maioria dos animais não consegue desconstruir (Alonso e Agosti, 2000; Aylward *et al.*, 2013). Nas associações que ocorrem entre fungos e insetos, a agricultura realizada por alguns grupos é considerada uma relação mutualística pois ambos se beneficiam. Muller (2005), definiu quatro critérios para considerar os

indivíduos como praticantes da agricultura sendo essas características compartilhadas pelos cupins, coleópteras, humanos e a maioria dos gêneros de formigas da tribo Attini: a primeira característica é a inoculação do cultivar fixo em um habitat ou substrato permitindo a propagação do cultivar por propágulos selecionados pelos agricultores podendo formar novos jardins; a segunda característica é o fornecimento de condições favoráveis para o crescimento da cultura ou proteção contra predadores, parasitas ou doenças; o terceiro fator é a obrigatoriedade de coletar o cultivado para o consumo alimentar; por último, deve-se ter a necessidade nutricional dependente daquele cultivar (Mueller *et al.*, 2005). Algumas características dos insetos que realizam a agricultura serão descritas a seguir.

Os cupins apresentam ampla distribuição em ambientes terrestres da região tropical devido organização social que apresentam e as associações positivas com microorganismos (Costa-Leonardo e Rebêlo, 2002). Também conhecidos como térmitas, os pertencentes da subfamília Macrotermitinae cultivam, para sua alimentação, fungos do gênero *Termitomyces* que não são encontrados em vida livre. Esse fungo consegue germinar e formar um micélio por meio de um único basidiósporo homocarion ou pela fusão de dois homocarions com transmissão através do micélio, e, esse heterocarion formado, pode originar corpos de frutificação sexuais que liberam esporos (Mueller *et al.*, 2005). Para a fundação de uma nova colônia, os cupins constroem uma célula de argila, e depositam sedimentos fecais obtidos pela ingestão de alimento não-digerido pelo cupim que contém os esporos sexuais do cogumelo *Termitomyces*. Assim, o cultivo é iniciado e mantidos em matéria vegetal morta em decomposição (Wood e Thomas, 1989; Mueller *et al.*, 2005). Provavelmente, a frutificação do fungo ocorre paralelamente ao aparecimento dos primeiros trabalhadores da colônia. O fungo produz nódulos vegetativos, e é dessa parte, que os cupins se alimentam, pois são ricos em nitrogênio, açúcar e enzimas permitindo melhor aproveitamento da energia, além de conter conídios que são esporos assexuais não digeridos que são excretados com as fezes e depositados no topo do pente do fungo (Wood e Thomas, 1989; Mueller *et al.*, 2005).

Os coleópteras popularmente conhecidos como besouros utilizam tecidos lenhosos de árvores para construir galerias e estabelecer seus ninhos. Nas subfamílias Scolytinae e Platypodinae, onde muitas espécies se alimentam de fungos, os besouros são

chamados de besouro de ambrosia (Wood, 1982). As fêmeas depois de acasalar e estabelecer em um novo hospedeiro, fixa o fungo que carregam em bolsos chamados *mycangia*, na parede dos túneis e ovopositam (Farrell *et al.*, 2001; Harrington, 2005). Os fungos cultivados pelos besouros são chamados de ambrosia, não são monoculturas (Beaver *et al.*, 1989), pertencem aos gêneros *Ambrosiella* e *Raffaelea* (Farrell *et al.*, 2001). Eles fornecem para os besouros vitaminas, aminoácidos e esteróis essenciais. O cultivo do jardim é realizado exclusivamente pelas fêmeas e podem crescer na forma de hifa e formar micélio ou na forma de ambrosia (Beaver *et al.*, 1989). Os fungos produzem esporos sexuais ou assexuais nos corpos de frutificação e a esporulação na câmara das pupas é importante para a disseminação do fungo em um novo hospedeiro (Harrington, 2005).

As formigas cultivadoras de fungos pertencem a tribo Attini. A transmissão do fungo ocorre verticalmente pela rainha que carrega em bolsos infrabucais grânulos de micélio (Mueller, 2002). Nas formigas há diferenciação em castas e cada uma exerce funções específicas, como, por exemplo, o cuidado com o jardim dos fungos. O cultivo pode ser realizado em diferentes substratos dependendo da linhagem do fungo (Mueller *et al.*, 2005).

1.2 Formigas

As formigas, juntamente com as abelhas e vespas, são insetos sociais pertencentes a classe Insecta, em uma das maiores ordens, a Hymenoptera e a subordem Apocrita. Algumas características dessas subordem são a presença de dois pares de asas membranosas e divisão em diferentes castas (Footitt & Adler, 2009; Grimald & Agosti, 2010).

A família Formicidae está incluída na subordem Apocrita e podem ser encontradas em galerias no solo, troncos ou sob pedras e em praticamente todos os ecossistemas. O sucesso evolutivo das formigas está associado a sua capacidade de dominar praticamente todos os ambientes existentes, por apresentar distinção entre as castas e por nidificarem em solo (Del-Claro, Santos & Junior, 2002).

As formigas apresentam uma alimentação diversa, variando de carnívoras, a ingestão de frutos em decomposição, excreção e secreção de outros animais e vegetais, fungos, polén e néctar (Del-Claro, Santos & Junior, 2002).

A reprodução das formigas ocorre por haplodiploidia, onde os machos se desenvolvem de óvulos não fecundados e as fêmeas de óvulos fecundados. A reprodução sexuada ocorre entre fêmeas e machos alados, geralmente durante o vôo resultando em indivíduos diplóides (Holdelberg & Wilson, 2009; Keller & Gordon, 2009). Após a fecundação, a fêmea retira suas asas e procura o lugar onde estabelecerá o seu ninho. Lá, a fêmea cava um galeria e uma câmara para ovopositar, onde seus ovos se desenvolvem em larvas que originaram as pupas e posteriormente os indivíduos adultos (Kaspari, 2000).

Da família Formicidae, a subfamília Myrmicinae é dominante apresentando uma elevada riqueza de espécies, sendo que a maioria das tribos são encontradas na região neotropical. Essas formigas podem constituir associações com plantas, fungos e outras formigas (Fernández, 2003).

1.2.1 Formigas Cultivadoras de Fungo e Origem do Cultivo do Fungo

A nidificação e as preferencias alimentares das formigas influenciam o nicho que vão ocupar, e a sua nutrição pode se dar pelo mutualismo com plantas, insetos, outras formigas ou até mesmo com fungos (Blüthgen e Feldhaar, 2010). A alimentação das formigas é amplamente diversificada, variando desde consumidores primários usando o polén e o néctar, e consumidores secundários e terciários com espécies carnívoras, ingestão de matéria orgânica em decomposição, excreção e secreção de outros animais e de fungos. Há ainda diferenciação entre a alimentação dos estágios larvais e os insetos adultos (Del-Claro *et al.*, 2002; Blüthgen e Feldhaar, 2010). Dentre as espécies que se alimentam de plantas estão as subfamílias: Formicinae, Pseudomyrmecinae e Dolichoderinae. A maioria dos gêneros pertencentes as famílias Myrmecinae, Ponerinae, Ecitoninae e Aenictinae são carnívoras (Blüthgen e Feldhaar, 2010).

As formigas pertencentes a tribo Attini surgiram a aproximadamente 50 milhões de anos, após a separação dos continentes, e são exclusivas do novo mundo (Wheeler, 1907; Weber, 1958; Mayhé-Nunes e Jaffé, 1998; Schultz e Brady, 2008). As Attini podem ser agrupadas em dois clados: as Paleoattini e as Neoattini. No primeiro estão agrupados os gêneros basalmente divergentes *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta* e *Apterostigma*, enquanto as Neoattini englobam os gêneros *Kalathomyrmex*, *Mycetarotes*, *Mycetosoritis*, *Mycetophylax*, *Cyphomyrmex*, *Mycetagoicus*, *Sericomyrmex*, *Trachymyrmex*, *Acromyrmex* e *Atta*, onde as Neoattini apresentam colônias mais numerosas, interações sociais mais complexas e indivíduos maiores (Schultz e Brady, 2008; Mehdiabadi e Schultz, 2010). As formigas cultivadoras de fungo que pertencem a essa tribo, utilizam fungos para sua alimentação (Mueller, 2002).

De acordo com Schultz & Brady (2008), a agricultura realizada pelas formigas cultivadoras de fungos pode ser dividida em cinco grupos, de acordo com o fungo cultivado: agricultura inferior, agricultura de fungo coral, agricultura de levedura, agricultura superior e agricultura das formigas cortadeiras de folhas (Schultz e Brady, 2008).

Para alguns grupos de formigas que realizam a agricultura, os fungos são apenas uma parte da sua alimentação, enquanto para outros a simbiose se torna obrigatória para sobrevivência (Mueller *et al.*, 2001). Essa relação mutualística e obrigatória demonstra a coevolução desses grupos, que pode ser observada por meio de modificações físicas para o carreamento do fungo e alimentação, fisiológicas como produção de enzimas e comportamentais como cuidados com o fungo (Schultz e Meier, 1995; Mueller *et al.*, 2005).

A agricultura inferior, praticada por formigas do grupo Paleoattini, é considerada a primeira forma de cultivo de fungos pelas formigas utilizando cultivares da tribo Leucocoprineae, um grupo parafilético, e capazes de sobreviver em sua forma de vida livre, sem a interação com as formigas (Mueller *et al.*, 1998; Schultz e Brady, 2008). A agricultura de fungo coral, também realizada pelo grupo Paleoattini, é a única transição conhecida que não cultiva fungo da tribo Leucocoprineae, embora, algumas espécies mais basais das Attini são conhecidas por cultivar os fungos da tribo Leucocoprineae (Schultz

e Brady, 2008). Na agricultura de leveduras, realizada pelas Neoattini, os fungos derivados de Leucocoprineae são cultivados na forma de leveduras unicelular e não de micélio como observado nos outros cultivares (Weber, 1972; Mueller, 2002; Schultz e Brady, 2008). A agricultura superior, executada pelas Neoattini, é realizada com cultivares derivados do Leucocoprineae cultivado pelas Attini inferiores. Esses fungos são dependentes das formigas para sobreviver, não sendo encontrados na forma de vida livre e possuem como diferencial a produção de gongilídio, que são extremidades arredondadas presentes nas hifas, utilizadas pelas formigas para alimentação (Schultz e Brady, 2008). Por fim, a agricultura das formigas cortadeiras de folhas ocorre pelo cultivo de fungo derivado dos Attini superiores pelos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* utilizando apenas matéria vegetal fresca, ao contrário do que ocorre no cultivo de outros fungos onde podem ser utilizados matéria vegetal e animal em decomposição, polpa de frutas, flores, excrementos e carcaças de insetos (Schultz e Brady, 2008). O grupo das formigas cortadeiras é o mais derivado, mais especializado e assim como a agricultura superior tem um alto grau de domesticação do fungo (Schultz e Brady, 2008).

A transição para a agricultura superior e o uso de matéria vegetal fresca foram os eventos mais importantes para as formigas cultivadoras de fungos (Schultz e Brady, 2008). Assim, a agricultura estabeleceu uma relação de simbiose, onde as formigas cultivam o fungo para sua alimentação e fornecem o substrato necessário para o fungo que utilizam suas enzimas para degradar o substrato vegetal, obter os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento (Weber, 1966; Silva *et al.*, 2003; Rønhede *et al.*, 2004; Da Silva Borba *et al.*, 2006; Schultz e Brady, 2008; Diniz e Bueno, 2010; Schiøtt *et al.*, 2010).

A origem do mutualismo entre o fungo e as formigas que o cultivam não é bem esclarecido e há, pelo menos, oito hipóteses para explicar como ocorreu a transição do estilo de vida de caça e coleta para um estilo de agricultura por meio do uso de diferentes substratos, são elas: sementes armazenadas, parede do ninho, madeira apodrecida, micorriza, carcaças de artropodes, conteúdo fecal das formigas, *pellets* infrabucais (Mueller *et al.*, 2001).

A hipótese de que o fungo foi obtido por meio de sementes armazenadas e assim iniciado a agricultura, foi proposta por Von Ihering, em 1984, sendo o fungo levado para o ninho acidentalmente como contaminante, junto com sementes que foram coletadas pelas formigas do grupo Myrmicinae, porém a coleta das sementes contaminadas foi observada em tribos diferentes das Attini, como Pogonomyrmecini, Solenopsidini e Stenammini (Mueller *et al.*, 2001). Como as espécies de formigas, cuja coleta de sementes com o fungo contaminante foram registradas, não são relacionadas às formigas cultivadoras de fungos por nunca terem isolado o fungo *Leucocoprineous* de sementes coletadas pelas formigas, sendo encontrados outros tipos de fungos contaminantes nas sementes, e pelo substrato não fornecer condições suficientes favoráveis para o desenvolvimento do fungo, essa não é a hipótese mais aceita (Knoch *et al.*, 1993; Wetterer *et al.*, 1998; Mueller, 2002).

O surgimento do mutualismo entre a formiga e o fungo através da ingestão acidental de parte do fungo que cresceu na parede do ninho e assim ter incorporado o fungo em sua dieta, foi proposto por Emery em 1899, Santschi em 1910 e Farquharson em 1914. Essa hipótese seria possível se as formigas formassem uma camada de material que pudesse ser decomposto pelo fungo *Leucocoprineae*, porém, não seria possível se as formigas habitassem ninhos muito profundos (Mueller *et al.*, 2001)

O crescimento em madeira apodrecida foi proposto por Forel em 1902, que observou que as formigas do gênero *Strumigenys* nidificavam em madeira apodrecida e que o ancestral das formigas cultivadoras de fungo também habitavam um local semelhante (Mueller *et al.*, 2001). Apesar de ser possível para o fungo *Leucocoprineae* digerir madeira *in vitro* na natureza isso não foi observado (Martin e Weber, 1969).

Segundo Garling (1979) o cultivo do fungo ocorreu por meio do contato com raízes subterrâneas de plantas associadas com fungos, as micorrizas, com o ninho que ali foi estabelecido (Mueller *et al.*, 2001). Garling (1979) propõe ainda que essa estratégia ajuda no suporte do ninho ou como uma forma de nutrir o fungo, o que sugere que o cultivo de fungos pode ser primitivo e de origem de fungos micorrizicos (Garling, 1979). Outra hipótese proposta por Garling (1979) foi que o fungo crescia na carcaça de artrópodes recém coletadas e levadas para o ninho. Diniz *et al.* (1998) observou o

crescimento do fungo em carcaças de artrópodes apesar desse comportamento ter sido notado em formigas que não consomem o fungo, mas podendo ser um comportamento vestigial (Diniz *et al.*, 1998).

O uso do conteúdo fecal para o crescimento do fungo foi observado por Forel, em 1902, em formigas que faziam seu ninho em madeira podre, se alimentavam do fungo que crescia em material fecal de insetos e que serviria como substrato para o jardim de fungo (Wheeler, 1907; Weber, 1958; Mueller *et al.*, 2001). Posteriormente, Wheeler (1907) alterou a hipótese considerando a ideia de Forel do substrato utilizado para manter o fungo, sendo uma característica comum dos insetos que cultivam fungo, inclusive as formigas, a passagem de substâncias vegetais ingeridas pelas formigas para o fungo ao passar pelo seu trato gastrointestinal (Wheeler, 1907). Essa característica sugere que o início do cultivar tenha sido em excretas fecais das próprias formigas e, nas Attini provavelmente não seria a principal forma desse cultivo. Posteriormente esse hábito foi abandonado por ter surgido um mais eficiente e adequado para o seu cultivo de fungo (Wheeler, 1907; Mueller *et al.*, 2001).

A hipótese do carreamento do fungo pelas formigas por meio de *pellets* infra bucais foi investigado por Wheeler & Bailey em 1920 quando constataram que dependendo dos hábitos alimentares das formigas eram encontrados nas bolsas infrabucais fragmentos de insetos, plantas e fungos mas bactérias foram bem raras (Bailey, 1920; Wheeler e Bailey, 1920). Esporos e hifas sempre foram encontradas no *pellet* e possibilitando a dispersão dos fungos por meio das bolsas infra bucais, podendo assim ter ocasionado o crescimento do fungo na colônia das formigas (Bailey, 1920; Mueller *et al.*, 2001). Análises do tamanho de esporos e hifas do fungo Leucocoprinae demonstraram que ele é compatível com o tamanho da bolsa infra bucal das formigas cultivadoras de fungos podendo ter sido carregados dessa forma pelos ancestrais das Attini (Mueller *et al.*, 2001).

A evolução do cultivo de fungo ocorreu em etapas que podem ser consideradas como um modelo tradicional de “consumo primeiro”, o qual iniciaria pelo crescimento do fungo em um local onde foi depositado fezes das formigas, e por causa dos nutrientes contidos nas fezes apenas uma quantidade restrita de fungos conseguiria crescer (Weber,

1958; Mueller *et al.*, 2001). Depois desse crescimento, houve então a colheita do fungo pelas formigas para o consumo próprio, em que as operárias adultas regurgitavam depois para suas larvas esse alimento. As formigas forneceram outros substratos para o fungo crescer como folhas e fezes de outros insetos, permitindo o crescimento de um jardim de fungos. Sendo ele uma parte da sua dieta, o cultivo desse fungo pelas formigas foi evoluindo, fornecendo o substrato seguido pela transmissão do fungo para os ninhos descendentes através das fêmeas que deixariam o ninho para fundar uma nova colônia carregando fragmentos da hifa nas bolsas infra bucais (Weber, 1958). Esse modelo corrobora a hipótese da origem por meio da alimentação por sementes armazenadas, parede do ninho, madeira apodrecida, micorriza e carcaças de artrópodes (Weber, 1958; Mueller *et al.*, 2001). Há ainda um modelo alternativo de “transmissão primeiro” onde as formigas seriam dispersoras do fungo especializado, depois passariam a se alimentar desse fungo e posteriormente o cultivariam fornecendo o substrato para ele (Mueller *et al.*, 2001).

Na região neotropical, as formigas cortadeiras são as mais facilmente encontradas, e recebem essa denominação por causa do hábito de cortar a folha, que são usadas como substrato para o cultivo dos fungos (Weber, 1966) (FIG. 1). Em alguns casos, as formigas cortadeiras podem ser consideradas como uma espécie praga, pois elas cortam partes frescas de plantas cultivadas, danificando a plantação e causando prejuízo econômico (Hernández e Jaffé, 1995; Nিকেle *et al.*, 2013). O uso de material vegetal fresco como substrato para a agricultura do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* confere às formigas cortadeiras o status de principal herbívoro da região neo (sub) tropical (Fowler *et al.*, 1989; Kooij *et al.*, 2011).

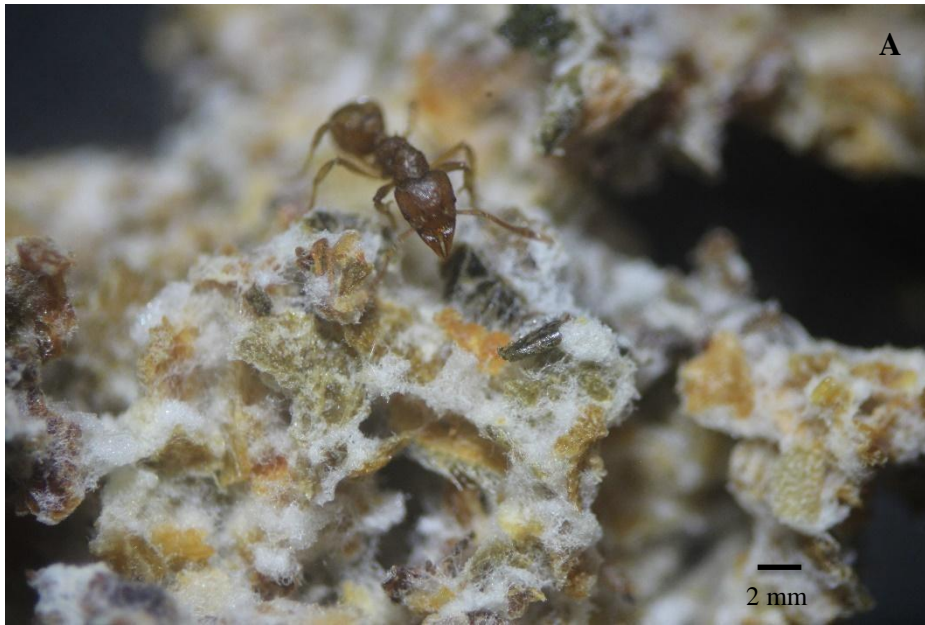


Figura 1: Fungo *Leucoagaricus gongylophorus* retirado de um ninho de *Atta sexdens rubropilosa* mantida em laboratório coletada no Parque Estadual do Rio Doce (A); colônia de formiga *Acromyrmex* sp. com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* coletado na Fazenda Itapoã da Vallourec (B). Fonte: Arquivo pessoal

1.3 Formigas cultivadoras de fungos e outros micro-organismos associados

As formigas cortadeiras apresentam uma gama de micro-organismos associados a sua colônia bem como aderidas ao seu corpo podendo essa relação ser benéfica ou prejudicial ao fungo (Pagnocca *et al.*, 1996).

Na busca de micro-organismos associados a colônia das formigas cortadeiras *Atta sexdens* procedente de Manaus (Amazonas, Brasil), Gonzaga *et al* (2015) encontraram além do *Leucoagaricus gongylophorus*, outros fungos filamentosos como *Trichoderma sp.* e *Aspergillus sp.*, *Bionectria ochroleuca*, *Pichia caribbica*, *Trichoderma longibirachiatum*, *Nectria haematococca*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium solan* que foram identificados por meio de características morfológicas e moleculares, não sendo os fungos, neste estudo, classificados como favoráveis ou desfavoráveis para a colônia avaliada.

Assim como no estudo de Gonzaga *et al* (2015), Rodrigues *et al* (2005), em seu estudo, apenas identificaram os micro-organismos presentes em colônias de *Atta sexdens*. Foram realizadas comparações entre micro-organismos encontrados em ninhos na natureza e em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* procedentes de Corumbataí (São Paulo, Brasil) e mantidas em laboratório. Naquelas mantidas em laboratório, os organismos predominantes foram *Syncephalastrum racemosum*, *Escovopsi weberi* e *Fusarium solani*. Em ninhos no campo as espécies dominantes foram *Trichoderma harzianum*, *Fusarium oxysporum* e *E. weberi*. Tanto nas colônias alocadas na natureza quanto as mantidas em laboratório foram as espécies *Acremonium strictum*, *Acremonium kiliense*, *E. weberi*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Moniliella suaveolens*, *Penicillium citrinum*. Além dessas, foram encontradas em colônias na natureza ou mantidas em laboratório os seguintes microorganismos: *T. harzianum* e *Moniliella suaveolens*, *Penicillium sp. subgen. Furcatum*, *Piptocephalis sp.*, *Syncephalastrum racemosum*, *Mycelia sterila*, *Trichothecium roseum*, *Trichoderma sp.*, *Metarhizium anisopliae var. anisopliae*, *Mariannaea elegans var. elegans*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium verticillioides*, *Cunninghamella elegans*, *Cunninghamella echinulata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Arthrotrys cladodes*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger var. niger* (Rodrigues *et al.*, 2005).

Dentre os micro-organismos relatados como presentes no jardim de fungo, o microfungo *Escovopsis* (Ascomycota) é um dos parasitas patogênicos do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* sendo que a ocorrência do *Escovopsis* é maior nos jardins de fungos cultivados pelas formigas que realizam a agricultura basal, devido ao modo de reprodução semelhante entre esses dois fungos (Currie *et al.*, 1999; Currie e Stuart, 2001;

Gonzaga *et al.*, 2015). No estudo realizado por Currie e Stuart (2001), o *Trichoderma spp.* foi outro parasita patogênico encontrado associado ao jardim do fungo *L. gongylophorus*. No caso desse dois patógenos, *Trichoderma* e *Escovopsis*, as formigas são capazes de eliminá-los retirando do jardim mecanicamente a parte que estavam presentes os fungos invasores (Currie e Stuart, 2001).

Assim como o *Escovopsis* e o *Trichoderma*, o fungo *Metarhizium anisopliae* é um patógeno encontrado associado ao ninho das formigas. No estudo realizado por Lopez e Orduz (2002) foi relatado que o *M. anisopliae* é utilizado para o controle biológico das formigas cortadeiras e neste estudo, as formigas morreram antes do fungo. Ainda neste estudo, foi detectado também o *Trichoderma viride*, que assim como o *M. anisopliae*, foi efetivo para a morte do fungo *L. gongylophorus* e o controle das formigas cortadeiras.

Além dos patógenos já relacionados anteriormente as formigas cortadeiras em geral, o estudo de Santos *et al.* (2004) relatou que a presença do fungo *Beauveria bassiana* é altamente patogênico para *Atta sexdens rubropilosa*, e, esse fungo, foi encontrado no corpo das formigas de um jardim que estava contaminado com o *B. bassiana*. Ainda neste estudo o fungo *B. bassiana* foi utilizado como referência para observar a eficiência de micro-organismos para a proteção da colônia, em relação a esse patógeno. Dentre os micro-organismos isolados, destacou-se a bactéria *Burkholderia sp.*, que possui ação antifúngica e geralmente é encontrada nas colônias das formigas cortadeiras. Essa bactéria aparentemente desempenha um papel importante para a defesa do ninho contra fungos patogênicos (Santos *et al.*, 2004).

Com relação às associações positivas, além da bactéria *Burkholderia sp.*, Poulsen *et al.* (2005) afirma que as formigas do gênero *Acromyrmex* mantém dois micro-organismos mutualísticos, o fungo *L. gongylophorus* e a bactéria *Pseudonocardia* produtora de antibióticos que inibem o crescimento do parasita. Além desses micro-organismos, há presença de bactérias fixadoras de nitrogênio que auxiliam na reciclagem de nitrogênio e fósforo em colônias de *Acromyrmex* (Pinto-Tomás *et al.*, 2009).

1. O FUNGO *Leucoagaricus gongylophorus*

Os fungos basidiomicetos e alguns ascomicetos são importantes para alimentação de vários grupos, tendo potencial para que ocorra uma simbiose. Os basidiomicetos são divididos em dois grandes grupos os homobasidiomicetos e heterobasidiomicetos que diferem na posição do basídio, que é a estrutura presente na lamela responsável pela produção dos esporos (basidiósporos) dos basidiomicetos. Os heterobasidiomicetos possuem o basídio ramificado e apresenta septos transversais, nos homobasidiomicetos não há presença de septos e eles podem ou não apresentar ramificações (Lacaz *et al.*, 1996).

A ordem Agaricales é pertencente a divisão dos homobasidiomicetos, e uma das famílias dessa ordem é a Lepiotaceae na qual a tribo Leucocoprinae está inserida (Lacaz *et al.*, 1996). Esta tribo têm como características a lamela trabecular e uma parede complexa de esporos, que pode conter um poro germinal. Seus esporos são esbranquiçados podendo também serem encontrados mais dificilmente na cor verde (Vellinga, 2000). Esses fungos são de difícil identificação pois geralmente desenvolvem hifas estéreis (Silva, 2004).

O fungo cultivado pelas formigas cortadeiras é o *Leucoagaricus/Leucocoprinus* (Silva-Pinhati *et al.*, 2004) que apresenta uma parede de esporos branca fina, trabecular, o basidiósporo podendo ou não conter o poro germinal, a pileipelis - camada mais superior da hifa num corpo de frutificação – pode ser em tricodema ou córtis, há muitas cheilocystidia e não são encontrados grampos de conexão (Vellinga, 2000; Ortiz *et al.*, 2008). A espécie *Legongylophorus* possui gongilídeos, estrutura exclusiva desse fungo (Castellani *et al.*, 2007; Miyashira *et al.*, 2010).

Os gongilídeos (FIG. 2) são estruturas arredondadas na extremidade das hifas que formam cachos chamados de estáfilos ricos em nutrientes, que são fonte de alimentação para as larvas e formigas, fornecendo para elas os polímeros vegetais recalcitrantes, que naturalmente as formigas não conseguiriam degradar, em forma de nutrientes disponíveis (Weber, 1966; Rønhede *et al.*, 2004; Aylward *et al.*, 2015).

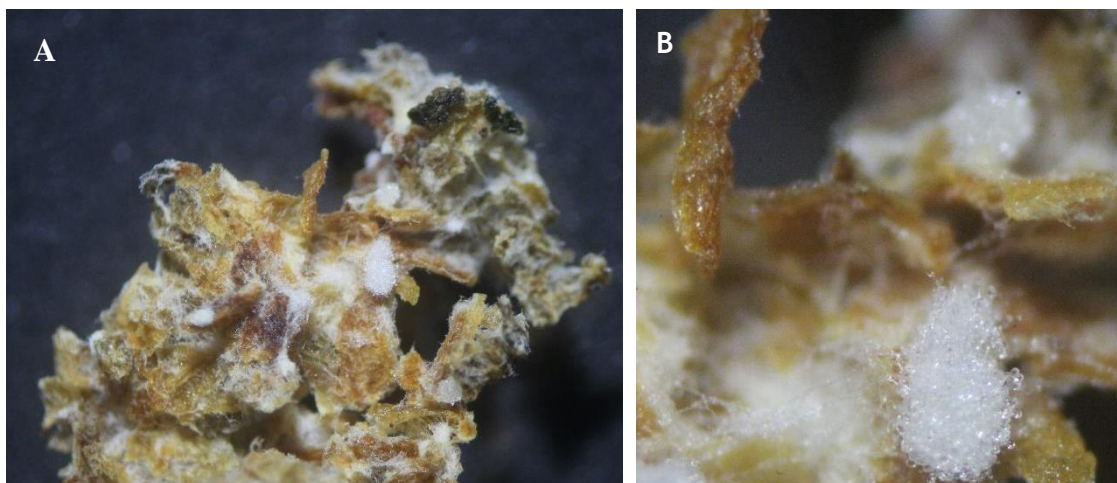


Figura 2: Fungo *Leucoagaricus gongylophorus* retirado da colônia de *Atta sexdens rubropilosa* mantida em laboratório com a estrutura do gongilídeo(A) e gongilídeo em destaque (B).

Os gongilídeos além de fornecer a alimentação das formigas, concentra enzimas que possuem atividade hidrolítica contra vários polímeros de origem vegetal, degradando a biomassa vegetal (Boyd e Martin, 1975b; Rønhede *et al.*, 2004). No entanto, não é conhecido a quantidade de cada enzima que é produzida por *L. gongylophorus* (Aylward *et al.*, 2015).

Moller (1893) foi o primeiro a associar os gongilídeos no micélio vegetativo aos basidiomas e nomeou a espécie de *Rozites gongylophorus* e incluía *Xylaria*, *Bargellinia*, *Rhizomorpha*, *Locellinia*, *Poroniopsis*, *Lentinus* e *Tyridiomyces* pertencentes aos Ascomicetos e Basidiomicetos. Estudos mostraram divergência do fungo cultivado por diferentes espécies de formigas e rejeição do fungo de uma colônia para outra, porém posteriormente associaram essa rejeição a ferormônios diferente depositados pelas espécies de formigas. Devida a essas observações, a nomenclatura do fungo foi redefinida como *Leucocoprinus gongylophora* por Heim em 1957 e *Leucoagaricus* ou *Agaricus gongylophora* por Singer em 1965 (Weber, 1966).

A coevolução entre a formiga e o fungo permitiu a simbiose entre os grupos fornecendo a alimentação para ambos. As formigas conseguem obter nutrientes mais facilmente por meio de suas enzimas produzidas pelo fungo que tornam os carboidratos, aminoácidos, proteínas, lipídeos e vitaminas mais acessíveis, e por outro lado, as formigas fornecem o substrato para o crescimento do fungo (Mueller *et al.*, 2001), e podendo

também eliminar possíveis pragas do jardim de fungo (Currie e Stuart, 2001). A formiga ainda realiza a capina e aliciamiento do fungo, onde são retirados fungos mortos ou contaminados além de selecionar os esporos de fungos invasores para retirar do jardim. Essa relação é útil para a compreensão da ecologia e evolução entre os micro-organismos e hospedeiros (Currie e Stuart, 2001).

Os jardins de fungos apresentam configuração em estratos. O material vegetal fresco é depositado pelas formigas nas camadas superiores, macerados em pequenos pedaços, em seguida depositam gotículas de material fecal em cima da material vegetal e inoculam outras culturas de estratos mais antigos do fungo (Martin, 1970; Martin e Martin, 1970; Martin e Martin, 1971; Boyd e Martin, 1975a; b; Martin *et al.*, 1975; Rønhede *et al.*, 2004; Aylward *et al.*, 2015).

O fluido fecal das formigas cortadeiras contém proteases ativas semelhantes às produzidas pelos fungos, sugerindo que elas passam pelo trato digestivo das formigas sem sofrer alterações. Além de proteases, também foram encontradas nesse fluido Enzimas Ativas em Carboidratos (CAZymes) e Enzimas Fúngicas Oxidativas degradantes de Lignina (FOLymes). Por isso a deposição do fluido sobre o material vegetal auxilia no início da degradação dos nutrientes (Martin, 1970; Martin e Martin, 1970; Martin e Martin, 1971; Boyd e Martin, 1975a; b; Martin *et al.*, 1975; Rønhede *et al.*, 2004; Aylward *et al.*, 2015).

O material fresco depositado no jardim de fungo é degradado em etapas, ao longo da sua movimentação para camadas mais inferiores (Kooij *et al.*, 2011; Aylward *et al.*, 2015) e apresentam diferentes estágios de degradação, sendo eles uma seção superior com coloração verde escura por causa do substrato e pouco crescimento de novos tufo de micélio que foram depositados pelas formigas, a seção intermediária com maior crescimento micelial onde o gongilídeo é produzido e onde as larvas de formigas são mantidas e a seção inferior com crescimento do micélio densa com material vegetal degradado e onde as formigas descartam a parte morta do fungo (Weber, 1966; 1972).

2.1 Cultivo do fungo em laboratório

Para estudar as enzimas produzidas por *Leucoagaricus gongylophorus* é necessário fazer a coleta do ninho e o cultivo do fungo em laboratório por não ser encontrado na natureza desassociado dos ninhos das formigas cortadeiras. Além disso, o crescimento do fungo em laboratório utilizando meio de cultura é lento (Borba *et al.*, 2006), embora existam relatos de cultivo desse fungo em diferentes meios de cultura.

O cultivo proposto por Pagnocca (1996) e que teve o meio de cultura considerado o melhor por Borba *et al.* (2006) consiste na manutenção do fungo em um meio de cultura contendo 10 gramas de glucose, 5 gramas de cloreto de sódio, 5 gramas de bacto peptona, 10 gramas de extrato de malte e 15 gramas de ágar em 1000 mililitros de água destilada. As culturas eram mantidas nesse meio de cultura com o objetivo de obter a massa micelial que é utilizada para fazer um inóculo posterior. Esse inóculo foi mantido em tubos 250 x 25 mm contendo 20 ml de meio sólido por 30 dias para o crescimento do fungo.

Com objetivo de induzir a produção de polissacaridases, Silva *et al.* (2006) realizou o cultivo do *L. gongylophorus* utilizando uma cepa isolada de um ninho de *Atta sexdens*. O meio continha Agar Nitrogênio Levedura Base (0,67g por 100 mL) adicionado de tampão citrato-fosfato 75mM e 0,5 g por 100mL de cada polissacarídeo de interesse (amido, pectina, celulose ou xilano). O cultivo foi mantido por 30 dias a 25°C em culturas estacionárias.

Borba *et al.* (2006) utilizou dois meios de cultura para o crescimento de *L. gongylophorus* crescidos em cada um de melaço, extratos de azevém, tifa ou formiga. Um dos meios foi o ágar nutritivo composto por 5g de peptona, 3g extrato de carne, 1g de cloreto de sódio, 15g de de ágar e 1000 mL de água destilada. O outro meio foi o BDA preparado com 200g de batata, 20g de dextrose e 15g de ágar para 1000mL de água destilada. Os meios foram plaqueados, discos com micélio do fungo foram inoculados e as placas mantidas em câmaras climatizadas a 25°C ± 1. O tratamento realizado com ágar nutritivo + tifa obteve o melhor crescimento do fungo em diâmetro (Borba *et al.*, 2006).

2. ENZIMAS

Os organismos vivos dependem da catálise de reações químicas para se manterem vivos. As atividades de catálise são realizadas por enzimas que atuam acelerando as reações e permitindo que elas ocorram no tempo necessário para o organismo sobreviver (Dixon e Webb, 1958; Monteiro e Silva, 2009)

As enzimas são proteínas, com exceção de um grupo que são formadas por moléculas de RNA (RNA com atividade catalítica), altamente específicas com relação aos substratos sobre o qual vão atuar e possuem a temperatura e pH ótimo de funcionamento acelerando a velocidade das reações. Além disso, elas não são consumidas, não são alteradas durante as reações e não afetam o equilíbrio das reações (Dixon e Webb, 1958; Monteiro e Silva, 2009). A atuação delas ocorre em sequências organizadas e catalisam reações sucessivas degradando nutrientes, mantendo a energia e a partir de moléculas precursoras simples sintetizam macromoléculas biológicas. Assim, as vias metabólicas são organizadas pelas enzimas reguladoras de modo que todas as ações ocorram de maneira harmoniosa para manter a vida (Dixon e Webb, 1958)

A alta especificidade que a enzima possui está relacionada a uma fenda de ligação com o substrato chamado sítio ativo que é formado pelos grupos das cadeias laterais dos aminoácidos que conectam ao substrato por ligações não covalentes. Podem apresentar também sítio alostérico que alteram a conformação da proteína podendo aumentar ou reduzir a atividade enzimática (Dixon e Webb, 1958).

Para que a enzima atue é necessário que a sua integridade estrutural seja mantida pois caso haja desnaturação ou dissociação em subunidades a enzima perde a sua função. O peso molecular de uma enzima pode variar entre 12.000 e mais de 1 milhão. Elas podem atuar sozinhas ou precisar de um cofator ou uma coenzima (molécula metalorgânica) para agir (Dixon e Webb, 1958).

As enzimas recebem nomes que seguem uma nomenclatura que geralmente é obtida utilizando o sufixo *-ase* ao nome do substrato ao qual se associa ou a palavra que descreve sua atividade. Porém algumas enzimas são descritas com mais de um nome enquanto outras com atividades diferentes possuem o mesmo nome. Por isso a

International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) propôs um sistema de nomenclatura e classificação das enzimas em seis classes (Tabela 1) baseadas na natureza da reação química catalisada onde para cada enzima é atribuído um nome sistemático e um número com quatro dígitos que identificam, respectivamente, a classe, a subclasse dentro da classe, os grupos químicos específicos que participam da reação e a enzima propriamente dita acompanhado pelas letras E.C. (Enzyme Commission) (Cornish-Bowden, 2014; IUBMB, 2017).

Tabela 1: Classificação das enzimas

Número da classe	Classe	Reação catalizada
1	Oxiredutase	Reações de oxi redução, transferência de elétrons
2	Transferase	Reações de transferência de grupos funcionais
3	Hidrolase	Reações que utilizam a água como receptor de grupos funcionais
4	Liase	Reações que resultam na quebra ou formação de ligações duplas, retirando ou adicionando grupos funcionais
5	Isomerase	Reações de isomeração
6	Ligase	Reações que formam ligação entre duas moléculas com gasto de energia

A classe das enzimas oxi-redutases recebem o número 1, pertencem as enzimas que catalisam reações de oxi-redução e possui como substrato um hidrogênio ou um doador de elétrons. Essa classe é comumente chamada de desidrogenase ou oxidase se o oxigênio for o aceptor e possui 22 subclasses devido aos diferentes grupos doadores ou aceptores (Cornish-Bowden, 2014; IUBMB, 2017).

Na classe das transferases estão as enzimas que catalisam as reações de transferência de grupo entre as moléculas e recebe o número 2. O doador pode ser uma coenzima que carrega o grupo a ser transferido (Cornish-Bowden, 2014; IUBM, 2017).

As hidrolases recebem o número 3 e catalisam reações de hidrólise de ligações covalentes. Algumas hidrolases são pouco específicas (Cornish-Bowden, 2014; IUBM, 2017).

As liases recebem o número 4 e catalisam clivagem de ligações C-C, C-O, C-N através de hidrólise ou oxidação. Ao contrário das outras enzimas, elas tem dois substratos envolvidos em uma direção e apenas um na outra direção da reação. Quando a reação em que dois substratos originam um produto, pode ser chamada de sintase (Cornish-Bowden, 2014; IUBM, 2017).

As isomerases que recebem o número 5, catalisam reação de modificação de uma molécula para formas isoméricas (Cornish-Bowden, 2014; IUBM, 2017).

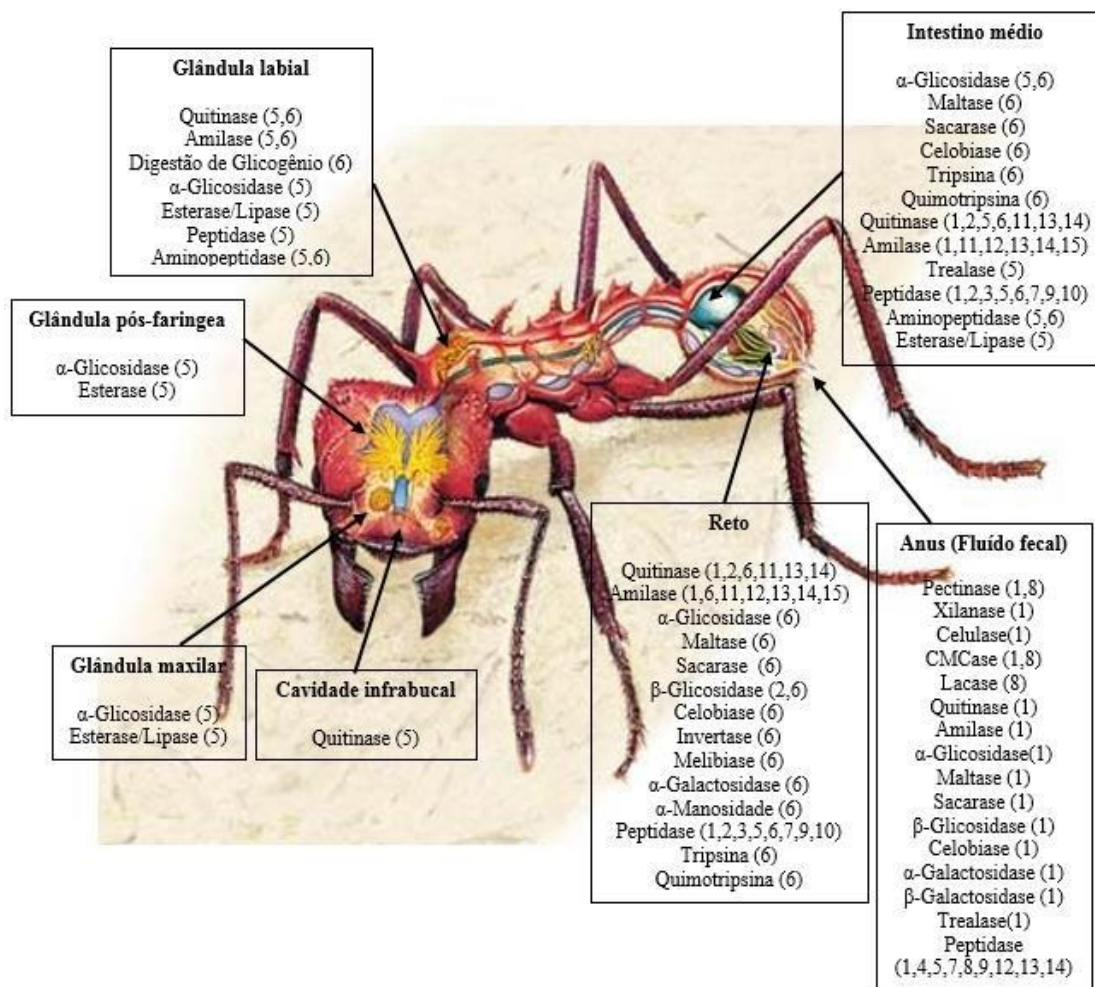
As ligases recebem o número 6 e catalisam reações de síntese de nova molécula por meio da ligação de duas outras moléculas, juntamente com a hidrólise de ATP ou outro composto trifosfatado. Podem ser chamadas também de ligases, carboxilases ou sintetases. (Cornish-Bowden, 2014)

As enzimas possuem um alto potencial biotecnológico por apresentarem características úteis em diversos setores industriais podendo ser aplicado em diversas áreas como controle de pragas, indústria farmacêutica, indústria de cosméticos, indústria alimentícia, degradação de compostos tóxicos, biodegradação, produção de biocombustível, produção de papel, indústria têxtil e biorreatores (Schols *et al.*, 1990; Deguchi *et al.*, 1997; Bajpai, 1999; Bhat, 2000; Reis *et al.*, 2001; Pérez *et al.*, 2002; Couto e Sanromán, 2005; Richard *et al.*, 2005; Santi, 2005; Numan e Bhosle, 2006; Dodd e Cann, 2009; Madhavi e Lele, 2009; Yin *et al.*, 2012; Aylward, Frank O. *et al.*, 2013; Silva, 2014; Pollegioni *et al.*, 2015; Barreto, 2016; Upadhyay *et al.*, 2016).

3.1 Enzimas produzidas por *Leucoagaricus gongylophorus*

As enzimas produzidas por *L. gongylophorus* (Tabela 2) possibilitam que as formigas simbiotes assimilem os polissacarídeos de plantas como xilana, pectina e amido que representam até 60% do peso seco da folha, além da celulose, o que apenas com as enzimas do trato gastrointestinal das formigas (Fig.3) não seria possível. Porém, a celulose que se acreditava ser a principal fonte de carbono para a nutrição simbiote não foi a mais relevante (De Siqueira *et al.*, 1998).

As enzimas produzidas por fungos e bactérias são vantajosas para aplicações biotecnológicas pois esses micro-organismos podem ser manipulados e produzidos em grande escala além de poderem ser modificados para a produção do que é relevante.



Nota: As setas indicam as regiões do canal alimentar das formigas e as enzimas encontradas estão relatadas nas caixas de texto. Referências das enzimas descritas: MARTIN, 1970 (1,2,3,5,7,9,10); MARTIN et al. 1973 (2,11,12,13,14,15); MARTIN et al., 1975 (1); FEBVAY e KERMARREC,

Figura 3: Enzimas encontradas no sistema digestivo das formigas cortadeiras

Fonte: adaptado de Moreira et al. 2011.

Muitas das enzimas produzidas por esse fungo têm aplicações biotecnológicas, porém a sua extração e investigação sobre o potencial catalítico dessas enzimas são, em

sua maioria, desconhecidos. O cultivo do *L. gongylophorus* obtido da formiga *Atta sexdens* foi realizado para observar o potencial enzimático da pectinase, amilase, xilanase, e celulase produzidas pelo fungo em diferentes substratos (pectina, amido, xilano, celulose e glucose) (Silva et al., 2006). A enzima que apresentou maior atividade enzimática foi a pectinase. A celulase foi a enzima com menor atividade enzimática, tendo baixa produção em todos os substratos. O estudo mostrou que as enzimas tem atividades diferentes em substratos distintos (Silva et al., 2006).

Tabela 2: Enzimas produzidas pelo fungo *Leucoagaricus gongylophorus*

Classe da enzima	Enzima	Identificação da <i>Enzyme Commission</i> (EC)	Referências
Oxiredutase	Lignina peroxidase	EC 1.11.1.14	(Orth e Tien, 1995)
	Manganês peroxidase	EC 1.11.1.13	(Orth e Tien, 1995)
	Lacase	EC 1.10.3.2	(Rønhede <i>et al.</i> , 2004; De Fine Licht <i>et al.</i> , 2013; Ike <i>et al.</i> , 2015)
	Catecol Oxidase	EC 1.10.3.1	(Nichols-Orians, 1991)
	Glioxal oxidase	EC 1.2.3.15	(Aylward, Frank O. <i>et al.</i> , 2013)
Hidrolase	Pectinesterase	EC 3.1.1.11	(Rønhede <i>et al.</i> , 2004; Schiøtt <i>et al.</i> , 2010; Aylward, Frank O. <i>et al.</i> , 2013)
	Tanase	EC 3.1.1.20	(Martin, 1992)
	Arabinofuranosidase	EC 3.2.1.55	(Schiøtt <i>et al.</i> , 2010)
	Celulase	EC 3.2.1.4	(Martin e Weber, 1969; Martin <i>et al.</i> , 1973; Martin, 1992; Schiøtt <i>et al.</i> , 2008; De Fine Licht <i>et al.</i> , 2010; Rønhede <i>et al.</i> ,

		2004; Richard <i>et al.</i> , 2005)
Xilanase	EC 3.2.1.8	(Martin <i>et al.</i> , 1973; Richard <i>et al.</i> , 2005; Schiøtt <i>et al.</i> , 2008; De Fine Licht <i>et al.</i> , 2010; Aylward, Frank O. <i>et al.</i> , 2013)
α -amilase	EC 3.2.1.1	(Martin <i>et al.</i> , 1973; D'ettorre <i>et al.</i> , 2002; Richard <i>et al.</i> , 2005; Silva <i>et al.</i> , 2006; De Fine Licht <i>et al.</i> , 2010; Aylward, Frank O. <i>et al.</i> , 2013)
Dextranase	EC 3.2.1.11	(Aylward, Frank O. <i>et al.</i> , 2013)
Laminarase	EC 3.2.1.6	(Richard <i>et al.</i> , 2005)
Maltase	EC 3.2.1.20	(D'ettorre <i>et al.</i> , 2002; Richard <i>et al.</i> , 2005; Silva <i>et al.</i> , 2006; Aylward, Frank O. <i>et al.</i> , 2013)
Pululanase	EC 3.2.1.41	(Richard <i>et al.</i> , 2005; De Fine Licht <i>et al.</i> , 2010; Aylward, Frank O. <i>et al.</i> , 2013)
Chitosanase	EC 3.2.1.132	(De Fine Licht <i>et al.</i> , 2010)
Xyloglucanase	EC 3.2.1.151	(De Fine Licht <i>et al.</i> , 2010)
Aspartil protease	EC 3.4.23.24	Aylward, Frank O. <i>et al.</i> , 2013
Endoprotease	EC 3.4.21	De Fine Licht <i>et al.</i> , 2010

	Metaloprotease	E.C. 3. 4. 24	Aylward, Frank O. <i>et al.</i> , 2013
	Cutinase	EC 3.1.1.74	(Aylward, Frank O. <i>et al.</i> , 2013)
	Chitinase	EC 3.2.1.14	(Martin <i>et al.</i> , 1973; Aylward, Frank O. <i>et al.</i> , 2013)
	Acetil – xilano esterase	EC 3.1.1.72	(Aylward, Frank O. <i>et al.</i> , 2013)
	Xylosidase	EC 3.2.1.37	(D'ettorre <i>et al.</i> , 2002; Aylward, Frank O. <i>et al.</i> , 2013)
	Galactosidase	EC 3.2.1.23	(D'ettorre <i>et al.</i> , 2002; Richard <i>et al.</i> , 2005)
	Endogalactanase	EC 3.2.1.89	(Schiøtt <i>et al.</i> , 2010)
	Rhamnogalacturonano acetylerase	EC 3.1.1.86	(Schiøtt <i>et al.</i> , 2010)
	Arabinogalactano endo-1,4-β-galactosidase	EC 3.2.1.89	(Schiøtt <i>et al.</i> , 2010)
Liase	Pectato liase	EC 4.2.2.2	(Schiøtt <i>et al.</i> , 2010)
	Rhamnogalacturonan liase	EC 4.2.2.23	(Aylward, Frank O. <i>et al.</i> , 2013; De Fine Licht <i>et al.</i> , 2010)
	Pectina Liase	EC 4.2.2.10	(Rønhede <i>et al.</i> , 2004; Schiøtt <i>et al.</i> , 2010; Aylward, Frank O <i>et al.</i> , 2013)

Dentre as enzimas listadas foi possível observar um maior número de enzimas relacionadas na literatura da classe das Hidrolases, sugere-se que tenha ocorrido pa predominância das hidrolases em comercialização de enzimas que correspondente a 75% do mercado, sendo as proteases as mais comercializadas e, em seguida, as glicosilases.

As Glicosilases representam o grupo com mais enzimas relacionadas no presente estudo sendo que das 23 hidrolases citadas com potencial biotecnológico cinco pertencem as glicosilases que são a Rhamnogalacturonano hidrolase, Arabinofurosidase, Celulase, Endo-1,4- β -xylanase e a α -amilase (Bhat, 2000; Uday *et al.*, 2016).

3. HIDROLASES

Grande parte das hidrolases conhecidas foram extraídas de fungos filamentosos. Os fungos filamentosos são vantajosos por serem de fácil cultivo, ter grande produção de enzimas extracelulares com potencial biotecnológico (Colen, 2006)

A nomenclatura de enzimas da IUBMB (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular) agregam as enzimas de acordo com as reações que catalisam e por causa da especificidade enzima-substrato. No caso das hidrolases a nomenclatura EC 3.2.1 indicam hidrólise de ligações *O*-glicosídicas e o número que segue refere-se ao substrato. Essa classificação serve para evitar ambiguidade (CAZy, 2018) (Henrissat, 1991).

Henrissat (1991) e Henrissat & Bairoch (1996) propuseram uma classificação das glicosilases por não considerarem a nomenclatura da IUBMB eficientes para demonstrar características estruturais das enzimas além de não abrangerem adequadamente as enzimas com ampla especificidade e ainda, a nova proposta auxilia a compreensão das relações evolutivas entre as enzimas. Por isso, uma classificação baseada em sequências de nucleotídeos seria viável devido a facilidade de sequenciamento de genes e aumento no desenvolvimento das estruturas tridimensionais da enzimas revelando enzimas mais semelhantes estruturalmente (CAZy, 2018) (Henrissat, 1991; Henrissat e Bairoch, 1996).

Foi criado então um banco de dados chamado Carbohydrate-Active enZymes (CAZy) que mantém uma lista atualizada das famílias glicosil-hidrolases que degradam, modificam ou criam ligações glicosídicas. Esse banco inclui aproximadamente 300 famílias de proteínas de acordo com as atividades que elas exercem divididas em 5 grupos: Glicosil hidrolases (GH), Glicosil transferases (GT), Polissacarídeo liase (PL),

Carboidrato esterase (CE) e Atividades Auxiliares (AA) além de um Módulo de Carboidratos ligados (CBM) (Cantarel *et al.*, 2009; CAZy, 2018).

Esse banco de dados fornece informações do genoma estrutura e da bioquímica das enzimas ativas de carboidratos que estão disponíveis na internet desde 1998 e atualizadas regularmente mediante a adição de novos genomas em sua base de dados (CAZy, 2018).

As famílias ainda podem ser agrupadas em clãs quando as sequências das proteínas estão relacionadas a mais de uma família, quando tem alta sensibilidade dos métodos de comparação das sequências ou quando estruturalmente são semelhantes embora pertençam a famílias distintas (CAZy, 2018).

As glicosilases são divididas em clãs em que as enzimas possuem o mesmo sítio ativo, porém, diferem conformacionalmente. As enzimas glicosil hidrolases são classificadas em mais de 100 famílias pelo Enzyme Commission (EC) sendo os fungos produtores de enzimas incluídas em 20 dessas famílias por apresentarem estrutura tridimensional e mecanismos moleculares semelhantes (Collins *et al.*, 2005).

Pouco se conhece a respeito do potencial catalítico das enzimas produzidas pelo fungo *L. gongylophorus*. Porém, a ação das mesmas enzimas produzidas por outros fungos e bactérias já foram relatadas e com base nos potenciais destas pode-se inferir que as produzidas por *L. gongylophorus* também podem ser eficientes. A seguir, é descrito o que se conhece sobre as glicosilases que também são produzidas pelo *L. gongylophorus*.

4.1 Rhamnogalacturonano hidrolase

A rhamnogalacturonano hidrolase realiza a endohidrólise da ligação glicosídica de α -D- α -(1-4)-d-galacturonosil (α GalA) e α -(1-2)-l-rhamnogalacturonosil (α Rha) no esqueleto de rhamnogalacturonano I (RG I) produzindo oligogalacturonatos (IUBMB, 2017). A enzima rhamnogalacturonano hidrolase (EC 3.2.1.171) pertence à família 28 das glicosil hidrolases, e é composta por uma única cadeia de polipeptídeos com 422 resíduos de aminoácidos (Petersen *et al.*, 1997). O Rhamnogalacturonano I (FIG 4) é composto por dissacarídeos repetitivos de ácido rhamnose-galacturônico e podem carregar cadeias laterais de açúcares neutros como a galactose, arabinose e xilose (FIG 5). (Pedrolli *et al.*,

2009; Normand *et al.*, 2010). O RG I é bastante encontrado em paredes celulares vegetais e podem afetar a qualidade de frutas e vegetais quando esses são processados para a fabricação de alimentos (Schols e Voragen, 1996).

Ressalta-se que são relatados muitos estudos com as enzimas que atuam sob o homogalacturanano não ramificado. Ao contrário, poucas informações estão disponíveis sobre as que atuam em regiões altamente ramificadas como é o caso do rhamnogalacturanano hidrolase.

As regiões ramificadas modificadas (MHR) são regiões do carboidrato de difícil degradação que ao entrar em contato com outras enzimas podem ser modificadas dando origem a essas regiões (Schols e Voragen, 1996) (FIG. 5). Ao analisar a composição das regiões ramificadas modificadas foi observado que elas são semelhantes a composição da RG I e aos fragmentos das regiões ramificadas descritas por De Vries, que relatou a presença de galactose, arabinose, ácido galacturônico, ramnose e xilose (De Vries *et al.*, 1982), sendo que nas MHR ainda foi observado a presença do ácido galacturônico (Schols e Voragen, 1996). Essas regiões só conseguiram ser degradadas utilizando a RGase porém ela só foi efetiva quando foram removidos os grupos acetil podendo-se inferir que esses estão inseridos em sequencias alternadas do ácido rhamnose-galacturônico (Schols *et al.*, 1990). A degradação de MHR é usada para demonstrar a ação da enzima Rhamnogalacturanano hidrolase (Suykerbuyk *et al.*, 1997). A expressão da enzima rhamnogalacturanano hidrolase foi obtida no fungo *Aspergillus aculeatos* através do cultivo no meio mínimo (Pontecorvo *et al.*, 1953) com polpa de beterraba ou pectina da maçã (Suykerbuyk *et al.*). Embora não tenha sido muito encontrada na literatura, há alguns registros de outros organismos produtores dessa enzima e algumas de suas características (TAB 3).

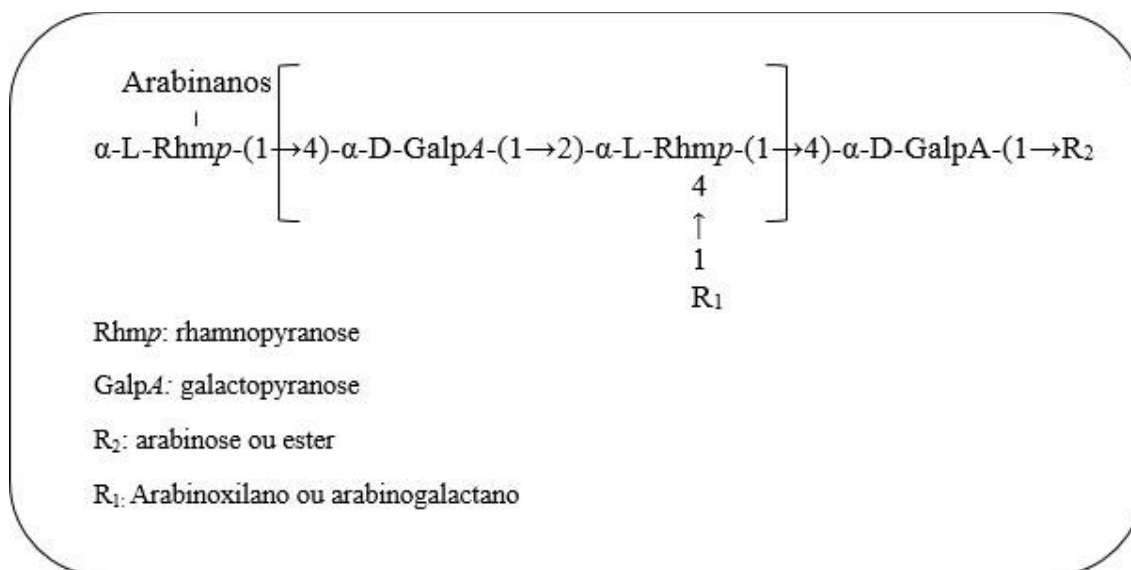


Figura 4: Estrutura da fração sobrenadante de sulfato de amônio de polissacarídeos de semente de linhaça extraídos com KOH (KPI-ASF) que contém a estrutura do Rhamnogalacturanano I (RG-I)

Fonte: adaptado de Ding et al. 2015

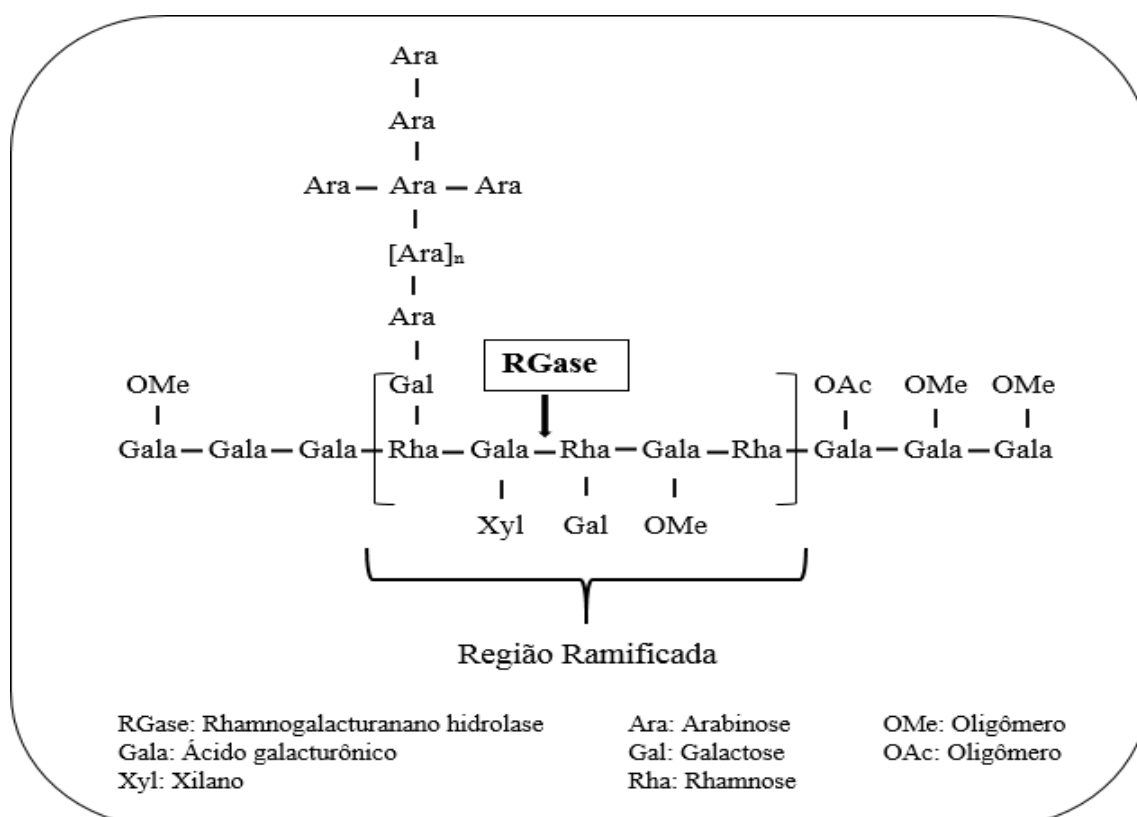


Figura 5: Representação esquemática da estrutura das regiões lisas e ramificadas da pectina, incluindo pectinases, mostrando a ação da enzima Rhamnogalacturanano hidrolase.

Fonte: adaptado de Hennink et al., 1996

Tabela 3: Organismos produtores de Rhamnogalacturanano hidrolase

Organismo	pH	Temperatura °C	Substrato	Referência
<i>Aspergillus aculeatus</i>	3,5 -	30-50 -	Soja Polpa de beterraba	(Kofod <i>et al.</i> , 1994) (Hennink <i>et al.</i> , 1996)
<i>Trametes sanguinea</i>	4,0	37	Protopectina de limão	(Sakamoto <i>et al.</i> , 1994)
<i>Irpex lacteus</i>	4,5-5,0	40-50	Pectina de beterraba	(Normand <i>et al.</i> , 2010)

O preparo de suco de maçã resulta em uma grande quantidade de fragmentos de pectina, tendo em vista que há uma concentração elevada de polissacarídeos no suco de maçã, que podem trazer resultados insatisfatórios para o processamento e armazenagem do suco. Para minimizar esses problemas, o uso de enzimas para a preparação do suco a torna mais eficiente com menos quantidade de fragmentos poliméricos de pectina e melhor qualidade do produto (Schols e Voragen, 1996).

3.1. α -L-Arabinofuranosidase

A α -L-arabinofuranosidase (α -L-AFases) (EC 3.2.1.55) são enzimas acessórias que realizam hidrólise do terminal não-redutor de resíduos de α -L-arabinofurosídeos em α -L-arabinosídeos (Saha, 2000; IUBMB, 2018) (FIG. 6). Os resíduos de α -arabinose são encontrados nos polímeros arabinanos, arabinoxilanos, arabinogalactanos e arabinogalactano presentes na parede celular (Matsuo *et al.*, 2000). As α -L-AFases podem atuar com outras enzimas pécicas e hemicelulases para que ocorra hidrólise completa de pectinas e hemiceluloses pois a presença de grupos arabinose em cadeias laterais podem impedir a hidrólise enzimáticas em processos industriais (Margolles-Clark *et al.*, 1996).

A enzima recebe diversos nomes como arabinosidase, α -arabinosidase, α -L-arabinosidase, α - arabinofuranosidase, arabinofuranosidase, α -L-arabinofuranosídeo hidrolase, L-arabinosidase, α -L-arabinanase e α -N-arabinofuranosidase e α -L-

Arabinofuranosidase (CAZy, 2018). As Arabinofuranosidasas (ABFases) encontram-se em 6 famílias das hidrolases glicosídicas: 3, 10, 43, 51, 54 e 62. Essa classificação é baseada na similaridade sequencial de aminoácidos (FIG 9) e dentro de uma mesma família apresentam características semelhantes quanto ao tipo de substrato, padrão de ação, mecanismo de reação e estrutura tridimensional (Gielkens *et al.*, 1997; Zverlov *et al.*, 1998; Harvey *et al.*, 2000; Matsuo *et al.*, 2000).

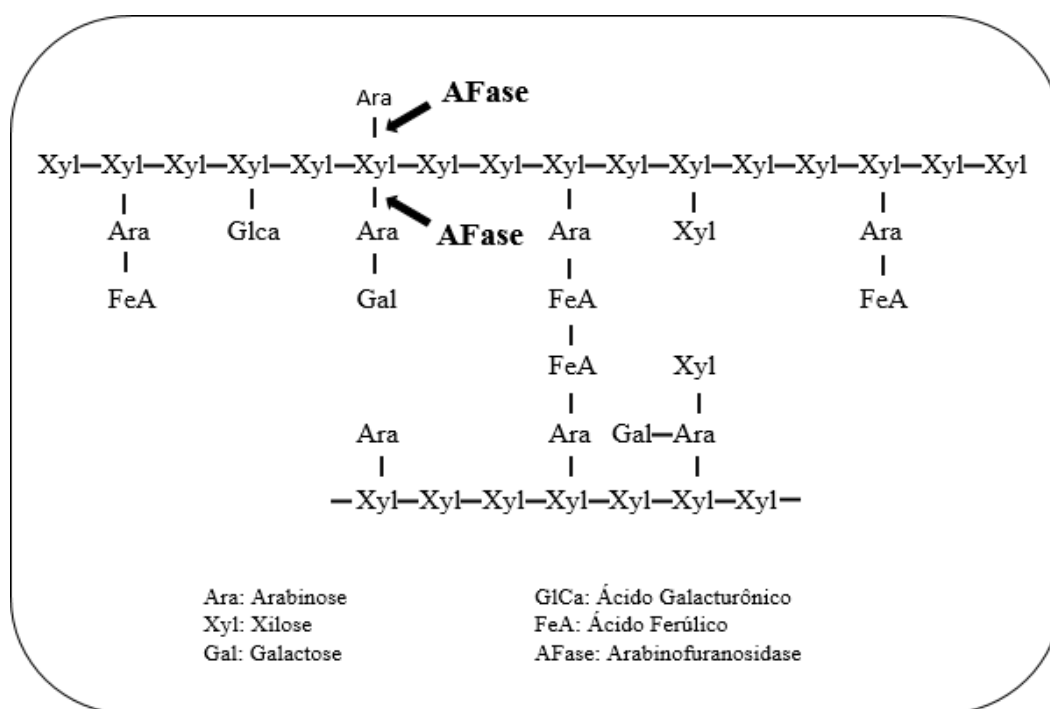


Figura 6: Estrutura de arabinoxilano de trigo solúveis em água, indicando o ponto de ação da enzima Arabinofurnosidase

Fonte: adaptado de Numan e Bhosle

Diversos micro-organismos como os fungos e plantas comprovadamente produzem essa enzima (TAB 4) e algumas de suas características são conhecidas, apesar de não ser relatado na literatura as produzidas por *L. gongylophorus*. Kaji também relata que as enzimas de fungos basidiomicetos apresentam seu ótimo em pH ácido mas observou que para *A. niger* e *C. rolfsii* a enzima apresentava atividade em pH de 1,5 a 9,0

e 1,5 a 10 respectivamente (Kaji, 1984). Essa amplitude de pH é interessante para o uso da enzima em atividades comerciais.

Em um estudo, Kaji demonstrou que a atividade enzimática da arabinofuranosidase foi inibida pela presença de mercúrio (Kaji *et al.*, 1969). No fungo *Aspergillus niger* são conhecidos dois tipos de Arabinofuranosidase: a arabinofuranosidase A e a B, a primeira com um tamanho de 83 KDa e a segunda com 67 kDa (Voragen *et al.*, 1987; Flipphi *et al.*, 1991; Gielkens *et al.*, 1999).

Tabela 4: Organismos produtores de alpha-L-arabinofuranosidase

Organismo	pH ótimo	Temperatura	Substrato	Referência
<i>Scopolia japônica</i>	4,8	-	p-nitrofenil-a-L-arabinofuranosídeo p-nitrofenilglucosídeos	(Tanaka e Uchida, 1978)
<i>Lupinus luteus</i>	4,4 3,5	-	Nitrofenil glicosídeos	(Matheson e Saini, 1977)
<i>Aspergillus niger</i>	3,8 – 4,0 5,0	- 50	Fluido de cultura de <i>A. niger</i> Açúcar de beterraba	(Kaji <i>et al.</i> , 1969) (Vd Veen <i>et al.</i> , 1991).
<i>Corticium rolfsii</i> (<i>Sclerotinia libertiana</i>)	2,5 – 4,0	-	Fibra de batata Fenil- α -L-arabinofuranosídeo	(Byrde e Fielding, 1965; Kaji e Yoshihara, 1969; 1972)
<i>Sclerotinia fructigena</i>	4,0	40	p-nitrofenil-a-L-arabinofuranosídeo	(Fielding e Byrde, 1969)
<i>Rhodoturula flava</i>	2,0	-	Arabinano de beterraba	(Uesaka <i>et al.</i> , 1978)
<i>Bacillus subtilis</i>	6,5 7,0	- 60	p-nitrofenil-a-L-arabinofuranosídeo p-nitrofenil-a-L-arabinofuranosídeo, p-	(Weinstein e Albersheim, 1979)

			nitrofenil- α -L-arabinopiranosídeo	
<i>Streptomyces massasporeus</i>	6,0	-	Arabinano de beterraba	(Kaji <i>et al.</i> , 1981)
<i>Streptomyces purpurascens</i>	6,5	-	Arabinano de beterraba	(Komae <i>et al.</i> , 1982)
<i>Streptomyces lividans</i>	6,0	60	p-nitrofenil α -L-arabinofuranosídeo	(Manin <i>et al.</i> , 1994)
<i>Penicillium capsulatum</i>	4,0	60	Polpa de beterraba e farelo de trigo	(Puls e Coughlan, 1996)
<i>Aspergillus terreus</i>	3,5-4,5	-	Açúcar de beterraba	(Luonteri <i>et al.</i> , 1995)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	7,0	70	p-nitrofenil α -L-arabinofuranosídeo	(Bezalel <i>et al.</i> , 1993)

A arabinofuranosidase é utilizada em vários processos industriais. Dentre eles, a produção de compostos antimetastáticos e anticarcinogênico pelas transformações de ginsenosídeos R_{b2} e R_c que são, respectivamente, L-arabinofuranosídeos e glicosídeos presentes no L-arabinopiranosídeos que são componentes do gengibre (Bae *et al.*, 2000; Shin *et al.*, 2003). É conhecida a ação do α -L-AFases de bactérias intestinais transformando ginsenosídeos em um composto K (20-O- β -D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol) que possui ação antimetastática e anticancerígena por meio do bloqueio da invasão tumoral, evitando aberrações cromossômicas e a formação de tumores (Lee *et al.*, 1999).

A enzima pode ser usada na produção de vinhos e sucos de frutas atuando na liberação de monoterpenóis que por ser uma molécula aromática afeta a sua fragrância e o sabor (Mateo e Jiménez, 2000). As reações envolvem a quebra de açúcar terminal e

ramnose, arabinose ou apiose seguido da liberação do monoterpenol por uma β -D-glicosidase (Gunata *et al.*, 1988).

A produção de sucos de frutas pode ser beneficiada com a arabinofuranosidase também para a redução da formação de precipitado e o aspecto de névoa que se formam devido a presença de arabinanos. Essas cadeias com arabinanos podem ser evitadas com o uso da enzima que aumenta a solubilidade do precipitado (Churms *et al.*, 1983; Voragen *et al.*, 1987) o que melhora a aparência e qualidade dos sucos de frutas.

Na produção de pão, o uso da enzima α -L-AFases pode aumentar a sua vida útil e a qualidade do pão ao realizar a hidrólise de pentosanos na massa liberando pentoses como a arabinose e xiloses, deixando mais carboidratos solúveis na massa. Como consequência, a produção de ácido acético pela bactéria *Lactobacillus hilgardii* aumenta durante a fermentação (Gobbetti *et al.*, 1999).

As enzimas α -L-AFases também podem ser associadas a outras enzimas como as endo-1,4-xilanases e xilosidase para a degradação de hemicelulose (Sørensen *et al.*, 2005). A hemicelulose é subproduto residual durante a produção de bioetanol e a sua degradação é necessária para a conversão eficiente dos seus compostos em biocombustível (etanol) e outros produtos químicos para a indústria por não inibir a fermentação microbiana (Saha, 2003; Sørensen *et al.*, 2005).

Os resíduos de hemicelulose também são um problema na alimentação animal pela sua baixa digestibilidade que pode ser aumentada com a retirada de polímeros de hemicelulose com resíduos de L-arabinose já que esse ainda impede a hidrólise de xilanos (Dehority, 1967; Coen e Dehority, 1970). O uso da enzima α -L-AFases remove as cadeias laterais de arabinose e melhora a ação da enzima tornando os alimentos mais digestíveis para os animais (Mathlouthi *et al.*, 2002).

Há perspectivas do uso da enzima α -L-AFase para a produção de L-arabinose como aditivo alimentar por seu sabor doce e de baixa absorção celular (Sanai *et al.*, 1997). Este estudo demonstrou que a L-arabinose anulou o aumento da glicose no plasma de ratos e inibiu a resposta da sacarase e a atividade da sucrase após a ingestão de sacarose (Seri *et al.*, 1996). Como a L-arabinose tem esse efeito quando a sacarose é ingerida juntamente com ela, a enzima que faz conversão a conversão nesse composto pode ser utilizada na

indústria alimentícia para a produção de um açúcar funcional que pode controlar a hiperglicemia após as refeições e ser benéfica para pacientes diabéticos (Sanai *et al.*, 1997). No estudo realizado por Krog-Mikkelsen et al. 2011, foi comprovado que em humanos, quando se suplementa a alimentação com L-arabinose reduz o pico de glicose, reduz e retarda o pico de insulina sem originar efeitos sobre o triacilglicerol, sintomas gastrointestinais, sem alterar o índice de apetite e o consumo de energia. Também neste estudo foi concluído que a L-arabinose inibe a atividade da sacarase nas células in vitro Caco-2, que são células de carcinoma do colón porém, quando cultivadas em condições específicas se assemelham aos enterócitos do intestino delgado, reduzindo assim a resposta pós prandial da glicose.

4.2 Celulase

As celulases são enzimas que executam a hidrólise de compostos celulósicos (FIG. 7). Como a celulose não entra na célula, a celulose é secretada ou exposta na superfície do micro-organismos produtor (Béguin e Aubert, 1994). Elas agem como biocatalisadoras liberando açúcares de interesse econômico como a glicose para a conversão em etanol. Os valores de pH, bem como a temperatura ótima de atuação da enzima celulase varia de acordo com os micro-orgismos produtores. Apesar da celulase produzida por *L. gongylophorus* ainda não ter sido caracterizada, as características da mesma produzida por outros micro-organismos já foi definida (TAB 5).

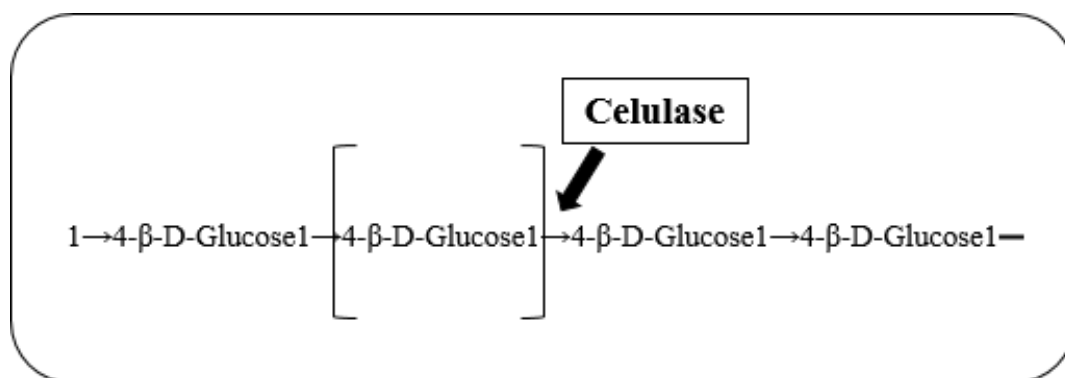


Figura 7: Estrutura da celulose e ação da enzima celulase

As lignoceluloses correspondem a cerca de 60 a 80% da matéria vegetal, dessas, a celulose é o principal componente além de ser a mais encontrada na parede celular das plantas. A celulose também está presente em grande parte de resíduos agroindustriais contudo, a matéria lignocelulótica é passível de ser renovada (Lynd *et al.*, 2002; Acharya *et al.*, 2008).

Tabela 5: Organismos produtores de celulase

Organismo	pH	Temperatura °C	Substrato	Referência
<i>Trichoderma reesei</i>	5,5-6,0	30	Lignocelulose - Salgueiro pré-tratado a vapor	(Bollok e Reczey, 2000)
<i>T. reesei</i>	5,0	30	Lignocelulose - Carvalho pré-tratado a vapor	(Shin <i>et al.</i> , 2000)
<i>T. reesei</i>	4,8	30	Lignocelulose - Avicel Bagaço Bagaço tratado com álcali	(Aiello <i>et al.</i> , 1996)
<i>T. reesei</i>	4,8	28	Lignocelulose - Solka Floc	(Velkovska <i>et al.</i> , 1997)
<i>Fusarium oxysporum</i>	6,0	30	Lignocelulose - Sabugo de milho	(Panagiotou <i>et al.</i> , 2003)
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	4,0	49	Lignocelulose - Palha de trigo	(Kalogeris <i>et al.</i> , 2003)
Cultura mista <i>T. reesei</i> Rut C30 e <i>Aspergillus Phoenicis</i> QM 329	5,5	27	Lignocelulose – Esterco	(Wen <i>et al.</i> , 2005)
<i>Penicillium pinophilum</i>	5,0	30	Lignocelulose - Solka Floc	(Jørgensen <i>et al.</i> , 2005)

<i>P. persicinum</i>	5,0	25	Lignocelulose - Solka Floc	(Jørgensen <i>et al.</i> , 2005)
<i>P. brasilianum</i>	5,0	30	Lignocelulose - Solka Floc	(Jørgensen <i>et al.</i> , 2005)
<i>T. reesei</i>	4,5	30	Lignocelulose - Sabugo de milho e farelo de trigo	(Xia e Cen, 1999)
<i>P. decumbens</i>	-	30	Lignocelulose - Palha e farelo de trigo	(Mo <i>et al.</i> , 2004)
<i>A. terreus</i>	4,0	35	Lignocelulose - Bagaço de cana	(El-Nawwi e El-Kader, 1996)
<i>Cellulomonas biazotea</i>	7,3	30	Lignocelulose – CMC Palha de trigo	(Rajoka e Malik, 1997)
<i>Bacillus sp</i>	10,5	37	Lignocelulose – CMC	(Zhang <i>et al.</i> , 2004)
Cultura mista de <i>B. pumilus</i> selvagem e mutante CRI 6	6,0	37	Lignocelulose – CMC Celobiose	(Kotchoni <i>et al.</i> , 2003)
<i>T. reesei</i>	5,8	28	Lignocelulose - Solka Floc	(Juhász <i>et al.</i> , 2005)
<i>T. reesei</i>	4,8	28	Lignocelulose - Fibra de milho pré-tratada	(Li <i>et al.</i> , 2005)
<i>T. reesei</i>	4,8	28	Lignocelulose - Solka Floc	(Hayward <i>et al.</i> , 2000)
Cultura mista <i>T. reesei</i> QM 9414 e <i>A. terreus</i> SUK-1	5,5	30	Lignocelulose - Bagaço de cana	(Massadeh <i>et al.</i> , 2001)
Cultura mista <i>T. reesei</i> LM-UC4 e <i>A. phoenicis</i> QM 329	-	30	Lignocelulose - Bagaço de cana	(Gutierrez-Correa e Tengerdy, 1997)
<i>T. reesei</i>	5,0	30	Lignocelulose - Solka Floc	(Juhász <i>et al.</i> , 2004)

<i>T. reesei</i>	4,8	30	Lignocelulose - Sabugo de milho	(Liming e Xueliang, 2004)
<i>A. niger</i>	6,1	35	Lignocelulose - Torta de palmeira	(Prasertsan <i>et al.</i> , 1997)
<i>Caldibacillus cellulovorans</i>	6,5-7,0	80	Celulose amorfa	(Huang e Monk, 2004)
<i>Aspergillus niger</i>	4,0	28	Carboximetil celulose	(Acharya <i>et al.</i> , 2008)

Fonte: Material suplementar adaptado (Castro e Pereira Jr, 2010)

Para os fungos três celulasas hidrolíticas são conhecidas: (1,4)- β -D-glucanase que compreendem as endoglucanase, endocelulase e Carboximetilcelulose que promovem a clivagem de ligações β ao acaso; exo-(1,4)- β -D-glucanase que compreendem as celobiohidrolase, exocelulase, celulase microcristalina, avicelase que hidrolisam celobiose da extremidade não redutora ou redutora; e β -glucosidase como a celobiase hidrolisa glucose de celobiose e oligossacarídeos de cadeia curta (Bisaria *et al.*, 1989).

A produção das celulosas por fungos em grandes quantidades foi obtida utilizando meios de cultivo que contém celulose ou matéria vegetal complexo e não apresenta uma produção significativa quando utilizados glicose ou frutose. Pode-se melhorar a produção acrescentando a esses meios sorbose (duas unidades de glicose unidas por uma ligação β -1,2) (Bisaria *et al.*, 1989; Ilmén *et al.*, 1996). No entanto, a enzima apresentou atividade reduzida na presença de zinco (Zn^{2+}), mercúrio (Hg^{2+}) e ácido p-cloromercuribenzenosulfônico (Huang e Monk, 2004).

A produção de celulase por micro-organismos é realizada através da fermentação no estado sólido (FES) ou por fermentação submersa (FS) que se diferem pela presença de água livre sendo que a FES praticamente não possui água. A água é utilizada para mimetizar as condições encontradas na natureza e evita que ocorra a desnaturação das enzimas produzidas nas células dos fungos filamentosos preservando suas estruturas e funções metabólicas (Castro e Pereira Jr, 2010).

As celulasas juntamente com as xilanases em baixas concentrações são usadas na produção de papel auxiliando na liberação de fibras recicladas não alterando o rendimento. Essa alteração na fibra é desejada para melhorar a flexibilidade e capacidade de ligação das fibras porém não se deve utilizar uma grande quantidade de enzimas visando a prolongar a reação pois não é benéfico podendo alterar a resistência das fibras (Bajpai, 1999).

Associada a xilanase, o uso das celulasas atuam na reciclagem do papel e do cartão que contém toner e outras tintas. A retirada da tinta ocorre com a flotação do toner com o uso de surfactantes, porém, o uso de enzimas pode facilitar a flutuação liberando as partículas de tinta e facilitando os processos seguintes, tornando essa fase mais economicamente viável (Pérez *et al.*, 2002).

A alimentação de diversos animais é realizada com alimentos a base de cereais onde alguns dos componentes da parede celular são os xilanos e a celulose. Os animais monogástricos não conseguem fazer a digestão dos compostos celulósicos e hemicelulósicos o que afeta o valor nutricional e econômico dos alimentos (Bedford, 1995). A adição das enzimas xilanase e celulase na alimentação dos animais reduz a viscosidade intestinal e como consequência melhora a saúde animal e a taxa de crescimento dos mesmos (Marquardt *et al.*, 1994). Essa suplementação é realizada com misturas de enzimas produzidas pela obtenção de extratos proteicos de microorganismos (Reis *et al.*, 2001).

4.3 Endo-1,4- β -xilanase

As xilanases são enzimas que catalisam reações de endohidrólise de ligações 1,4- β -D-xilosídicas em xilano (Collins *et al.*, 2005). O xilano (FIG. 8) é um biopolímero hemicelulósico, presente principalmente em plantas, que contém em sua cadeia pentose como arabinose e xilose (Ebringerova e Heinze, 2000; Dodd e Cann, 2009). O Xilano é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza compreendendo um terço do carbono orgânico renovável da Terra (Prade, 1996; Chidi *et al.*, 2008). A xilose, produto de degradação em monômeros do xilano, é uma fonte de carbono que pode ser usado como substrato para a produção de biocombustíveis (Dodd e Cann, 2009). Estruturalmente, as xilanases exibem uma dobra de 8 cilindros (α / β) (Derewenda, 1994).

As xilanases produzidas por *L. gongylophorus* não foi caracterizadas, porém a produção da enzima já foi relatada em diversos micro-organismos (TAB 6) bem como o melhor pH e temperaturas, apresentando uma faixa de temperatura ótima entre 45 e 80 °C, e uma ampla faixa de pH (4,5 a 10) dependendo do fungo produtor. (Angayarkanni *et al.*, 2006).

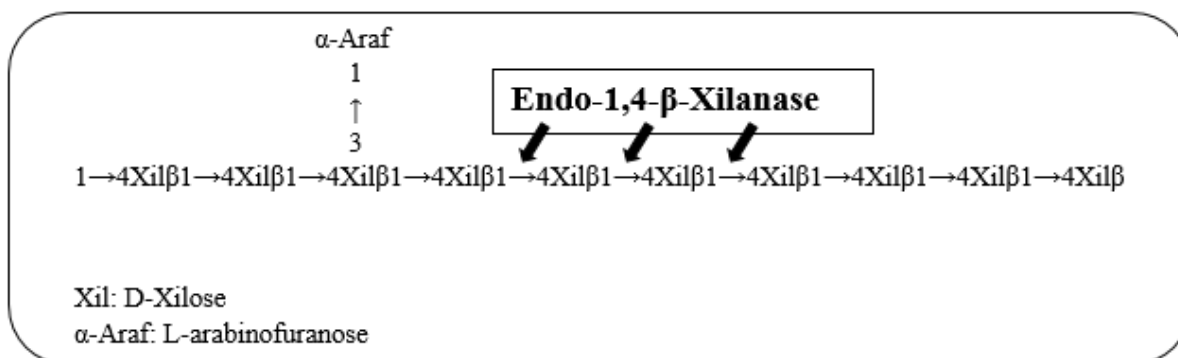


Figura 8: Estrutura de um xilano hipotético e local de ação da enzima endo-1,4- β -xilanase

Fonte: adaptado de Biely, 1985

Tabela 6: Organismos produtores de endo-1,4-xilanase

Fungo	Temperatura ótima (°C)	pH ótimo	Substrato	Fonte
<i>Aspergillus niger</i>	50	4,5	Bagaço de cana de açúcar	(Milanezi, 2011)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	55	5,5	Farelo de aveia	(Silva <i>et al.</i> , 1999)
<i>Aspergillus versicolor</i>	50	10	Xilano	(Salama <i>et al.</i> , 2008)
<i>Myrothecium verrucaria</i>	45	5,5	Xilano da aveia, xilano da palha de trigo, CM-cellulose	(Filho <i>et al.</i> , 1993)

<i>Aspergillus terricola</i>	60	6,5	Farelo de trigo	(Michelin <i>et al.</i> , 2010)
<i>Aspergillus ochraceus</i>	65	5,0	Farelo de trigo	(Michelin <i>et al.</i> , 2010)
<i>Aspergillus indicus</i>	50	5,0	Xilano da aveia	(Angayarkanni <i>et al.</i> , 2006)
<i>Aspergillus flavus</i>	50	6,0	Xilano da aveia	(Angayarkanni <i>et al.</i> , 2006)
<i>Aspergillus niveus</i>	50	5,0	Xilano da aveia	(Angayarkanni <i>et al.</i> , 2006)
<i>Aspergillus Phoenix</i>	75	4,0-4,5	Xilano	(Rizzatti <i>et al.</i> , 2001)
<i>Aspergillus caespitosus</i>	50-55	5,5-7,0	Xilano	(Sandrim <i>et al.</i> , 2005)
<i>Laetiporus sulphureus</i>	80	3,0	Xilano da madeira de betula	(Lee <i>et al.</i> , 2009)
<i>Bacillus spp</i>	75	6,0	Arabinoxilano da farinha de trigo	(Bataillon <i>et al.</i> , 2000)
<i>Chaetomium cellulolyticum</i>	50	5,0-7,0	madeira de bétula e xilano de aveia	(Baraznenok <i>et al.</i> , 1999)
<i>Myceliophthora sp.</i>	75	6,0	arabinoxilanos de centeio e de trigo, xilano de madeira de bétula	(Chadha <i>et al.</i> , 2004)

<i>Penicillium capsulatum</i>	48	3,8	xilano de madeira de bétula	(Ryan <i>et al.</i> , 2003)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	70	6,0-6,5	xilano de madeira de bétula	(Singh <i>et al.</i> , 2000)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	54	4,8	xilano de madeira de bétula	(Li <i>et al.</i> , 1993)
<i>Acrophialophora nainiana</i>	50	6,0	Xilano	(Ximenes <i>et al.</i> , 1999)
	55	7	xilano de madeira de bétula	(Salles <i>et al.</i> , 2000)

Fonte: tabela adaptada de Polizeli, 2005

As enzimas xilanolíticas de micro-organismos diferentes foram estudadas e observou-se que ao utilizar mais de uma enzima conjuntamente, o xilano se torna mais susceptível ao ataque das enzimas (De Vries *et al.*, 2000). Além disso, o crescimento em diferentes substratos também permite uma maior liberação de açúcares durante a hidrólise (De Souza Moreira *et al.*). Em sua maioria, as xilanases são produzidas por microorganismos mesófilos e termofílicos (Uday *et al.*, 2016). As xilanases microbianas são mais utilizadas pela indústria para realizar a hidrólise da xilana por ser altamente específica, gerar poucos resíduos e pela baixa perda de substrato durante o processo (Michelin *et al.*, 2008).

Para obter a xilanase geralmente utiliza-se como substrato a xilana, porém, as enzimas produzidas por fungos filamentosos não entram na célula para realizar a regulação do gene levando a expressão da xilanase por indução. A enzima é secretada no meio, não exigindo a lise da célula e, os oligossacarídeos resultantes da hidrólise são transportados para dentro da célula. A produção da xilanase por fungos é maior do que por bactérias e leveduras, tornando-se vantajosa a sua utilização (Uday *et al.*, 2016).

As xilanases e as celulases são geralmente são ativadas juntas no genoma de vários microorganismos realizando hidrólise de celulose e hemicelulose que se diferem bioquimicamente apesar de ambas realizarem catálise (Prade, 1996).

As xilanases tem diversas aplicações biotecnológicas e agem em conjunto com a celulase para a produção de papel e reciclagem de papel, papelão e cartão (Bajpai, 1999; Pérez *et al.*, 2002 (Sandrim *et al.*, 2005)). Na indústria utiliza-se uma grande quantidade de cloro e produtos químicos que possuem cloro para realizar o branqueamento gerando uma alta liberação de produtos químicos no ambiente o que gera um gasto para as indústrias e danos ao meio ambiente, no entanto o uso das enzimas xilanase e celulase pode reduzir ambos (Angayarkanni *et al.*, 2006). O pré-tratamento para o branqueamento da polpa da madeira com a enzima xilanase auxilia na remoção de hemicelulase e lignina, gerando uma polpa de melhor qualidade (Wong *et al.*, 1988; Sandrim *et al.*, 2005; Angayarkanni *et al.*, 2006; Medeiros *et al.*, 2007).

A degradação dos xilanos dos cereais podem ser aplicados nas indústrias pois alteram o efeito da fibra alimentar como foi demonstrado por Kodama (Kodama *et al.*, 1996) apresentando efeitos de hipocolesterolemia, auxiliando no melhoramento alimentar de animais e humanos.

Além da alteração das fibras alimentares, o uso das xilanases, juntamente com outras enzimas como glucanases, pectinases, celulases, proteases, amilases, galactosidases e lipases, melhora a digestibilidade de nutrientes ao serem adicionadas em rações ou suplementos alimentares para aves e suínos que contem milho e sorgo. Esse uso também reduz resíduos de fósforo, nitrogênio, cobre e zinco na excreta e conseqüentemente reduz a contaminação ambiental (Mathlouthi *et al.*, 2002).

A endo-1,4- β -xilanase também pode ser utilizada na produção de pães pois adicionada a farinha de trigo pode ser usada na fabricação em grande escala de pães parcialmente assado e congelado. A enzima melhora a qualidade do pão deixando mais macio e com um maior volume do que quando usada a farinha sem a adição do mesmo e ainda reduz os efeitos negativos do congelamento como o encolhimento do produto (Jiang *et al.*, 2008). Ainda na fabricação de pães a xilanase retarda a formação do miolo durante

o cozimento levando ao aumento no volume do pão, aumento da absorção de água e resistência a fermentação (Harbak e Thygesen, 2002; Camacho e Aguilar, 2003).

A indústria de sucos de frutas é um grande consumidor do mercado de enzimas pois a produção exige a extração, clarificação e estabilização de frutas e vegetais. A xilanase purificada adicionada a produção do suco gera um aumento no rendimento e volume devido a liquefação das frutas e vegetais, melhora a clarificação do produto, reduz a turbidez e a viscosidade melhorando assim sua estabilidade (Wong *et al.*, 1988; Nagar *et al.*, 2012).

O uso das xilanases na indústria farmacêutica se dá na fabricação de produtos dietários e medicamentos para problemas digestivos apesar de pouco utilizados. A conversão hidrolítica do xilano em resíduos de β -D-xilopiranosilo pode ser utilizada para a produção de adoçantes. Esse composto também pode ser utilizado para a produção de etanol (Polizeli *et al.*, 2005).

As biorefinarias utilizam as xilanase para conversão da biomassa lignocelulósica em açúcar fermentável.. A endo-1,4- β -xilanases é responsável pela despolimerização dos xilanos resultando em xilotriose e xilobiose que serão clivadas pelas β -xilosidases liberando xilose que pode ser fermentada e convertida em biocombustíveis (Merino e Cherry, 2007; Dodd e Cann, 2009).

Associada a celulase e a pectinases, as xilanases podem ser utilizadas na extração de óleos vegetais como de colza, coco, girassol, palmito, amêndoa e azeitona liquefazendo os componentes da parede celular que contém óleo. O uso das enzimas demonstrou uma boa extração de óleos, maior estabilidade no armazenamento, aumento na quantidade de polifenóis e de vitamina E, que evita que o óleo fique rançoso (Kashyap *et al.*, 2001).

A produção de tecidos naturais utilizando as fibras rami que contém muita goma pode ser melhorada com o uso da xilanase, pois é necessário que ocorra uma degomagem e exige a separação de fibras. O processo utilizado na indústria para a produção dos tecidos naturais causa poluição ambiental e tem um alto consumo de energia. Por meio do processo enzimático que tem a xilanase em maior quantidade, utiliza-se menos

produtos químicos, a energia gasta é reduzida o que traz benefícios para essa produção industrial (Kashyap *et al.*, 2001).

4.4 α -amilase

As amilases (EC 3.2.1.1) são enzimas que realizam hidrólise de ligações β -glicosídicas de moléculas de amido (FIG 9), composto por amilose e amilopectina, originando oligossacarídeos como dextrinas, glicose e maltoses (Nigam e Singh, 1995; Van Der Maarel *et al.*, 2002). As α -amilases são consideradas as enzimas de uso industrial mais importantes e mais comumente utilizadas (Gupta *et al.*, 2003).

A estrutura da proteína é entrelaçada por três domínios diferentes. O domínio central, chamado de domínio A forma um cilindro típico $(\alpha / \beta)_8$ que é comum a todas as α -amilases conhecidas. O domínio de laço proeminente chamado de domínio B é estabilizado por três íons de cálcio. O domínio terminal é o domínio C com cinco cadeias de folhas β antiparalelas (Vallée *et al.*, 1998).

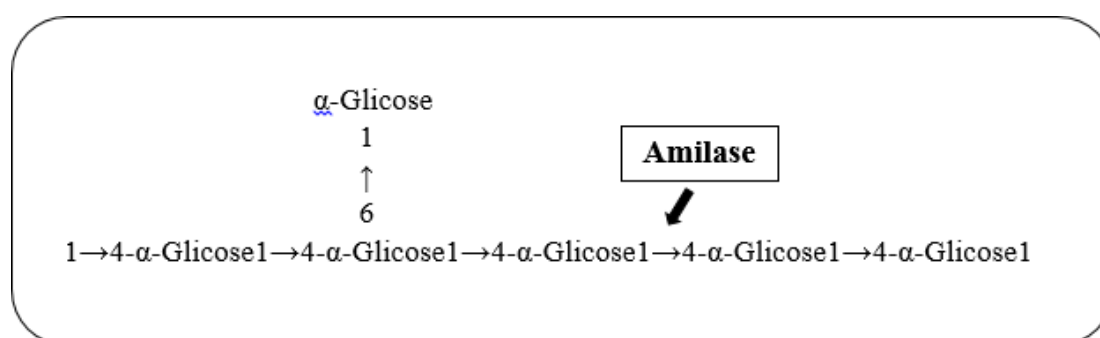


Figura 9: Estrutura do amido composta por unidades de glicose unidas por ligações α -1-4 e α -1-6 e local de ação da enzima α -amilase

As amilases produzidas por fungos (TAB 7) têm se destacado devido a sua disponibilidade e alta produtividade além da possibilidade de manipulação genética (Nigam e Singh, 1995; Varalakshmi *et al.*, 2009; Souza e Magalhães, 2010), o que sugere que a amilase do *L. gongylophorus* seja viável. Além disso, os fungos que produzem a α -amilase são, em geral, fungos mesófilos.

Um estudo de Ramachandran *et al.* (2004) demonstrou que o uso dos íons Ca^{+2} , K^+ , Na^+ , Mg^{+2} inibiram a produção da enzima, enquanto o íon Mn^{+2} estimulou a produção.

Tabela 7: Organismos produtores de alpha-amilase

Organismo	Temperatura °C	pH	Substrato	Referência
<i>Pyrococcus furiosus</i>	100	6,5-7,5	Amido solúvel	(Laderman <i>et al.</i> , 1993)
<i>Aspergillus niger</i>	50	5,0	torta de óleo de coco (COC), torta de de óleo de amendoim (GOC) torta de óleo de sesamo (SOC), torta de palma (PKC) e torta de óleo de oliva (OOC)	(Ramachandran <i>et al.</i> , 2004)
<u><i>Aspergillus niger</i></u>	22±2	7,5	Amido	(Varalakshmi <i>et al.</i> , 2009)
<i>Bacillus sp. KR-8104</i>	75-80	4,0-6,0	Amido	(Sajedi <i>et al.</i> , 2005)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	70	7,0	Farelo de soja lactose	(Nigam e Singh, 1995)
<i>Bacillus licheniformis</i>	90	7,0	Farelo de soja lactose	(Nigam e Singh, 1995)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	50	6,0	farelo de trigo contendo amido solúvel e suplementos de peptona	(Kunamneni <i>et al.</i> , 2005)

Essas enzimas têm sua principal aplicação no campo da biotecnologia onde são empregados na produção de glicose e frutose pela da hidrólise do amido que confere o caráter de edulcorante e são altamente utilizados na indústria de bebidas, fabricação de cerveja, produtos que auxiliam a digestão, sucos de frutas e xaropes de amido. A α -amilase que é altamente termostática faz a liquefação do amido (Van Der Maarel *et al.*, 2002 (Souza e Magalhães, 2010)). O uso na produção de sucos e cervejas se dá para a remoção da turbidez do produto (Kashyap *et al.*, 2001; Souza e Magalhães, 2010).

Para a produção do biocombustível etanol, o amido é o principal substrato utilizado pois tem baixo custo e é facilmente encontrado em praticamente todo o mundo. Para obter o etanol ocorre a conversão do amido em açúcar através da α -amilase e posteriormente fermentado (Souza e Magalhães, 2010).

As α -amilases são utilizadas para a panificação aumentando o volume, melhorando a coloração e aumentando a qualidade dos produtos. A enzima adicionada na farinha melhora a taxa de fermentação e melhora a viscosidade da massa, além da adição de açúcar na massa. Isso gera um produto com melhor sabor. Ela também retarda o envelhecimento dos produtos e mantém a maciez por mais tempo (Van Dam e Hille, 1992; Si, 1999; (Souza e Magalhães, 2010).

Em rações animais, a amilase juntamente com proteases são utilizadas no pré-tratamento e melhora a digestibilidade dessas, pois parte dos componentes da ração é derivada de plantas que possuem fatores antinutricionais que atrapalham a digestão (Gavrilescu e Chisti, 2005).

O uso do amido para a tecelagem é benéfico devido ao seu tamanho, seu baixo custo, alta disponibilidade e facilidade de extração. A enzima amilase realiza a desidratação eficiente do tecido sem afetar as fibras e, portanto sem quebrá-las, melhorando a elasticidade e resistência (Gupta *et al.*, 2003; Souza e Magalhães, 2010).

A enzima pode hidrolisar o amido em moléculas de alto peso molecular (amilose e amilopectina) que é usado na produção de papel para conferir resistência contra danos mecânicos no seu processamento, aumenta sua rigidez e melhorar o seu acabamento. Para isso, o papel é pressionado por dois rolos que contem amido (Gupta *et al.*, 2003).

As amilases são altamente utilizadas na produção de detergentes por serem mais leves estruturalmente e eficientes, reduzirem a temperatura de lavagens e utilizando a engenharia proteica foi possível melhorar a estabilidade da enzima conferindo maior resistência a sua oxidação (Gupta *et al.*, 2003). A sua utilização se dá tanto para lavagem de roupas quanto de louças para remoção de resíduos ricos em amido e as condições de uso de detergentes (baixas temperaturas e pH alcalino) são favoráveis para sua ação, mantendo estabilidade da enzima (Souza e Magalhães, 2010).

4. PRODUÇÃO DE ENZIMAS

Embora tradicionalmente as enzimas mais estudadas sejam de origem animal ou vegetal, as enzimas microbianas apresentam maior interesse do ponto de vista industrial por serem mais facilmente produzidas em larga escala via fermentação (Haki e Rakshit, 2003). Assim, os microrganismos surgem como uma alternativa simples e barata para a produção dessas enzimas. Em geral, os microrganismos são fáceis de manipular, requerem condições mínimas de nutrição e de manutenção e apresentam alta eficiência na produção de enzimas, que ainda pode ser aumentada por meio do uso de técnicas de manipulação genética (Sajedi *et al.*, 2005).

Os processos industriais de produção de enzimas são desenvolvidos majoritariamente em cultivos submersos aerados (Fermentação submersa - SmF), que permitem maior controle dos parâmetros operacionais. O cultivo em estado sólido (Fermentação em Estado Sólido – SSF) é também utilizado, principalmente nos países orientais, por apresentar vantagens para a produção de algumas enzimas, principalmente as produzidas por fungos filamentosos (Bon *et al.*, 2008; Couto e Sanromán, 2005).

O uso da técnica SSF vem crescendo atualmente principalmente por reproduzir os processos microbiológicos naturais além de poder ser controlada para produzir um produto específico. Entre as vantagens do uso da SSF quando comparada a SmF estão o maior rendimento em um tempo mais curto, melhor circulação de oxigênio, o ambiente criado assemelha-se ao naturalmente habitado pelos fungos filamentosos, processos

posteriores realizados com menor esforço, cepas de microrganismos do tipo selvagem desenvolvem melhor na SSF do que as geneticamente modificadas, reduzindo os requisitos de energia e custo (Rodriguez-Couto e Sanromán, 2005).

A matéria-prima é um dos componentes mais importantes no custo de produção de enzimas (Bon et al., 2008). A fonte de carbono utilizada para o crescimento do microrganismo responde por cerca de 30-40% do custo de produção destas enzimas (Joo e Chang, 2005). A adição de reagentes ricos em moléculas de alto valor biológico e de baixo custo ao meio de cultivo torna-se rentável. Sendo assim, esta é uma das razões para o crescente interesse no aproveitamento de resíduos agroindustriais gerados pelas atividades agropecuárias e de processamento de produtos agropecuários (Villas-Bôas e Esposito, 2000).

4.1. Produção das enzimas pelo fungo *Leucoagaricus gongylophorus* em laboratório

Após a coleta do fungo em um ninho de formigas dos gêneros *Atta* ou *Acromyrmex* e o cultivo dele em laboratório conforme o descrito no tópico “Cultivo do fungo em laboratório”, com o substrato de acordo com o desejado para a obtenção das enzimas, os frascos de culturas com as enzimas secretadas pelo fungo devem ser filtrados por uma membrana com poros de 0,45µm e ser dialisada. O peso seco é obtido através da coleta do micélio do fungo para determinar a massa celular (Silva et al., 2006).

Para determinar a atividade enzimática, 2 gramas do substrato utilizado para a enzima de interesse (amido, xilana, celulose, arabinose) são dissolvidos em 100 ml de tampão citrato-fosfato 75 mM (pH 5,0). Posteriormente são misturados a amostra e os substratos na proporção de 1:1 e mantidos a 25°C por 2 horas (Silva et al., 2006).

A cada 30 minutos de incubação, 200 µL são retirados e misturados a 400 µL de ácido dinitrosalicílico e 400 µL de água. Após 5 minutos em banho maria, a absorbância é determinada utilizando o espectrofotômetro (Silva et al., 2006).

“Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade (em µmol) do produto de hidrólise de cada polissacarídeo por minuto de tempo de reação por biomassa de *L. gongylophorus* (mg de peso seco)” (Silva et al., 2006).

O método de Bradford (1976) foi utilizado para determinação da concentração de proteína. Usa-se uma solução de proteína que contenha de 10 a 100 µg de proteína num volume de até 0,1 mL em tubos de ensaio e o volume para 0,1 mL é ajustado com tampão próprio. Adiciona-se 5 mL de reagente protéico no tubo de ensaio misturando o conteúdo por vortex ou inversão. Após 2 minutos e antes de uma hora, mede-se a absorbância a 595nm em cuvetes de 3mL contra um reagente branco (0,1 mL do tampão + 5 mL de reagente protéico). A absorbância utilizada para determinar a concentração das proteínas (Bradford, 1976).

As proteínas podem ser analisadas qualitativamente em gel de poliacrilamida a 15% com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) que as separam pelo tamanho e permite a determinação da massa molecular. Amostras de 10 mg de proteínas totais no gel e a coloração do gel é realizada pela coloração com prata. O peso molecular da proteína pode ser estimado com base em uma proteína padrão, onde o peso já é conhecido. Por meio da análise do gel, observa-se a diversidade de proteínas obtidas naquele substrato e perceber se aquele substrato estimula eficientemente a produção da proteína ou se deve ser pesquisado algum outro substrato que estimule a maior secreção da enzima (Laemmli, 1970; Wilson e Walker, 2010).

5. PERSPECTIVAS

A revisão da literatura permitiu conhecer as aplicabilidades das enzimas glicosil hidrolases Rhamnogalacturonano hidrolase, Arabinofurosidase, Celulase, Endo-1,4-β-xylanase e a α-amilase. Porém revela uma lacuna sobre as informações sobre as características e potenciais catalíticos dessas enzimas quando produzidas pelo fungo *Leucoagaricus gongylophrus*. Realizar pesquisas a respeito dessas enzimas, bem como outras que não foram abordadas de forma aprofundada, torna-se pertinente para o conhecimento e caracterização, contribuindo para a compreensão da evolução fungo-hospedeiro e para a compreensão da aplicabilidade das enzimas nos processos industriais.

Além disso, após isolar essas enzimas, realizar testes para avaliação da atividade catalítica é desejável para pressupor se a utilização das enzimas do *L. gongylophorus* é pertinente. Também é possível, com o avanço da tecnologia, manipular os genes para que propiciem a produção da enzima, melhorando sua qualidade e a quantidade da enzima produzida, o que é desejável para que se torne economicamente viável.

Para obter as enzimas do *L. gongylophorus* é relevante o aprimoramento do cultivo do fungo em laboratório independente da colônia de formigas cortadeiras, desenvolvendo o método com melhor custo/benefício.

Além disso, conhecer o que é benéfico ou não para o crescimento do fungo permite ter um domínio maior acerca desta espécie e, como só é encontrado na natureza associado as formigas cortadeiras *Atta* e *Acromyrmex* que são consideradas pragas para cultivos vegetais, tem-se potencial para desenvolver produtos que sejam eficientes para o controle das formigas por meio da supressão do crescimento do fungo.

Visto o amplo mercado e as grandes possibilidades de aplicação das enzimas produzidas por fungos, o estudo das enzimas produzidas por *L. gongylophorus* contribuirá para ampliar o conhecimento a cerca deste fungo, da simbiose e coevolução entre o fungo e as formigas cortadeiras (*Atta* e *Acromyrmex*), além da possibilidade de identificar enzimas potencialmente comerciáveis produzidas por esta espécie.

6. REFERÊNCIAS

ABRIL, A. B.; BUCHER, E. H. Evidence that the fungus cultured by leaf-cutting ants does not metabolize cellulose. **Ecol Lett**, v. 5, 2002. Disponível em: < <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2002.00327.x> >.

_____. Nutritional sources of the fungus cultured by leaf-cutting ants. **Appl Soil Ecol**, v. 26, 2004. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2003.12.008> >.

ACHARYA, P.; ACHARYA, D.; MODI, H. Optimization for cellulase production by *Aspergillus niger* using saw dust as substrate. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 22, p. 4147-4152, 2008.

AIELLO, C.; FERRER, A.; LEDESMA, A. Effect of alkaline treatments at various temperatures on cellulase and biomass production using submerged sugarcane bagasse fermentation with *Trichoderma reesei* QM 9414. **Bioresource Technology**, v. 57, n. 1, p. 13-18, 1996. ISSN 0960-8524.

ALONSO, L. E. A preliminary survey of the ants of the Kwamalasamutu region, SW Suriname. **RAP**, p. 110, 2011.

ALONSO, L. E.; AGOSTI, D. Biodiversity studies, monitoring, and ants: An overview. 2000.

ANGAYARKANNI, J. et al. Biochemical substitution of fungal xylanases for prebleaching of hardwood kraft pulp. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 10, 2006. ISSN 1684-5315.

AYLWARD, F. O. et al. Enrichment and Broad Representation of Plant Biomass-Degrading Enzymes in the Specialized Hyphal Swellings of *Leucoagaricus gongylophorus*, the Fungal Symbiont of Leaf-Cutter Ants. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0134752, 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134752> >.

AYLWARD, F. O. et al. *Leucoagaricus gongylophorus* produces diverse enzymes for the degradation of recalcitrant plant polymers in leaf-cutter ant fungus gardens. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 12, p. 3770-3778, 2013. ISSN 0099-2240.

BAE, E.-A.; PARK, S.-Y.; KIM, D.-H. Constitutive β -Glucosidases Hydrolyzing Ginsenoside R₁ and R₂ from Human Intestinal Bacteria. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, n. 12, p. 1481-1485, 2000.

BAILEY, I. W. Some relations between ants and fungi. **Ecology**, v. 1, n. 3, p. 174-189, 1920. ISSN 1939-9170.

BAJPAI, P. TOPICAL PAPER. **Biotechnol. Prog.**, v. 15, p. 147-157, 1999.

BARAZNENOK, V. A. et al. Characterization of neutral xylanases from *Chaetomium cellulolyticum* and their biobleaching effect on eucalyptus pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 8, p. 651-659, 1999/11/01/ 1999. ISSN 0141-0229. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022999000915> >.

BARRETO, E. D. S. Produção, purificação e caracterização de uma poligalacturonase do *Chrysosporthe cubensis*. 2016.

BATAILLON, M. et al. Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase from *Bacillus* sp. strain SPS-0. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 2, p. 187-192, 2000/02/01/ 2000. ISSN 0141-0229. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014102299900143X> >.

BEAVER, R. et al. Insect-fungus relationships in the bark and ambrosia beetles. **Insect-fungus interactions**, p. 121-143, 1989.

BEDFORD, M. Mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes. **Animal feed science and technology**, v. 53, n. 2, p. 145-155, 1995. ISSN 0377-8401.

BÉGUIN, P.; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS microbiology reviews**, v. 13, n. 1, p. 25-58, 1994. ISSN 1574-6976.

BEZALEL, L.; SHOHAM, Y.; ROSENBERG, E. Characterization and delignification activity of a thermostable α -L-arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 40, n. 1, p. 57-62, 1993. ISSN 0175-7598.

BHAT, M. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology advances**, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000. ISSN 0734-9750.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, v. 3, n. 11, p. 286-290, 1985. ISSN 0167-7799.

BIOTECHNOLOGY INNOVATION ORGANIZATION (BIO). **What is Biotechnology?** Disponível em: < <https://www.bio.org/what-biotechnology> > Acesso em: 05 Jun 2018.

BISARIA, V. S.; MISHRA, S.; EVELEIGH, D. E. Regulatory aspects of cellulase biosynthesis and secretion. **Critical reviews in biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 61-103, 1989. ISSN 0738-8551.

BLÜTHGEN, N.; FELDHAAR, H. Food and shelter: how resources influence ant ecology. **Ant ecology**, p. 115-136, 2010.

BOLLOK, M.; RECZEY, K. Cellulase enzyme production by various fungal strains on different carbon sources. **Acta Alimentaria**, v. 29, n. 2, p. 154-168, 2000. ISSN 0139-3006.

BOLTON. AntWeb: Ants of Bolton World Catalog. Disponível em: <https://www.antweb.org/project.do?name=worldants> Acesso em 5 Dez 2017.

BORBA, R. D. S. et al. Crescimento do fungo simbiote de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* em meios de cultura com diferentes extratos. **Ciência Rural**, v. 36, p. 725-730, 2006. ISSN 0103-8478. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782006000300002&nrm=iso >.

BOYD, N. D.; MARTIN, M. M. Faecal proteinases of the fungus-growing ant, *Atta texana*: properties, significance and possible origin. **J Insect Physiol**, v. 5, 1975.

_____. Faecal proteinases of the fungus-growing ant, *Atta texana*: their fungal origin and ecological significance. **J Insect Physiol**, v. 21, 1975b. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(75\)90247-4](https://doi.org/10.1016/0022-1910(75)90247-4) >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. ISSN 0003-2697.

BYRDE, R. J. W.; FIELDING, A. H. An Extracellular α -L-Arabinofuranosidase secreted by *Sclerotinia fructigena*. **Nature**, v. 205, p. 390, 01/23/online 1965. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/205390b0> >.

CAMACHO, N. A.; AGUILAR, G. Production, purification, and characterization of a low-molecular-mass xylanase from *Aspergillus* sp. and its application in baking. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 104, n. 3, p. 159-171, 2003. ISSN 0273-2289.

CANTAREL, B. L. et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. suppl_1, p. D233-D238, 2009. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn663> >.

Carbohydrate-Active enZymes (CAZy). Welcome to the Carbohydrate-Active enZymes Database. Disponível em: < <http://www.cazy.org/> > Acesso em: 5 Dez 2017.

CASTELLANI, M. A. et al. Isolation and growth of the symbiotic fungus of Atta capiguara (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, p. 959-972, 2007. ISSN 0361-6525.

CASTRO, A. M. D.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHADHA, B. S. et al. Two endoxylanases active and stable at alkaline pH from the newly isolated thermophilic fungus, Myceliophthora sp. IMI 387099. **Journal of Biotechnology**, v. 109, n. 3, p. 227-237, 2004/04/29/ 2004. ISSN 0168-1656. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165604000173> >.

CHIDI, S. B. et al. Production, purification and characterization of cellulase-free xylanase from *Aspergillus terreus* UL 4209. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 21, 2008. ISSN 1684-5315.

CHURMS, S. C. et al. An L-arabinan from apple-juice concentrates. **Carbohydrate Research**, v. 113, n. 2, p. 339-344, 1983. ISSN 0008-6215.

COEN, J. A.; DEHORITY, B. Degradation and utilization of hemicellulose from intact forages by pure cultures of rumen bacteria. **Applied microbiology**, v. 20, n. 3, p. 362-368, 1970. ISSN 0099-2240.

COLEN, G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. Minas Gerais: UFMG. **Tese de Doutorado**. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia da UFMG, 2006.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 3-23, 2005. ISSN 0168-6445. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsre.2004.06.005> >.

CORNISH-BOWDEN, A. Current IUBMB recommendations on enzyme nomenclature and kinetics. **Perspectives in Science**, v. 1, n. 1, p. 74-87, 2014/05/01/ 2014. ISSN 2213-0209. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221302091400007X> >.

COSTA-LEONARDO, A. M.; REBÊLO, J. M. M. Cupins-praga: morfologia, biologia e controle. In: (Ed.). **Cupins-Praga: morfologia, biologia e controle**, 2002.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, p. 211-219, 2005.

CURRIE, C. R.; STUART, A. E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 268, n. 1471, p. 1033-1039, 2001. ISSN 0962-8452.

CURRIE, C.; MUELLER, U.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 14, p. 7998-8002, 1999.

DA SILVA BORBA, R. et al. Crescimento do fungo simbiote de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* em meios de cultura com diferentes extratos. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, 2006. ISSN 0103-8478.

DE FINE LICHT, H. H. et al. EVOLUTIONARY TRANSITIONS IN ENZYME ACTIVITY OF ANT FUNGUS GARDENS. **Evolution**, v. 64, n. 7, p.2055-2069, 2010. ISSN 1558-5646. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.00948.x> >.

DE FINE LICHT, H. H. et al. Laccase detoxification mediates the nutritional alliance between leaf-cutting ants and fungus-garden symbionts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 2, p. 583-587, 2013. ISSN 1091-6490.

DE SIQUEIRA, C. G. et al. Metabolism of Plant Polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the Symbiotic Fungus of the Leaf-Cutting Ant *Atta sexdens* L. **Applied and environmental microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4820-4822, 1998. ISSN 0099-2240.

DE SOUZA MOREIRA, L. R. et al. The use of lignocellulosic substrates as carbon sources for production of xylan-degrading enzymes from *Acrophialophora nainiana*.

DE VRIES, J. et al. Enzymic degradation of apple pectins. **Carbohydrate Polymers**, v. 2, n. 1, p. 25-33, 1982. ISSN 0144-8617.

DE VRIES, R. P. et al. Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides. **Carbohydrate research**, v. 327, n. 4, p. 401-410, 2000. ISSN 0008-6215.

DEGUCHI, T.; KAKEZAWA, M.; NISHIDA, T. Nylon biodegradation by lignin-degrading fungi. **Applied and Environmental microbiology**, v. 63, n. 1, p. 329-331, 1997. ISSN 0099-2240.

DEHORITY, B. Rate of isolated hemicellulose degradation and utilization by pure cultures of rumen bacteria. **Applied microbiology**, v. 15, n. 5, p. 987-993, 1967. ISSN 0099-2240.

DEL-CLARO, K.; SANTOS, J. C.; JÚNIOR, A. Etograma da formiga arborícola *Cephalotes pusillus* (Klug, 1824)(formicidae: myrmicinae). **Revista de Etologia**, v. 4, n. 1, p. 31-40, 2002.

D'ETTORRE, P. et al. The role of the symbiotic fungus in the digestive metabolism of two species of fungus-growing ants. **J Comp Physiol B**, v. 172, 2002. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s00360-001-0241-0> >.

DING, H. H. et al. Arabinan-rich rhamnogalacturonan-I from flaxseed kernel cell wall. *Food Hydrocolloids*, v. 47, p. 158-167, 2015/05/01 / 2015. ISSN 0268-005X. Available at: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X15000272>>.

DINIZ, E. A.; BUENO, O. C. Evolution of substrate preparation behaviors for cultivation of symbiotic fungus in Attine ants (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of insect behavior**, v. 23, n. 3, p. 205-214, 2010. ISSN 0892-7553.

DINIZ, J. L.; BRANDÃO, C. R. F.; YAMAMOTO, C. I. Biology of *Blepharidatta* ants, the sister group of the Attini: a possible origin of fungus-ant symbiosis. **Naturwissenschaften**, v. 85, n. 6, p. 270-274, 1998. ISSN 0028-1042.

DIXON, M.; WEBB, E. *Enzymes*, Longmans, Green and Co. **Ltd., London, First pub**, p. 344, 1958.

DODD, D.; CANN, I. K. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Global change biology. Bioenergy**, v. 1, n. 1, p. 2-17, 2009. ISSN 1757-1693.

EBRINGEROVA, A.; HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives—biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. **Macromolecular rapid communications**, v. 21, n. 9, p. 542-556, 2000. ISSN 1521-3927.

EL-NAWWI, S.; EL-KADER, A. A. Production of single-cell protein and cellulase from sugarcane bagasse: effect of culture factors. **Biomass and Bioenergy**, v. 11, n. 4, p. 361-364, 1996. ISSN 0961-9534.

FARRELL, B. D. et al. The evolution of agriculture in beetles (Curculionidae: Scolytinae and Platypodinae). **Evolution**, v. 55, n. 10, p. 2011-2027, 2001. ISSN 1558-5646.

FEBVAY, G.; DECHARME, M.; KERMARREC, A. Digestion of chitin by the labial glands of *Acromyrmex octospinosus* Reich (Hymenoptera: Formicidae). **Canadian Journal of Zoology**, v. 62, n. 2, p. 229-234, 1984. ISSN 0008-4301.

FEBVAY, G.; KERMARREC, A. Digestive physiology of leaf-cutting ants. 1986.

FERNÁNDEZ, F. Capítulo 21: Subfamilia Formicinae. **Introducción a las Hormigas de la Región Neotropical. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia. XXVI**, 2003.

FIELDING, A.; BYRDE, R. The partial purification and properties of endopolygalacturonase and α -l-arabinofuranosidase secreted by *Sclerotinia fructigena*. **Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 73-84, 1969. ISSN 1465-2080.

FILHO, E. X.; PULS, J.; COUGHLAN, M. P. Physicochemical and catalytic properties of a low-molecular-weight endo-1, 4- β -d-xylanase from *Myrothecium verrucaria*. **Enzyme and microbial technology**, v. 15, n. 6, p. 535-540, 1993. ISSN 0141-0229.

FLIPPPI, M.; VORAGEN, A.; VISSER, J. Induction, purification and characterisation of arabinases produced by *Aspergillus niger*. **Archives of microbiology**, v. 157, n. 1, p. 23-28, 1991. ISSN 0302-8933.

FOLGARAIT, P. J. Ant biodiversity and its relationship to ecosystem functioning: a review. **Biodiversity & Conservation**, v. 7, n. 9, p. 1221-1244, 1998. ISSN 0960-3115.

FOOTTIT, R. G.; ADLER, P. H. **Insect biodiversity: science and society**. John Wiley & Sons, 2009. ISBN 144430822X.

FOWLER, H. G. et al. A pest is a pest is a pest? The dilemma of neotropical leaf-cutting ants: keystone taxa of natural ecosystems. **Environmental Management**, v. 13, n. 6, p. 671-675, 1989. ISSN 0364-152X.

GARLING, L. Origin of ant-fungus mutualism: a new hypothesis. **Biotropica**, p. 284-291, 1979. ISSN 0006-3606.

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology advances**, v. 23, n. 7-8, p. 471-499, 2005. ISSN 0734-9750.

GIELKENS, M. et al. The *abfB* gene encoding the major α -L-arabinofuranosidase of *Aspergillus nidulans*: nucleotide sequence, regulation and construction of a disrupted strain. **Microbiology**, v. 145, n. 3, p. 735-741, 1999. Disponível em: <<http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/13500872-145-3-735>>.

GIELKENS, M. M.; VISSER, J.; DE GRAAFF, L. H. Arabinoxylan degradation by fungi: characterization of the arabinoxylan-arabinofuranohydrolase encoding genes from *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis*. **Current genetics**, v. 31, n. 1, p. 22-29, 1997. ISSN 0172-8083.

GOBBETTI, M. et al. Added pentosans in breadmaking: fermentations of derived pentoses by sourdough lactic acid bacteria. **Food microbiology**, v. 16, n. 4, p. 409-418, 1999. ISSN 0740-0020.

GONZAGA, A. D. et al. Microrganismos Associados às Formigas Cortadeiras *Atta sexdens* Fabricius (Hymenoptera, Formicidae: Attini) no Município de Manaus, Amazonas. **Sci Amazon**, v. 4, p. 85-90, 2015.

GRIMALDI, D; AGOSTI, D. A formicine in New Jersey Cretaceous amber (Hymenoptera: Formicidae) and early evolution of the ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 25, p. 13678-13683, 2000.

GUNATA, Z. et al. Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. **Carbohydrate Research**, v. 184, p. 139-149, 1988. ISSN 0008-6215.

GUPTA, R. et al. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1599-1616, 2003. ISSN 1359-5113.

GUTIERREZ-CORREA, M.; TENDERDY, R. P. Production of cellulase on sugar cane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 7, p. 665-667, 1997. ISSN 0141-5492.

HANLIN, R. L. et al. **Review: Condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine.** 2010. 173-188.

HARBAK, L.; THYGESEN, H. Safety evaluation of a xylanase expressed in *Bacillus subtilis*. **Food and chemical toxicology**, v. 40, n. 1, p. 1-8, 2002. ISSN 0278-6915.

HARRINGTON, T. C. Ecology and evolution of mycophagous bark beetles and their fungal partners. **Insect-fungal associations: ecology and evolution**, v. 1, p. 22, 2005.

HARVEY, A. J. et al. Comparative modeling of the three-dimensional structures of family 3 glycoside hydrolases. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 41, n. 2, p. 257-269, 2000. ISSN 1097-0134.

HAYWARD, T. K. et al. Improvements in titer, productivity, and yield using solka-floc for cellulase production. Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2000, Springer. p.859-874.

HENNINK, H.; STAM, H.; VAN OORT, M. Production, characterization and application of rhamnoGlacturonase. In: (Ed.). **Progress in biotechnology**: Elsevier, v.14, 1996. p.485-494. ISBN 0921-0423.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. **Biochem J**, v. 280, 1991. Disponível em: < <https://doi.org/10.1042/bj2800309> >.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **Biochemical Journal**, v. 316, n. Pt 2, p. 695, 1996.

HERNÁNDEZ, J. V.; JAFFÉ, K. Dano econômico causado por populações de formigas *Atta laevigata* (F. Smith) em plantações de *Pinus caribaea* Mor. e elementos para o manejo da praga. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 24, n. 2, p. 287-298, 1995.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. In: (Ed.). **The Ants**. Cambridge: Harvard University Press, 1990.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The superorganism: the beauty, elegance, and strangeness of insect societies**. WW Norton & Company, 2009. ISBN 0393067041.

HUANG, X. P.; MONK, C. Purification and characterization of a cellulase (CMCase) from a newly isolated thermophilic aerobic bacterium *Caldibacillus cellulovorans* gen. nov., sp. nov. **World journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 85-92, 2004. ISSN 0959-3993.

IKE, P. T. L. et al. Functional characterization of a yellow laccase from *Leucoagaricus gongylophorus*. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 654, 2015. ISSN 2193-1801.

ILMÉN, M.; THRANE, C.; PENTTILÄ, M. The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: Isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. **Mol Gen Genet**, v. 251, 1996.

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (IUBMB). Recommendations on Biochemical & Organic Nomenclature,

Symbols & Terminology etc. Disponível em: < <http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/> >
Acesso em: 5 Dez 2017

JIANG, Z.; LE BAIL, A.; WU, A. Effect of the thermostable xylanase B (XynB) from *Thermotoga maritima* on the quality of frozen partially baked bread. **Journal of Cereal Science**, v. 2, n. 47, p. 172-179, 2008. ISSN 0733-5210.

JØRGENSEN, H. et al. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 1, p. 42-48, 2005. ISSN 0141-0229.

JUHÁSZ, T. et al. Effect of pH on cellulase production of *Trichoderma reesei* RUT C30. Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4–7, 2003, in Breckenridge, CO, 2004, Springer. p.201-211.

JUHÁSZ, T.; EGYHÁZI, A.; RÉCZEY, K. β -Glucosidase production by *Trichoderma reesei*. Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2005, Springer. p.243-254.

JUNQUEIRA, L. K.; DIEHL, E.; DIEHL-FLEIG, E. Visitor ants (Hymenoptera: Formicidae) of *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 1, p. 161-164, 2001. ISSN 1519-566X.

KAJI, A. L-arabinosidases. In: (Ed.). **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**: Elsevier, v.42, 1984. p.383-394. ISBN 0065-2318.

KAJI, A.; SATO, M.; TSUTSUI, Y. An α -L-arabinofuranosidase produced by wild-type *Streptomyces* sp. no. 17-1. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 925-931, 1981. ISSN 0002-1369.

KAJI, A.; TAGAWA, K.; ICHIMI, T. Properties of purified α -l-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology**, v. 171, n. 1, p. 186-188, 1969. ISSN 0005-2744.

KAJI, A.; YOSHIHARA, O. Production and Properties of α -L-Arabinofuranosidase from *Corticium rolfsii*. **Applied microbiology**, v. 17, n. 6, p. 910-913, 1969. ISSN 0099-2240.

_____. Purification and Properties of α -D-Galactosidase Produced by *Corticium rolfsii*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 36, n. 8, p. 1335-1342, 1972. ISSN 0002-1369.

KALOGERIS, E. et al. Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresource technology**, v. 86, n. 3, p. 207-213, 2003. ISSN 0960-8524.

KANEKO, S.; SANO, M.; KUSAKABE, I. Purification and some properties of alpha-L-arabinofuranosidase from *Bacillus subtilis* 3-6. **Applied and environmental microbiology**, v. 60, n. 9, p. 3425-3428, 1994. ISSN 0099-2240.

KASHYAP, D. et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource technology**, v. 77, n. 3, p. 215-227, 2001. ISSN 0960-8524.

KASPARI, M. A primer on ant ecology pp. 9–24. **Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity. Biological diversity handbook series. Smithsonian Institution Press. Washington DC**, 2000.

KELLER, L.; GORDON, E. **The lives of ants**. OUP Oxford, 2009.

KIRK PM, et al. Dictionary of the fungi. 9° ed. CAB International, Wallingford. 655 pp. 2001.

KITAMURA, R. O. S.; TC, S. P. C.; FÁTIMA, M. Inibição do fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*.

KNOCH, T. R.; FAETH, S. H.; ARNOTT, D. L. Endophytic fungi alter foraging and dispersal by desert seed-harvesting ants. **Oecologia**, v. 95, n. 4, p. 470-473, 1993. ISSN 0029-8549.

KODAMA, T.; SHIIBA, K.; TSUJI, K. Suppressive effect of wheat-bran hemicellulose on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science (Japan)**, 1996. ISSN 0287-3516.

KOFOD, L. V. et al. Cloning and characterization of two structurally and functionally divergent rhamnogalacturonases from *Aspergillus aculeatus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 46, p. 29182-29189, 1994. ISSN 0021-9258.

KOMAE, K.; KAJI, A.; SATO, M. An α -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces purpurascens* IFO 3389. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 1899-1905, 1982. ISSN 0002-1369

KOOIJ, P. W. et al. Rapid shifts in *Atta cephalotes* fungus-garden enzyme activity after a change in fungal substrate (Attini, Formicidae). **Insectes Sociaux**, v. 58, n. 2, p. 145-151, May 01 2011. ISSN 1420-9098. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s00040-010-0127-9> >.

KOTCHONI, O. D.; SHONUKAN, O.; GACHOMO, W. Bacillus pumilus BpCRI 6, a promising candidate for cellulase production under conditions of catabolite repression. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 6, p. 140-146, 2003. ISSN 1684-5315.

KROG-MIKKELSEN, I. et. al. The effects of L-arabinose on intestinal sucrase activity: dose-response studies in vitro and in humans, **The American Journal of Clinical Nutrition**, v 94, n 2, Aug 1 2011, Pages 472–478, <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.014225>

KUNAMNENI, A.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus Thermomyces lanuginosus. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 2, p. 168-171, 2005/08/01/ 2005. ISSN 1389-1723. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172305704473> >.

LACAZ, C. D. S. et al. Basidiomycosis: a review of the literature. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, p. 379-390, 1996. ISSN 0036-4665. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46651996000500011&nrm=iso >.

LADERMAN, K. A. et al. The purification and characterization of an extremely thermostable alpha-amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium Pyrococcus furiosus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 32, p. 24394-24401, 1993. ISSN 0021-9258.

LAEMMLI, U. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970. ISSN 0028-0836.

LEE, J.-W. et al. Purification and characterization of a thermostable xylanase from the brown-rot fungus Laetiporus sulphureus. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 1, p. 33-37, 2009/01/01/ 2009. ISSN 1389-1723. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172308000571> >.

LEE, S.-J. et al. Antitumor activity of a novel ginseng saponin metabolite in human pulmonary adenocarcinoma cells resistant to cisplatin. **Cancer Letters**, v. 144, n. 1, p. 39-43, 1999 ISSN 0304-3835. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835\(99\)00188-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835(99)00188-3) >. Acesso em: 2018/03/08.

LI, X.-L. et al. Profile of enzyme production by Trichoderma reesei grown on corn fiber fractions. Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2005, Springer. p.321-334.

LI, X.-L. et al. Purification and characterization of a new xylanase (APX-II) from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1. **Applied and environmental microbiology**, v. 59, n. 10, p. 3212-3218, 1993. ISSN 0099-2240.

LIMING, X.; XUELIANG, S. High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. **Bioresource technology**, v. 91, n. 3, p. 259-262, 2004. ISSN 0960-8524.

LOPEZ, E.; ORDUZ, S. *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. **Biological Control**, v. 27, n. 2, p. 194-200, 2003. ISSN 1049-9644.

LUONTERI, E. et al. Purification and characterization of three α -arabinosidases from *Aspergillus terreus*. **Journal of biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 279-291, 1995. ISSN 0168-1656.

LYND, L. R. et al. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, p. 506-577, 2002.

MADHAVI, V.; LELE, S. Laccase: properties and applications. **BioResources**, v. 4, n. 4, p. 1694-1717, 2009. ISSN 1930-2126.

MANAVALAN, T.; MANAVALAN, A.; HEESE, K. **Characterization of Lignocellulolytic Enzymes from White-Rot Fungi**. 2014.

MANIN, C. et al. Purification and characterization of an α -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene (*abfA*). **Biochemical journal**, v. 302, n. 2, p. 443-449, 1994. ISSN 0264-6021.

MARGOLLES-CLARK, E. et al. Cloning of genes encoding alpha-L-arabinofuranosidase and beta-xylosidase from *Trichoderma reesei* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 10, p. 3840-3846, 1996. ISSN 0099-2240.

MARQUARDT, R. et al. The nutritive value of barley, rye, wheat and corn for young chicks as affected by use of a *Trichoderma reesei* preparation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 45, n. 3-4, p. 363-378, 1994. ISSN 0377-8401.

MARTIN, M. M. et al. Activity of fecal fluid of a leaf-cutting ant toward plant cell wall polysaccharides. **J Insect Physiol**, v. 21, 1975. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0022-1910\(75\)90219-X](https://doi.org/10.1016/0022-1910(75)90219-X)>.

MARTIN, M. M. The biochemical basis of the fungus-attine ant symbiosis. **Science**, v. 169, n. 3940, p. 16-20, 1970. ISSN 0036-8075.

MARTIN, M. M. The evolution of insect-fungus associations: from contact to stable symbiosis. **American Zoologist**, v. 32, n. 4, p. 593-605, 1992. ISSN 0003-1569.

MARTIN, M. M.; GIESELMANN, M. J.; MARTIN, J. S. Rectal enzymes of attine ants. α -amylase and chitinase. **Journal of Insect Physiology**, v. 19, n. 7, p. 1409-1416, 1973. ISSN 0022-1910.

MARTIN, M. M.; MARTIN, J. S. The biochemical basis for the symbiosis between the ant, *Atta colombica tonsipes*, and its food fungus. **Journal of Insect Physiology**, v. 16, n. 1, p. 109-119, 1970/01/01/ 1970. ISSN 0022-1910. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022191070901186> >.

MARTIN, M. M.; MARTIN, J. S. The presence of protease activity in the rectal fluid of primitive attine ants. **Journal of insect physiology**, v. 17, n. 10, p. 1897-1906, 1971. ISSN 0022-1910.

MARTIN, M. M.; WEBER, N. A. The Cellulose-Utilizing Capability of the Fungus Cultured by the Attine Ant *Atta colombica tonsipes*1. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 62, n. 6, p. 1386-1387, 1969. ISSN 0013-8746. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/aesa/62.6.1386> >.

MASSADEH, M. I. et al. Synergism of cellulase enzymes in mixed culture solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 21, p. 1771-1774, 2001. ISSN 0141-5492.

MATEO, J.; JIMÉNEZ, M. Monoterpenes in grape juice and wines. **Journal of Chromatography A**, v. 881, n. 1-2, p. 557-567, 2000. ISSN 0021-9673.

MATHESON, N.; SAINI, H. S. α -l-Arabinofuranosidases and β -d-galactosidases in germinating-lupin cotyledons. **Carbohydrate research**, v. 57, p. 103-116, 1977. ISSN 0008-6215.

MATHLOUTHI, N. et al. Xylanase, β -glucanase, and other side enzymatic activities have greater effects on the viscosity of several feedstuffs than xylanase and β -glucanase used alone or in combination. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 18, p. 5121-5127, 2002. ISSN 0021-8561.

MATSUO, N. et al. Purification, characterization and gene cloning of two α -L-arabinofuranosidases from *Streptomyces chartreusis* GS901. **Biochemical Journal**, v. 346, n. Pt 1, p. 9, 2000.

MAYHÉ-NUNES, A. J.; JAFFÉ, K. On the biogeography of Attini(Hymenoptera: Formicidae). **Ecotropicos**, v. 11, n. 1, p. 45-54, 1998. ISSN 1012-1692.

MAYHEW, P. J. Why are there so many insect species? Perspectives from fossils and phylogenies. **Biological Reviews**, v. 82, n. 3, p. 425-454, 2007. ISSN 1469-185X.

MEDEIROS, R. G. et al. Application of xylanases from Amazon Forest fungal species in bleaching of eucalyptus kraft pulps. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 231-238, 2007. ISSN 1516-8913. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132007000200008&nrm=iso>.

MEHDIABADI, N. J.; SCHULTZ, T. R. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Myrmecol. News**, v. 13, p. 37-55, 2010.

MERINO, S. T.; CHERRY, J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. In: (Ed.). **Biofuels**: Springer, 2007. p.95-120.

MICHELIN, M. et al. A new strategy for xylanase production using wheat straw autohydrolysis liquor as substrate. 2008. ISSN 9729781036.

MICHELIN, M. et al. Production and properties of xylanases from *Aspergillus terricola* Marchal and *Aspergillus ochraceus* and their use in cellulose pulp bleaching. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 33, n. 7, p. 813-821, 2010. ISSN 1615-7591.

MILANEZI, N. V. G. Purificação e caracterização de uma endo-1, 4-β-xilanase produzida por *Aspergillus niger* com características de interesse industrial. 2011.

MIYASHIRA, C. et al. Comparison of radial growth rate of the mutualistic fungus of *Atta sexdens rubropilosa* forel in two culture media. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 506-511, 2010. ISSN 1517-8382.

MO, H.; ZHANG, X.; LI, Z. Control of gas phase for enhanced cellulase production by *Penicillium decumbens* in solid-state culture. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 10, p. 1293-1297, 2004. ISSN 1359-5113.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. D. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista processos químicos**, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

MOREIRA, D.; ERTHAL JR, M.; SAMUELS, R. Alimentação e digestão em formigas-cortadeiras. **Della Lucia, TMC Formigas-Cortadeiras da Bioecologia ao Manejo. Viçosa: Ed. UFV**, p. 205-225, 2011.

MUELLER, U. G. et al. The evolution of agriculture in insects. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v. 36, p. 563-595, 2005. ISSN 1543-592X.

MUELLER, U. G. et al. The Origin of the Attine Ant-Fungus Mutualism. **Q Rev Biol**, v. 76, 2001. Disponível em: < <https://doi.org/10.1086/393867> >.

MUELLER, U. G. Ant versus Fungus versus Mutualism: Ant-Cultivar Conflict and the Deconstruction of the Attine Ant-Fungus Symbiosis. **Am Nat**, v. 160, 2002. Disponível em: < <https://doi.org/10.1086/342084> >.

MUELLER, U. G.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R. The Evolution of Agriculture in Ants. **Science**, v. 281, 1998. Disponível em: < <https://doi.org/10.1126/science.281.5385.2034> >.

NAGAR, S.; MITTAL, A.; GUPTA, V. K. Enzymatic clarification of fruit juices (apple, pineapple, and tomato) using purified *Bacillus pumilus* SV-85S xylanase. **Biotechnology and Bioprocess engineering**, v. 17, n. 6, p. 1165-1175, 2012. ISSN 1226-8372.

NICHOLS-ORIAN, C. Differential effects of condensed and hydrolyzable tannin on polyphenol oxidase activity of attine symbiotic fungus. **Journal of chemical ecology**, v. 17, n. 9, p. 1811-1819, 1991. ISSN 0098-0331.

NICKELE, M. A. et al. Formigas cultivadoras de fungos: estado da arte e direcionamento para pesquisas futuras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 73, p. 53-72, 2013. ISSN 1983-2605.

NIGAM, P.; SINGH, D. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 9, p. 770-778, 1995/09/01/ 1995. ISSN 0141-0229. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/014102299400003A> >.

NORMAND, J. et al. Purification, characterization, and mode of action of a rhamnogalacturonan hydrolase from *Irpex lacteus*, tolerant to an acetylated substrate. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 86, n. 2, p. 577-588, 2010. ISSN 0175-7598.

NUMAN, M. T.; BHOSLE, N. B. α -L-Arabinofuranosidases: the potential applications in biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 247-260, 2006. ISSN 1367-5435.

ORTH, A.; TIEN, M. Biotechnology of lignin degradation. In: (Ed.). **Genetics and Biotechnology**: Springer, 1995. p.287-302.

ORTIZ, A.; FRANCO-MOLANO, A. E.; BACCI JR, M. A new species of *Leucoagaricus* (Agaricaceae) from Colombia. **Mycotaxon**, v. 106, p. 371, 2008. ISSN 0093-4666.

PAGNOCCA, F. et al. Microbiological changes in the nests of leaf-cutting ants fed on sesame leaves. **Journal of Applied Entomology**, v. 120, n. 1-5, p. 317-320, 1996. ISSN 1439-0418.

PANAGIOTOU, G. et al. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 18, n. 1, p. 37-45, 2003. ISSN 0926-6690.

PEDROLLI, D. B. et al. Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. **Open Biotechnology Journal**, p. 9-18, 2009. ISSN 1874-0707.

PÉREZ, J. et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53-63, 2002. ISSN 1139-6709.

PETERSEN, T. N.; KAUPPINEN, S.; LARSEN, S. The crystal structure of rhamnogalacturonase A from *Aspergillus aculeatus*: a right-handed parallel β helix. **Structure**, v. 5, n. 4, p. 533-544, 1997. ISSN 0969-2126.

PINTO-TOMÁS, A. A. et al. Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutter ants. **Science**, v. 326, n. 5956, p. 1120-1123, 2009. ISSN 0036-8075.

POLIZELI, M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005. ISSN 0175-7598.

POLLEGIONI, L.; TONIN, F.; ROSINI, E. Lignin-degrading enzymes. **The FEBS journal**, v. 282, n. 7, p. 1190-1213, 2015. ISSN 1742-4658.

PONTECORVO, G. et al. The genetics of *Aspergillus nidulans*. In: (Ed.). **Advances in genetics**: Elsevier, v.5, 1953. p.141-238. ISBN 0065-2660.

POULSEN, M. et al. Specificity of the mutualistic association between actinomycete bacteria and two sympatric species of *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 3597-3604, 2005. ISSN 1365-294X.

PRADE, R. A. Xylanases: from biology to biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, n. 1, p. 101-132, 1996. ISSN 0264-8725.

PRASERTSAN, P. et al. Optimization for xylanase and cellulase production from *Aspergillus niger* ATTC 6275 in palm oil mill wastes and its application. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 555-559, 1997. ISSN 0959-3993.

PULS, J.; COUGHLAN, M. Purification and characterization of two arabinofuranosidases from solid-state cultures of the fungus *Penicillium capsulatum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 1, p. 168-173, 1996. ISSN 0099-2240.

RAJOKA, M. I.; MALIK, K. A. Cellulase production by *Cellulomonas biazotea* cultured in media containing different cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v. 59, n. 1, p. 21-27, 1997. ISSN 0960-8524.

RAMACHANDRAN, S. et al. Alpha amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its properties. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 309-317, 2004. ISSN 1516-8913. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132004000200019&nrm=iso>.

REIS, T. et al. Avaliação do potencial biotecnológico de xilanases de *Clostridium thermocellum* e *Cellvibrio mixtus*: sua utilização na suplementação de dietas a base de trigo para frangos de carne. **Revista Portuguesa De Ciências Veterinárias**, v. 96, p. 125-134, 2001.

RIBEIRO, S. B. et al. Activity of sesame leaf extracts against the symbiotic fungus of *Atta sexdens* L. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, p. 421-426, 1998. ISSN 0301-8059. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-80591998000300010&nrm=iso>.

RICHARD, F.-J. et al. Digestive capacities of leaf-cutting ants and the contribution of their fungal cultivar to the degradation of plant material. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 175, n. 5, p. 297-303, 2005. ISSN 0174-1578.

RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v. 57, p. 929-967, 2001.

RIZZATTI, A. et al. Purification and properties of a thermostable extracellular β -D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 156-160, 2001. ISSN 1367-5435.

RODRIGUES, A. et al. Variability of non-mutualistic filamentous fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. **Folia microbiologica**, v. 50, n. 5, p. 421, 2005. ISSN 0015-5632.

RODRIGUEZ-COUTO, S.; SANROMÁN, M. Application of Solid-State Fermentation to Ligninolytic Enzyme Production. 2005. 211-219.

RØNHEDE, S.; BOOMSMA, J. J.; ROSENDAHL, S. Fungal enzymes transferred by leaf-cutting ants in their fungus gardens. **Mycol Res**, v. 108, 2004. Disponível em: < <https://doi.org/10.1017/S0953756203008931> >.

RYAN, S. E. et al. Purification and characterization of a new low molecular weight endoxylanase from *Penicillium capsulatum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 6, p. 775-785, 2003/11/05/ 2003. ISSN 0141-0229. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022903001765> >.

SAHA, B. Alpha-L-arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. **Biotechnology advances**, v. 18, n. 5, p. 403, 2000. ISSN 0734-9750.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279-291, 2003. ISSN 1367-5435.

SAJEDI, R. H. et al. A Ca-independent α -amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus* sp. KR-8104. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 5-6, p. 666-671, 2005. ISSN 0141-0229.

SAKAMOTO, M. et al. Purification and characterization of a rhamnogalacturonase with protopectinase activity from *Trametes sanguinea*. **The FEBS Journal**, v. 226, n. 2, p. 285-291, 1994. ISSN 1432-1033.

SALAMA, M. et al. Biochemical studies of purified extracellular xylanases from *Aspergillus versicolor*. **Int J Bot**, v. 4, p. 41-48, 2008.

SALLES, B. C. et al. Purification and characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*. **Journal of Biotechnology**, v. 81, n. 2, p. 199-204, 2000/08/25/ 2000. ISSN 0168-1656. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816560002807> >.

SANAI, K.; SERI, K.; INOUE, S. Inhibition of Sucrose Digestion and Absorption by L-Arabinose in Rats. **Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi**, v. 50, n. 2, p. 133-137, 1997.

SANAI, K.; SERI, K.; INOUE, S. Inhibition of Sucrose Digestion and Absorption by L-Arabinose in Rats. **Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi**, v. 50, n. 2, p. 133-137, 1997.

SANDRIM, V. et al. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. **Process Biochemistry**, v. 5, n. 40, p. 1823-1828, 2005. ISSN 1359-5113.

SANTI, L. Produção, caracterização e aplicação de preparados pectinolíticos produzidos por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais. 2005.

SANTOS, A. V. et al. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **FEMS microbiology letters**, v. 239, n. 2, p. 319-323, 2004. ISSN 1574-6968.

SANTOS, M. S. et al. Riqueza de formigas (Hymenoptera, Formicidae) da serapilheira em fragmentos de floresta semidecídua da Mata Atlântica na região do Alto do Rio Grande, MG, Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 96, n. 1, p. 95-101, 2006.

SCHIØTT, M. et al. Leaf-cutting ant fungi produce cell wall degrading pectinase complexes reminiscent of phytopathogenic fungi. **BMC biology**, v. 8, n. 1, p. 156, 2010. ISSN 1741-7007.

SCHIØTT, M. et al. Towards a molecular understanding of symbiont function: Identification of a fungal gene for the degradation of xylan in the fungus gardens of leaf-cutting ants. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 40, February 28 2008. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-40> >.

SCHOLS, H. A. et al. Rhamnogalacturonase: a novel enzyme that degrades the hairy regions of pectins. **Carbohydrate Research**, v. 206, n. 1, p. 105-115, 1990. ISSN 0008-6215.

SCHOLS, H.; VORAGEN, A. Complex pectins: structure elucidation using enzymes. In: (Ed.). **Progress in biotechnology**: Elsevier, v.14, 1996. p.3-19. ISBN 0921-0423.

SCHULTZ, T. R. In search of ant ancestors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 26, p. 14028-14029, 2000. ISSN 0027-8424.

SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 14, p. 5435-5440, 2008. ISSN 0027-8424.

SCHULTZ, T. R.; MEIER, R. A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. **Systematic Entomology**, v. 20, n. 4, p. 337-370, 1995. ISSN 1365-3113.

SEMENOVA, T. A. et al. Evolutionary patterns of proteinase activity in attine ant fungus gardens. **BMC microbiology**, v. 11, n. 1, p. 15, 2011. ISSN 1471-2180.

SERI, K. et al. L-arabinose selectively inhibits intestinal sucrase in an uncompetitive manner and suppresses glycemic response after sucrose ingestion in animals. **Metabolism**, v. 45, n. 11, p. 1368-1374, 1996. ISSN 0026-0495.

SHIN, C. S. et al. Enzyme production of *Trichoderma reesei* Rut C-30 on various lignocellulosic substrates. Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2000, Springer. p.237-245.

SHIN, H.-Y. et al. Purification and Characterization of α -L-Arabinopyranosidase and α -L-Arabinofuranosidase from *Bifidobacterium breve* K-110, a Human Intestinal Anaerobic Bacterium Metabolizing Ginsenoside Rb2 and Rc. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 12, p. 7116-7123, 2003. ISSN 0099-2240.

SI, J. Q. Enzymes, Baking, Bread-Making. **Encyclopedia of Bioprocess Technology**, Wiley, p. 1-18, 1999.

SILVA, A. et al. Production of polysaccharidases in different carbon sources by *Leucoagaricus gongylophorus* Möller (Singer), the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* Linnaeus. **Current microbiology**, v. 53, n. 1, p. 68-71, 2006. ISSN 0343-8651.

SILVA, A. et al. Starch metabolism in *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Microbiological Research**, v. 161, n. 4, p. 299-303, 2006/11/17/ 2006. ISSN 0944-5013. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501305001187> >.

SILVA, A. et al. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **J Insect Physiol**, v. 49, 2003. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(03\)00004-0](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(03)00004-0) >.

SILVA, A. Alfa-amilase e maltase nos simbiontes *Leucoagaricus gongylophorus* Singer (Möller)(Leucocoprineae: agaricaceae) e *Atta sexdens* Linnaeus (Attini: formicidae). 2004.

SILVA, C. H. C. E. et al. Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 114-119, 1999. ISSN 0001-3714. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37141999000200005&nrm=iso >.

SILVA, G. M. **Expressão de enzimas de Pleurotus spp. e descoloração do corante azul índigo**. 2014. Universidade de São Paulo

SILVA-PINHATI, A. C. O. et al. Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1463-1472, 2004. ISSN 0100-879X. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2004001000004&nrm=iso >.

SINGH, S. et al. Relatedness of *Thermomyces lanuginosus* strains producing a thermostable xylanase. **Journal of Biotechnology**, v. 81, n. 2, p. 119-128, 2000/08/25/2000. ISSN 0168-1656. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165600002790> >.

SØRENSEN, H. R. et al. Efficiencies of designed enzyme combinations in releasing arabinose and xylose from wheat arabinoxylan in an industrial ethanol fermentation residue. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 5-6, p. 773-784, 2005. ISSN 0141-0229.

SOUZA, P. M. D.; MAGALHÃES, P. D. O. Application of microbial α -amylase in industry—A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 850, 2010.

SUYKERBUYK, M. et al. Cloning and characterization of two rhamnogalacturonan hydrolase genes from *Aspergillus niger*. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2507-2515, 1997. ISSN 0099-2240.

SUYKERBUYK, M. E. et al. Cloning, sequence and expression of the gene for rhamnogalacturonan hydrolase of *Aspergillus aculeatus*; a novel pectinolytic enzyme. **Molecular analysis of endo-rhamnogalacturonan hydrolases in Aspergillus**, p. 1042,

TANAKA, M.; UCHIDA, T. Purification and properties of alpha-l-arabinofuranosidase from plant *Scopolia japonica* calluses. **Biochimica et biophysica acta**, v. 522, n. 2, p. 531-540, 1978. ISSN 0006-3002.

UDAY, U. S. P. et al. Classification, mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 1041-1054, 2016/01/01/ 2016. ISSN 0141-8130. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014181301530088X> >.

UESAKA, E. et al. Alpha-l-arabinofuranosidase from *Rhodotorula flava*. **Journal of bacteriology**, v. 133, n. 3, p. 1073-1077, 1978. ISSN 0021-9193.

UPADHYAY, P.; SHRIVASTAVA, R.; AGRAWAL, P. K. Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. **3 Biotech**, Berlin/Heidelberg, v. 6, n. 1, p. 15, 01/0607/08/received 12/14/accepted 2016. ISSN 2190-572X 2190-5738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4703590/> >.

VALLÉE, F. et al. Barley α -amylase bound to its endogenous protein inhibitor BASI: crystal structure of the complex at 1.9 Å resolution. **Structure**, v. 6, n. 5, p. 649-659, 1998. ISSN 0969-2126.

VAN DAM, H.; HILLE, J. Yeast and enzymes in breadmaking. **Cereal foods world (USA)**, 1992. ISSN 0146-6283.

VAN DER MAAREL, M. J. et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 137-155, 2002. ISSN 0168-1656.

VARALAKSHMI, K. et al. Production and characterization of alpha-amylase from *Aspergillus niger* JGI 24 isolated in Bangalore. **Polish journal of microbiology**, v. 58, n. 1, p. 29, 2009. ISSN 1733-1331.

VD VEEN, P. et al. Induction, purification and characterisation of arabinases produced by *Aspergillus niger*. **Archives of microbiology**, v. 157, n. 1, p. 23-28, 1991. ISSN 0302-8933.

VEGA, F. E.; BLACKWELL, M. **Insect-fungal associations: ecology and evolution**. Oxford University Press, 2005. ISBN 0198037279.

VELKOVSKA, S.; MARTEN, M. R.; OLLIS, D. F. Kinetic model for batch cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30. **Journal of biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 83-94, 1997. ISSN 0168-1656.

VELLINGA, E. C. Notes on *Lepiota* and *Leucoagaricus*. Type studies on *Lepiota magnispora*, *Lepiota barssii*, and *Agaricus americanus*. **Mycotaxon**, v. 76, p. 429-438, 2000. ISSN 0093-4666.

VORAGEN, A. et al. The degradation of arabinans by endo-arabinanase and arabinofuranosidases purified from *Aspergillus niger*. **Food Hydrocolloids**, v. 1, n. 5-6, p. 423-437, 1987. ISSN 0268-005X.

WEBER, N. A. Evolution in fungus-growing ants. Proceedings of the Tenth International Congress of Entomology, 1958. p.459-473.

WEBER, N. A. Fungus-growing ants. **Science**, v. 153, n. 3736, p. 587-604, 1966. ISSN 0036-8075.

_____. Gardening ants the attines. 1972.

WEINSTEIN, L.; ALBERSHEIM, P. Structure of plant cell walls: IX. Purification and partial characterization of a wall-degrading endo-arabanase and an arabinosidase from *Bacillus subtilis*. **Plant Physiology**, v. 63, n. 3, p. 425-432, 1979. ISSN 0032-0889

WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Production of cellulase/ β -glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 3087-3094, 2005. ISSN 1359-5113.

WETTERER, J. K.; SCHULTZ, T. R.; MEIER, R. Phylogeny of fungus-growing ants (Tribe Attini) based on mtDNA sequence and morphology. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 9, n. 1, p. 42-47, 1998. ISSN 1055-7903.

WHEELER, W. C. et al. The phylogeny of the extant hexapod orders. **Cladistics**, v. 17, n. 2, p. 113-169, 2001. ISSN 1096-0031.

WHEELER, W. M. The fungus-growing ants of North America. *Bulletin of the AMNH*; v. 23, article 31. 1907.

WHEELER, W. M.; BAILEY, I. W. The feeding habits of pseudomyrmine and other ants. **Transactions of the American Philosophical Society**, v. 22, n. 4, p. 235-279, 1920. ISSN 0065-9746.

WILSON, E. O. **Diversidade da vida**. Editora Companhia das Letras, 2012. ISBN 8580865085.

WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and techniques of biochemistry and molecular biology**. Cambridge university press, 2010. ISBN 1107393493.

WONG, K.; TAN, L.; SADDLER, J. N. Multiplicity of beta-1, 4-xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiological reviews**, v. 52, n. 3, p. 305, 1988.

WOOD, S. L. The bark and ambrosia beetles of North and Central America (Coleoptera: Scolytidae), a taxonomic monograph. **The bark and ambrosia beetles of North and Central America (Coleoptera: Scolytidae), a taxonomic monograph.**, 1982.

WOOD, T.; THOMAS, R. The mutualistic association between Macrotermitinae and Termitomyces. **Insect-fungus interactions**, p. 69-92, 1989.

XIA, L.; CEN, P. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 9, p. 909-912, 1999. ISSN 1359-5113.

XIMENES, F. D. A. et al. Purification and Characterization of a Low-Molecular-Weight Xylanase Produced by *Acrophialophora nainiana*. **Current Microbiology**, v. 1, n. 38, p. 18-21, 1999. ISSN 0343-8651.

YIN, Y. et al. dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. **Nucleic acids research**, v. 40, n. W1, p. W445-W451, 2012. ISSN 0305-1048.

ZHANG, C.; XING, X.-H.; LIU, M.-S. Production of multienzymes consisting of alkaline amylase and cellulase by mixed alkalophilic culture and their potential use in the saccharification of sweet potato. **Biochemical engineering journal**, v. 19, n. 2, p. 181-187, 2004. ISSN 1369-703X.

ZVERLOV, V. V. et al. Nucleotide sequence of *arfB* of *Clostridium stercorarium*, and prediction of catalytic residues of α -L-arabinofuranosidases based on local similarity with several families of glycosyl hydrolases. **FEMS microbiology letters**, v. 164, n. 2, p. 337-343, 1998. ISSN 1574-696