



**LEVANTAMENTO E AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DE DOENÇAS
NA MANDIOCA E PRODUÇÃO DE CELULASES POR FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS À CULTURA NO ESTADO DA PARAÍBA**

MARTIVAL DOS SANTOS MORAIS

RECIFE



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

**Levantamento e avaliação da intensidade de doenças na mandioca e
produção de celulases por fungos fitopatogênicos à cultura no estado da
Paraíba**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Micologia aplicada
ALUNO: MARTIVAL SANTOS MORAIS
Orientador: Neiva Tinti de Oliveira
Co-orientador: Keila Aparecida Moreira

RECIFE
FEVEREIRO/2014

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Morais, Martival Santos

Levantamento e avaliação da intensidade de doenças na mandioca e produção de celulases por fungos fitopatogênicos à cultura do estado da Paraíba / Martival Santos Moraes. – Recife: O Autor, 2014.

109 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Neiva Tinti de Oliveira

Coorientadora: Keila Aparecida Moreira

Tese (graduação) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biologia de Fungos, 2014.

Inclui bibliografia

1. .Fungos fitopatogênicos 2. Enzimas de fungos I. Oliveira, Neiva Tinti de (orient.) II. Moreira, Keila Aparecida (coorient.) III. Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-075

**LEVANTAMENTO E AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DE DOENÇAS
NA MANDIOCA E PRODUÇÃO DE CELULASES POR FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS À CULTURA NO ESTADO DA PARAÍBA**

MARTIVAL DOS SANTOS MORAIS

Aprovado em: 20/02/2014.

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Dra. Neiva Tinti de Oliveira (Depto. de Micologia – UFPE) - Orientadora

Dra. Marília de Holanda Cavalcanti Maciel (Depto. de Micologia – UFPE)

Dra. Luciana Cordeiro do Nascimento (Depto. de Fitotecnia e Ciências Ambientais – UFPB)

Dra. Erika Valente de Medeiros (Depto. de Agronomia – UFRPE)

Dra. Polyanna Nunes Herculano (Depto. de Morfologia e Fisiologia animal UAG–UFRPE)

*“Aquele que deseja construir torres
altas deverá permanecer longo
tempo nos fundamentos”*

Anton Brukcner

Agradecimentos

Ao Pai eterno, Todo-poderoso, razão de todas as coisas e fiel companheiro. Sempre esteve comigo, iluminando-me nas incertezas e fortalecendo-me nas dificuldades.

À Luci e à pequena Livia Sophia, as quais pacientemente compreenderam e suportaram saudades na minha ausência, subtraindo seu bem-estar em prol da nossa realização.

A meus pais, exemplos de firmeza de caráter, disciplina e amor; pela força, confiança e dedicação na minha formação, sem os quais, seria impossível alcançar meus objetivos.

Aos meus familiares, pelo ânimo e fortalecimentos quando necessitei.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, pela oportunidade, confiança e ótima mediação nos processos acadêmicos.

Aos mandiocultores do Estado da Paraíba, pelas acolhidas, informações e disponibilidade das propriedades, as quais serviram de bases para dados da pesquisa.

À EMATER e EMEPA, pelos serviços, informações e colaboração prestada nos encaminhamentos às propriedades rurais, disponibilizando de seus próprios recursos.

À minha orientadora, Dra. Neiva Tinti de Oliveira, pela orientação nos assuntos concernentes aos isolamentos e identificação dos fungos e muitas sugestões valiosas.

À minha co-orientadora Dra. Keila Aparecida Moreira, pelas noções preliminares sobre o estudo das enzimas, bem como muitas experiências repassadas da prática laboratorial.

Ao meu amigo Libânio, pelo companheirismo, auxílios em várias dúvidas, pela contínua disposição e ajudas essenciais no decorrer do desenvolvimento da pesquisa e por disponibilização de recursos muitas vezes difíceis.

Ao CETENE por conceder espaço físico e materiais para purificação parcial das enzimas celulolíticas, parte fundamental para conclusão deste trabalho.

Aos companheiros Isaac, Aldenise, Ribas, Manuel, Stebam e todos os demais do Labio-CETENE, pela indispensável colaboração e companhia em todos os momentos das experimentações.

À coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela ajuda financeira na fomentação da bolsa de estudo, a qual tornou possível não só a manutenção da estadia em Recife, mas também o curso e toda a pesquisa.

À professora Marilene, pela disponibilização do laboratório de Fungos aquáticos, pela ajuda no isolamento de fungos da parte aérea e identificação dos fungos biotróficos, bem como no auxílio na incorporação dos fungos à Coleção URM.

À professora Débora Massa Lima, da Coleção URM, pelo auxílio na identificação de alguns fungos desta tese.

Aos companheiros de curso: Taís, Josiane, Suzane, João, Ângelo, Paul, entre outros, pela companhia, amizade e ajudas concedidas ao longo destes anos.

Aos colegas Sheyla, Carol, Elane, Flávio, Jônatas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelas inúmeras ajudas em procedimentos laboratoriais.

Ao companheiro Timóteo e professor Walter da UFPB, pelas análises estatísticas e outros testes de quantificação.

A professora Érika Valente, por todos os auxílios concernentes à estatística, conhecimentos fitopatológicos e epidemiológicos.

A professora Luciana Cordeiro, pela disponibilização do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal da Paraíba e por auxílios nos procedimentos epidemiológicos.

A coordenação do laboratório CENLAG da UFRPE, pela disponibilização do espaço físico e recursos materiais e humanos, que foram essenciais durante a maior parte de tempo das pesquisas.

RESUMO GERAL

Devido à importância alimentar da cultura da mandioca (*Manihot esculenta*) na Paraíba, tornam-se necessários estudos sobre a etiologia e epidemiologia de doenças fúngicas da cultura, bem como sobre a produção de celulases pelos fungos fitopatogênicos causadores. Os objetivos deste trabalho foram quantificar as doenças e isolar fungos patogênicos da cultura no Estado, avaliar a produção de celulases pelos isolados, otimizar a produção por *Colletotrichum gloeosporioides* URM 7080 e purificar parcialmente a FPase (Atividade em Papel de Filtro). Para quantificar a incidência das doenças, foram avaliados dois plantios em 21 municípios, sendo selecionadas duas áreas de amostragem em cada plantio, cada uma abrangendo 150 plantas. A comparação das médias em cada município foi realizada através da análise de variância e teste de Tukey a 5%. Foram detectadas as doenças mancha parda (MP), mancha branca (MB), antracnose (AC) e a podridão radicular (PR). A MP foi observada em todos os municípios, seguindo-se da MB. A AC foi detectada em pouco mais 70%. A PR foi observada em Imaculada. Os estudos epidemiológicos foram realizados na cidade de Alagoa Nova, tendo como amostragem 75 plantas. As MP, MB e AC foram influenciadas fortemente pelo índice pluviométrico e atingiram 13,3; 4,7 e 3,3 % de severidade, enquanto para a AACPD (Área Abaixo da Curva de Progresso das Doenças), 61,02; 32,45 e 15,28 durante um ano de avaliação. A produção de celulases por 27 isolados das espécies *C. gloeosporioides* e *F. oxysporum* foi conduzida sob fermentação submersa à 120 rpm, 30 °C durante 7 dias, tendo CMC (Carboximetilcelulose) como fonte de carbono. As atividades foram quantificadas por meio do grau de hidrólise de tiras de papel de filtro (FPase) e CMC (CMCase). As atividades mais elevadas foram obtidas por *C. gloeosporioides*, isolados 23 e 22, com 23,13 e 1,51 U/mL para FPase e CMCase, respectivamente. Para β G (β -glucosidase), 0,0014 U/mL, pelo isolado 13. Na otimização, utilizou-se farelo de entrecasca de mandioca (MA) e palma forrageira triturada (PA) nas concentrações 0,5, 0,75 e 1%, pH inicial 5,0, 6,0 e 7,0; agitações 80, 110 e 140 rpm e temperaturas de 28, 32 e 36 °C em experimento fatorial fracionário 2⁵ com 32 ensaios + 4 repetições no ponto central. Os melhores parâmetros para produção foram: 1% de MA, 0,5% de PA, 28° C, com o pH inicial 5,0 para FPase ou pH 7,0 para CMCase; pH inicial 5,0 e 36° C para β G e agitação de 140 rpm para as três enzimas. Nessas condições a FPase atingiu 5,50 U/mL com o meio adicionado de fluoreto de fenilmetilsulfonida (PMSF) em 3,167 mg/mL de biomassa micelial após 144h. Na purificação parcial, a precipitação em sulfato de Amônia F60-80% resultou 1,29 Um/L e a cromatografia de exclusão molecular em DEAE-celulose (Dietilaminoetil-celulose), 0,81 U/mL, com 14,79 % de rendimento. As maiores taxas de atividade foram observadas na aplicação do pH de valor 6,0 e temperatura 60 °C, mantendo-se estável a 60 °C e pH 5,0 após 180 minutos.

Palavras-chave: Incidência, FPase, agentes etiológicos, *Colletotrichum gloeosporioides*

ABSTRACT

Due to the importance of feeding in cassava (*Manihot esculenta*) in the State of Paraíba, becomes necessary studies on the etiology and epidemiology of fungal diseases, as well as the production of cellulases by this pathogenic fungi. The objectives of this study were then quantify the disease and isolate pathogenic fungi culture in the State, evaluate the cellulase production by isolates, optimize production by *Colletotrichum gloeosporioides* URM 7080 and partially purify FPase (Activity on Filter Paper). To quantify the incidence of diseases, were evaluated in 21 municipalities. Two areas were selected for sampling in each one, each covering 150 plants. Comparison of media in each municipality was performed by analysis of variance and Tukey test at 5% probability. The brown spot disease (BS), white spot (WS), anthracnose (AC) and root rot (RR) were detected. The BS was observed in all municipalities, followed by the WS. The AC was detected in just over 70%. The RR was observed in Imaculada Citi. The epidemiological studies were conducted in the city of Alagoa Nova, whose sampling 75 plants. The BS, WS and AC were strongly influenced by rainfall and reached 13,3, 4,7 and 3,3 % of severity, while the AUDPC (Area Under Disease Progress Curve), 61,02, 32,45 and 15,28 for a year of assessment. The production of cellulases by 27 isolates of the species *C. gloeosporioides* and *F. oxysporum* was conducted under submerged at 120 rpm, 30 °C for 7 days fermentation, with CMC (Carboxymethylcellulose) as carbon source. The activities were quantified by the degree of hydrolysis of strips of filter paper (FPase) and CMC (CMCase). The highest activities were for fungal species *C. gloeosporioides*, 23,13 and 1,51 U/mL for FPase and CMCase were obtained by isolates 23 and 22. For β G (β -glucosidase), 0,0014 U/ml, by 13 isolate. For optimization, were used bran bast cassava (CA) and forage cactus triturated (CT) at levels of 0,5 , 0,75 and 1 % , pH 5,0 , 6,0 and 7,0; agitations 80, 110 and 140 rpm and temperatures of 28, 32 and 36 °C in a fractional factorial experiment with 32 trials $2^5 + 4$ repetitions at the central point. The best parameters for production of 1% CA, 0,5% CT, 28 °C , with an initial pH 5,0 to FPase or for CMCase, pH 7,0. Initial pH 5,0 and 36 °C for β G and agitation of 140 rpm for the three enzymes. Under these conditions the FPase reached 5,50 U/ml with medium containing Phenilmetilsulfonida fluoride (PMSF) at 3,167 mg/ml of mycelial biomass after 144h. In partial purification, precipitation in F60-80 % of ammonia sulfate resulted 1,29 U/mL and chromatography molecular exclusion on DEAE - cellulose (diethylaminoethyl-cellulose), 0,81 U/mL, with 14,79 % of yield. The highest levels of activity were observed in the application of the pH value of 6,0 and temperature 60 °C, and was stable at 60 °C and pH 5,0 for 180 min.

Keywords: Incidence, FPase, etiological agents, *Colletotrichum gloeosporioides*

Lista de figuras

	Pág.
Fundamentação Teórica	
Figura 1 – Mancha parda (A) e Oídio (B) em folhas de mandioca	22
Figura 2 – Podridão negra na raiz de mandioca causada por <i>Scytalidium lignicola</i> <i>Scytalidium lignicola</i> cultivado em meio BDA.....	24
Figura 3 – Mecanismo de ação das enzimas do complexo celulolítico.....	25
Capítulo 1	
Figura 1 – Precipitação bimensual acumulada (mês anterior e exato da coleta) em municípios do Estado da Paraíba - Primeiro semestre de 2011.....	42
Capítulo 2	
Figura 1 – Temperaturas (°C) máximas e mínimas (A) e precipitação acumulada média mensal (mm) (B) em Alagoa Nova (PB), durante setembro de 2012 a agosto de 2013.....	48
Figura 2 – Escala diagramática para quantificação da mancha parda da mandioca, causada por <i>Cercosporidium henningsii</i> , indicando níveis de 1, 2, 4, 8, 16 e 32% de severidade da doença.....	49
Figura 3 – Área abaixo da Curva de progresso da severidade da mancha parda (MP), mancha branca (MB) e antracnose (AC) em mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) em Alagoa Nova, Paraíba do mês de setembro de 2012 à agosto de 2013.....	52
Figura 4 – Taxas de progresso mensais da mancha parda (MP), mancha branca (MB) e antracnose (AC), no período de setembro de 2012 a agosto de 2013. Alagoa Nova- PB.....	53
Figura 5 – Curva de progresso da severidade de mancha parda, mancha branca e antracnose em mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) durante o período de setembro de 2012 a agosto 2013, através do modelo logístico, em condições de campo em Alagoa Nova – PB.....	54
Capítulo 3	
Figura 1 – Projeção plana multivariada das variáveis em relação às atividades totais U/mL de FPAse (celulases totais), CMCase (endoglucanases) e β G. Carregamento das variáveis dos Fatores principais 1 e 2 para atividades celulolíticas por <i>Colletotrichum gloeosporoides</i> URM 7080 em fermentação submersa.....	69
Figura 2 – Projeção plana multivariada dos ensaios para dados da atividade total de FPAse, CMCase e β G por <i>Colletotrichum gloeosporoides</i> URM 7080 em fermentação submersa.....	70
Figura 3 – Crescimento da biomassa de <i>Colletotrichum gloeosporoides</i> URM 7080 durante 144 horas de fermentação em cultivo submerso composto de farelo de entrecasca de mandioca (1,0%) e palma triturada (0,5%) em pH 5.0, 28 °C e 140 rpm.....	71

Figura 4 – Produção do complexo celulolítico por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> URM 7080 em cultivo submerso composto de farelo de entrecasca de mandioca e palma triturada em pH 5.0, 28 °C e 140 rpm.....	71
Figura 5 – Efeito de diferentes valores de pH (A) e Temperatura (B) sobre fração parcialmente purificada de FPAses de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> URM 7080 isolado de folhas de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>).....	72
Figura 6 – Estabilidade em diferentes valores de pH (A) e termoestabilidade a faixa de temperaturas 30 -90 °C (B) sobre sobre atividade de fração parcialmente purificada de FPAses por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> URM 7080 isolado de folhas de mandioca.....	73

Lista de tabelas

Pág.

Capítulo 1

Tabela 1 – Incidências de doenças da mandioca no Estado da Paraíba – 1º semestre de 2011.....	41
---	----

Capítulo 2

Tabela 1 – Curva de progresso absoluta da incidência e severidade da mancha parda (MP), mancha branca (MB) e antracnose (AC) em mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) em Alagoa Nova, Paraíba do mês de setembro de 2012 à agosto de 2013.....	51
Tabela 2 – Efeitos das variáveis meteorológicas no progresso de mancha parda, mancha branca e antracnose da mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) cultivada em Alagoa Nova – PB.....	54

Capítulo 3

Tabela 1 – Fungos isolados de tecidos infectados de mandioca cultivada na Paraíba.....	61
Tabela 2 – Matriz do planejamento fatorial 2 ⁵ e dos níveis das variáveis para produção do complexo celulolítico por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	63
Tabela 3 – Atividade celulolítica (U/ml) de <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> obtidos de tecidos infectados de mandioca em fermentação submersa.....	66
Tabela 4 – Planejamento fatorial 2 ⁵ para estudo dos efeitos de variáveis e interações sobre a produção de celulasas em 96h de fermentação submersa por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> URM 7080.....	68
Tabela 5 – Efeitos dos níveis e variáveis para produção de FPase, CMCase e β -glucosidase (β G) com 96 horas de fermentação submersa (FSm) por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> URM 7080.....	69
Tabela 6 – Perfil das Atividades FPase de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> URM 7080 em três etapas de purificação.....	72
Tabela 7 – Efeito de íons sobre a atividade enzimática de FPase produzida por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> URM 7080 isolado de folhas de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>).....	74

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
2.1. A cultura da mandioca.....	18
2.2. Doenças da cultura da mandioca.....	20
2.3. Enzimas celulolíticas.....	24
2.4. Aplicações das celulasas.....	27
2.5. Importância dos fungos filamentosos.....	29
2.6. Fermentação Submersa.....	34
2.7. Substratos para produção de celulasas.....	35
3. LEVANTAMENTO E AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DAS DOENÇAS DA MANDIOCA NO ESTADO DA PARAÍBA.....	39
Resumo.....	39
3.1. Introdução.....	40
3.2. Resultados.....	41
4. DOENÇAS FOLIARES DA MANDIOCA (<i>Manihot esculenta</i>) NO MUNICÍPIO DE ALAGOA NOVA- PARAÍBA- BRASIL.....	45
Resumo.....	45
4.1. Introdução.....	46
4.2. Material e métodos.....	47
4.3. Resultados e discussão.....	50
5. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE CELULASES POR <i>C.</i> <i>gloeosporioides</i> URM 7080.....	58
Resumo.....	58
5.1. Introdução.....	59
5.2. Material e métodos.....	60
5.3. Resultados.....	66
5.4. Discussão.....	74
6. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
APÊNDICES.....	106

1. INTRODUÇÃO

No Estado da Paraíba, Nordeste brasileiro, culturas de tuberosas amiláceas, como a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) apresentam grande importância social, uma vez que são destinadas à dieta alimentar na forma de farinha e outros derivados (Pinto, 2010). Esses alimentos contribuem diretamente para a sobrevivência de parcela significativa da população de baixa renda neste e em muitos Estados. Outra relevância a se considerar é a sua contribuição na economia da agricultura familiar (Sousa e Targino, 2009), a qual constitui o principal objetivo para o cultivo dessa espécie no Estado (Silva, 2013).

A cultura da mandioca adquire caráter comercial no Litoral, microrregião do Brejo paraibano e áreas circunvizinhas, onde sofre um processo de concentração, devido à mecanização das casas de farinha. No Sertão do Estado, é explorada como cultura de subsistência (Rodriguez, 2002). Levando-se em consideração estas demandas, registrou-se para o Estado, o total de uma área plantada de 28.790 ha, 21.900 ha de área colhida e uma produção de 201.871 t no ano de 2012. Estes números são considerados dados importantes para a Região Nordeste (CONAB, 2012).

Vários fatores têm contribuído para o decréscimo da produtividade dessa cultura no cenário nacional, dentre estes, doenças, as quais ocorrem desde o comércio das manivas e perduram até a pós-colheita (Oliveira et al., 2008; Mattos et al., 2002). Entre as doenças registradas que causam prejuízos, cita-se: as podridões radiculares, manchas foliares, bacterioses, superalongamento e viroses (Lozano e Booth, 1974). Em relação ao controle fitossanitário dessas doenças, não existem programas de manejo considerados eficientes ou adequados. Também não são tomadas medidas culturais preventivas, porém, já foi sugerido que as medidas isoladas devam ser substituídas por um sistema integrado (Takahashi, 2009).

Embora a Paraíba seja um dos principais produtores de mandioca da região Nordeste, as perdas atuais causadas pelos problemas parasitários poderiam ser evitadas, realizando-se o levantamento dos agentes etiológicos e estabelecendo programas de controle eficientes e adequados, pois ainda não foram realizados estudos acerca da identificação de possíveis agentes infecciosos fúngicos da cultura no Estado.

Segundo Fernandes et al. (2006), a importância da rápida e correta identificação dos agentes patogênicos presentes em diferentes culturas apresenta-se como ferramenta primordial para o estabelecimento do correto tratamento a ser empregado, possibilitando a recuperação da cultura, com diminuição nos prejuízos causados pelas doenças. Por outro

lado, as perdas ocasionadas por este motivo não são quantificadas na cultura, porque faltam estudos epidemiológicos e uma base para comparação em condições naturais. (Takatsu e Fukuda, 1990; Massola e Bedendo, 2005).

Outra importância em se conhecer a diversidade destes agentes biológicos, deve-se a possibilidade de se obter espécimes com potencial para produção de enzimas de interesse biotecnológico. Os fungos filamentosos apresentam naturalmente características que condizem com as exigências requeridas para esta produção, pois são eficazes produtores de enzimas hidrolíticas (Ângelo, 2010; Silva et al., 2011). Fungos fitopatogênicos, por sua vez, produzem grande variedade de enzimas necessárias nos processos de penetração e colonização do tecido do hospedeiro (Pascholati, 1995; Mendgen e Hahn, 1996).

São registrados fungos patogênicos a mandioca (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium moniliforme*, *F. solani*, *F. oxysporum* e *Scytalidium lignicola*) os quais acometem a planta tanto na parte aérea como nas raízes (Hillocks e Wydra, 2002; Mattos et al., 2002; Oliveira et al., 2008; Notaro et al., 2013). Assim como os demais fungos, devido às características adaptativas e condições de sobrevivência, estes organismos apresentam-se como materiais biológicos para fácil prospecção e caracterização, bem como para otimização nas condições de produção enzimática.

As enzimas celulolíticas são obtidas a partir de diversos organismos (Lynd et al., 2002; Bon et al., 2008; Kuhad et al., 2011). Muitos destes secretam estes biocatalizadores visando decompor a celulose integrante das partes dos vegetais em diferentes relações tróficas, e ecológicas. Os principais grupos estudados integram espécies de bactérias (*Clostridium thermocellum*, *Ruminococcus albus*, *Cellulomonas* spp. e *Cytophaga* spp.), actinomicetos (*Streptomyces* spp. e *Nocardia* spp.) e fungos filamentosos (*Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp., e *Penicillium* spp.) (Singh et al., 2009; Eida et al., 2011; Kuhad et al., 2011; Sadhu e Maiti, 2013).

Embora haja grande diversidade de agentes produtores de celulasas, sabe-se que poucos elaboram estas enzimas em quantidades suficientes para aplicação biotecnológica e muitos dos que as produzem não atingem concentrações favoráveis para possibilitar a degradação da celulose de forma eficiente *in vitro* (Aranda et al., 2004; Makut e Godiya, 2010). Este fator então torna necessária a busca de organismos que realizem adequado grau de hidrólise de substratos celulósicos em pequena fração de tempo para que possam subsequentemente, ser explorados nas atividades humanas.

As celulasas, por exemplo, produzidas por fungos fitopatogênicos da mandioca, juntamente com outras enzimas do processo infeccioso, são potencialmente capazes de

degradar diversos componentes da parede celular do tecido da planta parasitada (Okunowo et al., 2010; Ramanathan et al., 2010).

Neste contexto, este trabalho de tese foi realizado objetivando quantificar e registrar as doenças causadas por fungos fitopatogênicos isolados da parte aérea e radicular de plantas de mandioca cultivadas no Estado da Paraíba e avaliar a produção e purificação parcial de enzimas celulolíticas.

Fundamentação Teórica

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. A cultura da mandioca

2.1.1. Origem e difusão

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta dicotiledônea, arbustiva, de crescimento perene e pertencente à família *Euphorbiaceae* (Fukuda, 1999; Ávila, 2002). Seu cultivo é realizado amplamente nos trópicos, visando principalmente a alimentação humana, animal e industrialização (Fialho e Vieira, 2011). O produto economicamente mais explorado desta planta é o amido, que é elaborado durante processo de tuberização da raiz, fenômeno em que ocorre também o acúmulo de nutrientes (Souza e Targino, 2009; Ribeiro et al., 2012).

Acredita-se que a origem do cultivo da mandioca tenha surgido entre os indígenas do continente americano, na região Nordeste do Brasil. Tem-se a favor desta hipótese, o fato de ocorrer nesta região grande diversidade de espécies selvagens incluídas no gênero *Manihot* (Nechet e Halfeld-Vieira, 2010). A partir daí, a cultura difundiu-se para o norte do continente chegando a atingir as Antilhas, América Central e Sul da América do Norte. No seu avanço para o Sul, chegou até o estuário do Prata (Dominguez et al., 1982). Outros pesquisadores, no entanto, admitem que houve mais de um ponto de origem e difusão da cultura no continente americano. De acordo com esta teoria, o cultivo irradiou-se e completou sua diversificação, tendo como centro primário a América Latina, no centro do Brasil e região Amazônica e como centro secundário, a região entre a Guatemala e o México (Rogers, 1963; Martin, 1974; Gulick, 1983; Conceição, 1983).

Devido à alta capacidade de adaptação a diferentes ecossistemas, à facilidade de cultivo, rendimento e às variadas formas de utilização, a espécie logo passou a ser plantada em todas as regiões tropicais do globo, principalmente naquelas situadas entre os paralelos 30° Norte e 30° Sul (Ávila, 2002; Ribeiro et al., 2012), embora a maior concentração do plantio esteja entre as latitudes 15° Norte e 15° Sul. Com relação ao continente americano, seu cultivo estendeu-se amplamente, com exceção somente do Canadá. Esta espécie também não é cultivada na Europa (Conceição, 1983; Souza, 2009).

2.1.2. Importância Econômica da cultura

2.1.2.1. Alimentação humana

A mandioca apresenta-se na forma de tuberosa amilácea com grande importância social, contribuindo no auxílio da sobrevivência de significativa parcela da população de baixa renda, como fonte alimentícia, e como recurso econômico da agricultura familiar (Sousa e Targino, 2009; Foloni et al., 2010; Fialho e Vieira, 2011). É uma das principais fontes energéticas, demandada por um mercado de mais de 500 milhões de pessoas em mais de 80 países, a maioria em desenvolvimento, onde é cultivada em pequenas áreas com baixo suporte tecnológico e organização empresarial (Pinto, 2010; Ribeiro et al., 2012). Outro motivo pelo qual esta cultura é explorada deve-se principalmente à sua rusticidade e ao grande valor calórico. A mandioca também destaca-se entre as amiláceas pela grande área plantada e por suas diversas utilidades (Oliveira, 2007; Souza, 2009; Fialho e Vieira, 2011).

No Brasil, a mandioca é cultivada em todas as regiões. Nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste, os plantios tecnificados destinam-se às provisões das indústrias de farinha e fécula, enquanto no Norte e Nordeste, a produção é quase toda destinada à elaboração de farinha artesanal, enquanto a mandioca mansa (macaxeira) é utilizada diretamente na alimentação humana (Souza, 2009; Fialho e Vieira, 2011).

2.1.2.2. A mandioca na alimentação animal

A mandioca também tem sido usada como alimento animal. Esta atividade prevalece principalmente em regiões climáticas de precipitações irregulares e concentradas em poucos meses do ano, como por exemplo, no semi-árido brasileiro. Nas propriedades agrícolas destas áreas, a mandioca apresenta três componentes de interesse comercial e com valor de mercado: a) a parte aérea, a qual pode ser aproveitada na alimentação animal; b) as raízes, na alimentação humana, animal ou industrialização e c) as manivas para o replantio (Sousa, 2009; Fialho e Vieira, 2011).

Tanto as raízes como a folhagem são produtos primários que podem ser aproveitados na nutrição animal. Como exemplos destes, citam-se o feno da parte aérea (folhagem triturada e seca ao sol), a raiz fresca (macaxeira); a raspa integral (pedaços de raiz secos ao sol) ou farinha integral. Os subprodutos provenientes dos processos de

industrialização apresentam igualmente potencial alimentar para animais. Os mais comumente explorados deste gênero são a raspa residual (subproduto da raiz triturada após a retirada do amido); o farelo de farinha de mesa (derivado da fabricação da farinha de mesa); a farinha de varredura e silagem de mandioca, bem como da mandioca triturada (Almeida e Ferreira Filho, 2005; Fialho e Vieira, 2011).

2.1.2.3. A mandioca na indústria

A cultura da mandioca apresenta grande importância para a indústria brasileira, em virtude do seu papel na transformação em farinha e fécula e da larga exploração em uma variedade de utilidades neste setor (Pinto et al., 2010). O produto mais largamente explorado dessa cultura é o amido. Este polissacarídeo na forma em que é produzido pela mandioca apresenta características físico-químicas adequadas para seu aproveitamento industrial (Aplevicz e Demiate, 2007; Anjos et al., 2011).

Além da sua grande relevância nutricional, o amido da mandioca pode ser utilizado em outros setores econômicos da indústria, tais como indústria têxtil, indústria de papel, além das indústrias farmacêuticas e alimentícias (Nunes et al., 2009). Na indústria siderúrgica, está envolvido no processo de flotação de minério de ferro (Foloni et al., 2010).

No Brasil, dois terços da fécula de mandioca produzida são utilizados pelo setor alimentício na forma nativa (Cereda, 2002). Nas indústrias agroalimentícias, o amido e derivados são bastante utilizados. Em relação à fécula derivada da mandioca, 69% é destinada ao uso alimentício, em produtos cárneos, macarrões, sobremesas, pães, biscoitos, molhos, sopas e balas (Franco et al., 2001; Anjos et al., 2011). Também são aproveitados como ingredientes, componentes básicos dos produtos ou aditivos adicionados em baixas quantidades para melhorar a fabricação, aparência ou conservação (Cereda, 2005). O restante desse produto vem sendo usado como matéria prima para atividades industriais nos setores químico, alimentar, têxtil, papel e papelão (Pinto et al., 2010).

2.2. Doenças da cultura da Mandioca

Assim como em outras culturas agrícolas, a mandioca pode ser acometida por várias doenças. Os fatores epidemiológicos gerais para a manifestação destas são a presença do patógeno causador da doença, condições ambientais favoráveis às infecções e

variedade de mandioca suscetível ao patógeno (Takahashi, 2004). Outros fatores que podem contribuir para processos infectivos e persistência dos patógenos são a falta de controle eficiente quando da presença da doença, ausência de tratamentos culturais, tradicionalismo dos agricultores e plantio de material vegetativo infectado (Takahashi, 2004; Oliveira et al., 2008).

Vários fatores influenciam o decréscimo da produtividade agrícola da mandioca, dentre estes, doenças provocadas por fungos, que ocorrem desde o comércio das manivas para plantio, e perduram até a pós-colheita (Cavalcanti, 2001; Mattos et al., 2002; Oliveira et al., 2008; Vidal et al., 2009)

No tocante às doenças da cultura da mandioca a nível nacional, destacam-se como as mais importantes a podridão radicular, bacterioses, superbrotamento, superalongamento e viroses (Mattos et al., 2002; Oliveira et al., 2008).

2.2.1. Levantamentos realizados no Brasil

No Acre, na região do Alto Juruá, Neves et al. (2009) verificaram a ocorrência de várias doenças com grande incidência, entre elas, manchas foliares provocadas pelo parasitismo de *Cercosporidium henningsii* e *Phaeoramularia manihots*, antracnoses e cancos nas hastes, por *C. gloeosporioides* e podridão radicular, causadas por *Fusarium* sp. Ainda nesta localidade, Ferreira et al. (2012) observaram mais tarde, a manchas foliares causadas por *P. manihots* e *C. henningsii* em todos os estágios de desenvolvimento do vegetal. Na mesma região, no Norte do país, no Estado de Roraima, Nechet e Halfeld-Vieira (2010) identificaram *C. henningsii*, *Cercospora vicosae* e *Sclerotium rolfsii*, sendo o último, agente causal da murcha-de-esclerócio.

Anjos et al. (2011) citaram *C. henningsii*, *C. vicosae*, *C. gloeosporioides* e *S. rolfsii*, como principais doenças da região do Cerrado, além de *Armillariella mellea* e *F. solani*, agentes causais da podridão seca e *F. moniliforme* e *F. oxysporum*, agentes da podridão mole.

Poucos são os estudos envolvendo a identificação de fungos como potenciais agentes infecciosos da mandioca no Estado da Paraíba e registrou-se que a maioria dos agentes causadores era integrantes do reino Chromista (Melo e Tokeshi, 1980; Lopes e Melo, 1988). Embora este Estado se destaque como um dos principais produtores de mandioca do Nordeste, as perdas atuais desta cultura poderiam ser atenuadas, levando-se em consideração os problemas parasitários associados a estas perdas. Estes problemas por

sua vez, poderiam ser evitados, realizando-se o levantamento dos agentes etiológicos. Segundo Fernandes et al. (2006), a importância da rápida e correta identificação dos agentes patogênicos presentes em diferentes culturas apresenta-se como ferramenta primordial para o estabelecimento do correto tratamento a ser empregado, possibilitando a recuperação da cultura, e diminuição dos prejuízos causados pelas doenças. Outra vantagem em se conhecer estes agentes biológicos é descobrir sua potencialidade biotecnológica, uma vez que podem servir de fontes de fácil aquisição para elaboração de produtos de valor agregado, como a produção de enzimas.

2.2.2. Doenças foliares

Os fungos causadores de doenças foliares para esta cultura são dispersos pelo vento e água, se estabelecendo melhor nestes tecidos durante os períodos chuvosos (Lozano, 1989). Como ocorre em outros vegetais, o ataque das folhas ocasiona a redução da área fotossintética podendo reduzir o teor de amido nas tuberosas (Teri et al., 1981; Massola e Bedendo, 2005).

São descritos na literatura vários fungos causadores de doenças foliares. As espécies dos gêneros *Cercospora*, *Cercosporidium* e *Phaeoramularia* causam manchas foliares, as quais são designadas mancha parda e branca (Figura 1), enquanto *C. gloeosporioides*, *Uromyces manihotis* e *Oidium manihotis* são os agentes da antracnose, ferrugem e oídio, respectivamente (Massola e Bedendo, 2005).



Figura 1. Mancha parda (A) e Oídio (B) em folhas de mandioca (Fonte: Nechet e Halfeld-Vieira (A), 2010; Anjos et al. 2011) (B).

Em um levantamento das doenças fúngicas realizado no Estado do Maranhão, Sousa e Dias (1991) registraram que a mancha parda grande (*C. vicosae*), ocorreu com maior incidência no período chuvoso, enquanto que a mancha parda pequena (*C. henningsii*), no período seco, seguida de outras doenças, como a mancha branca (*P. manihotis*).

Ferreira et al. (2012) registraram as principais doenças associadas à cultura da mandioca em três municípios do Acre: Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Rodrigues Alves, na região do Alto do Juruá. Nesses municípios, houve o predomínio de cercosporioses causadas por *P. manihotis* e *C. henningsii* para todos os estágios de desenvolvimento das plantas.

No Mato Grosso do Sul, Arias (2005) detectou *C. henningsii*, *C. gloeosporioides* e *Sphaceloma manihoticola*, causando mancha parda, antracnose e superalongamento, respectivamente e *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani* e *Lasiodiplodia theobromae*, sendo os dois primeiros agentes causais de podridão mole e o último da podridão das manivas.

2.2.3. Doenças radiculares

As podridões afetam o sistema radicular e o colo das plantas, comprometendo a absorção de água, nutrientes e interferindo no crescimento normal da planta (Massola e Bedendo, 2005).

Hilloks e Wydra (2002) citaram dez espécies de fungos fitopatogênicos (*Botryodiplodia theobromae*, *Armillaria Mellea*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Rosellinia necatrix*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium semitectum*, *Scytalidium lignicola* e *Leptoporus lignosus*). Concernente aos fungos, os sintomas reflexos manifestados pelo ataque dos patógenos da doença são murcha e queda de folhas, enquanto o sintoma direto é o apodrecimento progressivo dos tecidos radiculares.

Entre os agentes causadores da podridão radicular, citam-se *Phytophthora*, *Pythium sclerotrichum* e fungos integrantes do gênero *Fusarium* (Mattos et al., 2002; Poltronieri et al., 2002; Bandyopadhyay et al., 2006). Poltronieri et al. (2002) observaram no ano 2002, em Santarém, Pará, a primeira ocorrência do fungo *F. solani*, o qual causou a morte de 30% de mudas de mandioca. Em estudos realizados em Camarões, no continente africano, Bandyopadhyay et al., (2006) registraram que 30% das tuberosas apodrecidas de plantas de 12 meses de idade foram infectadas por *Fusarium* spp. Estas espécies representaram 25%

de todos os fungos isolados observados. Outros fungos detectados foram *Lasiodiplodia theobromae* e *Armillaria* spp.

No Estado de Maranhão, Serra *et al.* (2009) registraram a ocorrência de *Scytalidium lignicola*, importante patógeno que causa a podridão negra em raízes e caule (Figura 2). O mesmo agente patogênico foi também registrado recentemente no Estado de Pernambuco (Notaro *et al.*, 2013).

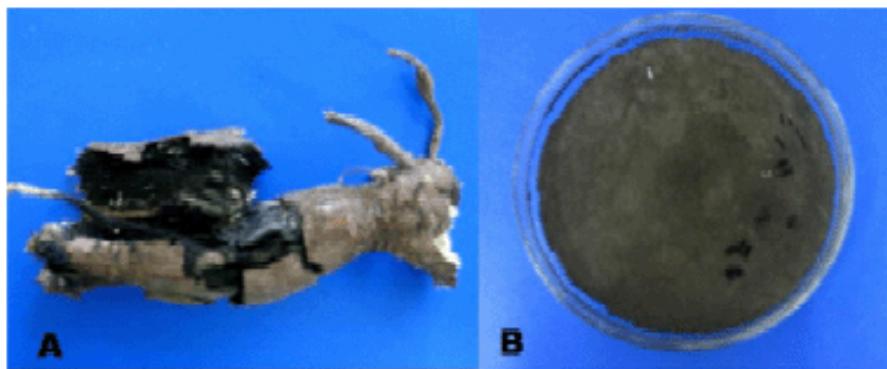


Figura 2. Podridão negra na raiz de mandioca causada por *Scytalidium lignicola* (A). *Scytalidium lignicola* cultivado em meio BDA (B) (Fonte: Serra *et al.* (2009).

2.3. Enzimas Celulolíticas

A celulose é um dos polissacarídeos constituintes da parede celular e que fornece estrutura e organização às células vegetais, algas e oomicetos (Makut e Godiya, 2010). É também o biopolímero mais abundante na natureza (Marasimha *et al.*, 2006). Devido à necessidade da sua biodegradação, vários micro-organismos, dentre estes bactérias e fungos, produzem um complexo enzimático que, agindo de forma sinérgica, clivam de modo eficiente as ligações β -D-1,4. Essas ligações conectam as unidades monoméricas da celulose até que se adquira possibilidade de absorção ou se alcance o produto final da atividade hidrolítica, a molécula de glucose (Sukumaran *et al.*, 2005; Silva, 2008; Eida *et al.*, 2011).

O complexo celulolítico sintetizado por fungos é constituído por três enzimas: as endoglucanases, as celobiohidrolases (exoglucanases) e as β -glucosidases. Conforme o modelo de sinergismo “endo-exo”, estas enzimas agem da seguinte forma: as endoglucanases atuam randomicamente ao longo da cadeia e produz novos sítios de ataque terminais para as celobiohidrolases (Figura 3). Estas agem como exo-enzimas, no fim das cadeias e liberam celobiose como produto da sua ação hidrolítica. As β -glucosidases,

finalmente, concluem o processo hidrolisando a celobiose e outros oligossacarídeos à glucose (Zandona Filho, 2001; Okunowo et al., 2010)

Embora ampla variedade de fungos sintetizem celulases, poucos são capazes de produzi-las em quantidade suficiente para solubilizar a celulose cristalina (Lynd et al., 2002; Eida et al., 2011). Segundo Gomes (2007), os fungos que decompõem as substâncias celulósicas, geralmente habitam o solo, onde colonizam e decompõem raízes e restos vegetais.

O principal meio para se obter a produção das celulases e das demais enzimas extracelulares hidrolíticas se dá pela indução, estimulando a sua secreção pelos organismos em meios sintéticos, contendo substratos celulósicos (Kubicek et al., 1993).

As dificuldades encontradas para aplicação industrial do potencial das celulases são o custo oneroso e a baixa produção dessas enzimas pelos micro-organismos (Kang et al., 2004). No entanto, tem-se verificado a realização de pesquisas que buscam avaliar a habilidade de diferentes micro-organismos em hidrolisar a celulose e hemicelulose (Haltrich et al., 1996).

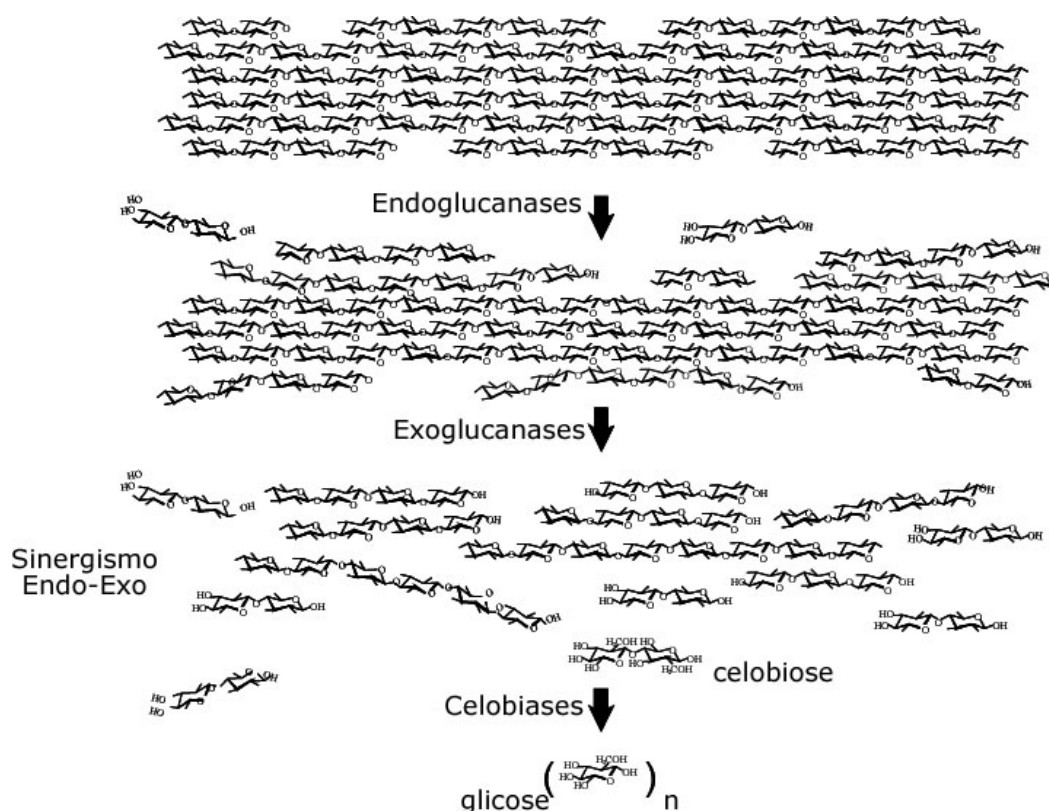


Figura 3. Mecanismo de ação das enzimas do complexo celulolítico (Fonte: Martins, 2005).

2.3.2 Complexo Celulolítico

2.3.2.1. Endoglucanases

As endoglucanases (endo-1,4- β -D-glucana glucanahidrolase ou carboximetilcelulase; EC 3.2.1.4, celulase) atuam catalisando a hidrólise interna nas ligações β -glucosídicas de modo randômico nas cadeias de celulose (Esposito e Azevedo, 2010).

2.3.2.2 Exoglucanases

As exoglucanases, também conhecidas por celobiohidrolases (exo-1,4- β -D-glucana celobiohidrolase; EC 3.2.1.91) atuam como exo-enzimas na cadeia do polissacarídeo, tendo seu sítio ativo nas extremidades redutoras e removem como produto da ação celobiose, glucose e celotriose (Zandona, 2001).

2.3.2.3. β -glucosidases

As β -D-glucosidases (β -D-glucosídeo-glucohidrolase; EC 3.2.1.21) catalizam a hidrólise da celobiose - dímero de glucoses resultante da ação das endoglucanases e das celobiohidrolases - em glucose e removem a glucose não redutora de terminais de celodextrinas. Devido à solubilidade e natureza química do substrato (cadeias de 2 até 6 unidades de glucose), o grupo não é considerado estritamente uma celulase, mas sim, componente essencial do complexo sinérgico celulolítico (Santos, 2008).

Além de atuar na última fase do processo de hidrolização da celulose em glucose, estas enzimas removem a celobiose do meio reacional, a qual age como potente inibidor competitivo das celobiohidrolases. A ausência das β -glucosidases então, reduz o processo de despolimerização da celulose (Almeida, 2009).

2.4. Aplicações das celulases

2.4.1. Indústria têxtil

As enzimas celulolíticas desempenham eficientemente o processo de amaciamento de tecidos como o jeans e o brim (Almeida, 2009). Tal processamento, denominado *bio-stoning*, confere maior conforto aos consumidores e consiste da ação hidrolítica enzimática nas pequenas fibras da superfície do tecido.

A atividade dos coquetéis enzimáticos explorados, ricos principalmente em endoglucanases, ocasiona em alguns casos, a perda do índigo e gera um desbotamento indesejável. Tal fenômeno é decorrente da afinidade de algumas enzimas pelo índigo, como as que apresentam caráter ácido. Porém, a substituição destes catalisadores por outros de natureza básica ou neutra e a lavagem com proteases após a lavagem anterior com celulases tem resolvido esta problemática de reposição (Miettinen-Oinonen, 2004).

2.4.2. Hidrólise de resíduos lignocelulósicos

Com a incessante demanda das atividades agroindustriais nas últimas décadas, incrementou-se o acúmulo de resíduos gerados como subprodutos (Singh et al., 2009). Ao mesmo tempo, observa-se uma crescente busca de formas de reutilização destes resíduos, uma vez que são recursos orgânicos renováveis e possuem baixo custo como matéria prima (Martin e Thomsen, 2007; Castro e Pereira Júnior, 2010). Devido à dificuldade de degradação da celulose e de outros compostos, além de gerar transtornos ao ambiente, constitui-se perda de recursos, uma vez que sua biomassa é desperdiçada (Silva, 2008).

Os resíduos lignocelulósicos constituem uma alternativa para a geração de energia devido à sua grande disponibilidade na natureza (Bon et al., 2008). Atualmente, o aproveitamento destes recursos concentra-se nas indústrias de papel, proteína para ração, e de alimentação humana, além estarem envolvidos na geração de energia através da produção de etanol (Ballesteros, 2001; Basso et al., 2010).

Segundo Silva (2008), a utilização da biomassa lignocelulósica, originada de resíduos da agricultura, reflorestamento e de resíduos sólidos de esgotos, podem trazer economia na produção de biocombustíveis e outros produtos químicos, bem como a redução de dejetos. Como exemplo das fontes destes recursos, o autor cita os resíduos da indústria vinícola, da cultura do arroz, da casca da acácia negra e do bagaço da cana-de -

açúcar. Diversos processos têm sido desenvolvidos para o aproveitamento destes resíduos, visando sua transformação em produtos químicos com alto valor agregado tais como álcool, enzimas, ácidos orgânicos e aminoácidos (Pandey et al., 2000).

Entre essas investigações científicas, destacaram-se nas últimas décadas, estudos envolvendo a conversão de materiais lignocelulósicos em etanol. Tal conversão inclui dois processos: hidrólise da celulose a açúcares redutores, e a fermentação dos açúcares em etanol. A hidrólise é usualmente catalisada por enzimas celulolíticas, enquanto a fermentação é realizada por leveduras ou bactérias (McMillan, 1994).

Na hidrólise da celulose que constitui o material vegetal dos resíduos, as três enzimas do complexo celulolítico atuam conjuntamente (Philippidis et al., 1993). De acordo com Castro e Pereira Júnior (2010), a utilização de celulasas na hidrólise da celulose de resíduos vegetais agroindustriais ocorre em condições mais amenas de pressão, temperatura e pH do que os processos químicos convencionais, além de operar em elevada especificidade, o que evita a possibilidade de ocorrência de substâncias tóxicas (furfurais e derivados de lignina) prejudiciais às células fermentativas. Os autores explicam que, embora o custo de produção dos biocatalisadores ainda seja alto, devem ser considerados fatores de economia para o processo de aproveitamento destes recursos, tanto do ponto de vista energético como metalúrgico, uma vez que os equipamentos podem ser confeccionados com materiais menos nobres.

2.4.3. Indústria de polpa de celulose e papel

A aplicação mais importante das enzimas celulolíticas é na indústria de polpa de celulose e papel. Elas estão presentes em diversas fases e processos da elaboração dos produtos papelíferos, dentre estes, no bio-clareamento da polpa, na produção da polpa dissolvida, no tratamento de água residual e reciclagem dos resíduos do papel (Gübitz et al., 1998; Bajpai, 1999).

Quanto à produção do papel reciclado, as enzimas celulolíticas atuam no processo de despigmentação da matriz celulósica, propiciando o aumento da drenagem da água presente na polpa de papel para formação das folhas (Pelach, et al. 2003 Silva, 2008).

2.4.4. Indústria de bebidas

Na indústria alimentícia, as celulases integram o grupo de enzimas conhecido como de maceração. Neste grupo estão presentes enzimas como as xilosidases, xilanases, mananases e arabinases, cuja principal exploração dá-se nos processos de extração e clarificação de sucos de frutas e extração de óleos de sementes (Almeida, 2009).

Como resultado do processamento para obtenção dos sucos, após a etapa de maceração das frutas em polpa, adquire-se uma fase líquida e uma sólida do material. A última fase não é aproveitada. As celulases então, juntamente com as outras enzimas de maceração são aplicadas a fase líquida, para incrementar o rendimento do processo e aumentar o valor nutricional dos sucos a partir da liquefação do tecido vegetal (Bhat, 2000; Haros *et. al*, 2002). Estas enzimas atuam também nos processos de filtração e extração dos pigmentos dos frutos (Mussato et al., 2007).

2.4.5. Indústria de alimentação animal

As celulases são exploradas consideravelmente na indústria de alimentação animal. Estes biocatalizadores, em conjunto com as xilanases, auxiliam a hidrólise de polissacarídeos dificilmente assimiláveis no processo de digestão de animais monogástricos (Cunha, 1999; Silva, 2008).

No tocante à ruminantes, a ação conjunta das celulases, pectinases e hemicelulases incrementam a qualidade da digestão de plantas forrageiras, bem como promovem melhoria da qualidade e digestibilidade de rações (Bhat, 2000; Silva, 2008).

2.5 Importância dos fungos filamentosos

Os fungos filamentosos têm sido utilizados na produção de alimentos, bebidas e fármacos há muitos séculos, todavia, a exploração destes organismos no campo de produção enzimática só se tornou efetiva após o avanço do conhecimento de sua fisiologia, bioquímica e genética, assim como, após a modernização das técnicas de biologia molecular e de melhoramento genético (Bon et al., 2008; Baptista et al., 2012).

Fungos são seres vivos heterotróficos de nutrição absorptiva. Assim, para obterem energia para seu desenvolvimento e execução dos processos biológicos, atuam como biodegradadores naturais de macromoléculas orgânicas insolúveis e de alto peso molecular

disponíveis no meio (polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lignina e lipídios). Para absorverem os nutrientes constituintes de tais moléculas na forma monomérica e de baixo peso molecular, é necessária a secreção de enzimas que atuem na hidrólise e decomposição daqueles polímeros, pois só assim os nutrientes podem atravessar a parede celular e a membrana plasmática (Alexopoulos et al. 1996; Esposito e Azevedo, 2010).

Devido a esta potencialidade de produção, além da relativa facilidade de indução e excreção, bem como da sua necessidade da hidrólise de proteínas e polissacarídeos em aminoácidos e açúcares, os fungos têm contribuído significativamente no campo da produção de enzimas (Carlile et al, 2001; Lin e Tanaka, 2006; Santos, 2011). As enzimas fúngicas oriundas destes processos vêm sendo empregadas em diversos setores da indústria, tais como no processamento de alimentos, produção de detergentes, indústria têxtil, couro e papel, indústria farmacêutica, bioquímica, biologia molecular, aplicações biomédicas e recentemente na química fina (Ângelo, 2010). No processamento de alimentos, por exemplo, eles estão envolvidos no processamento de frutas e legumes, clarificação de sucos de frutas, extração de cafés e produção de adoçantes. Entre as espécies que apresentam grande potencial para aplicação industrial estão *Aspergillus awamori*, *A. niger*, *A. oryzae*, *Cephalosporium acremonium*, *Humicola insolens*, *Mucor miechie*, *Penicillium chrysogenum* e *Trichoderma reesei* (Bon et al., 2008).

Fungos filamentosos também apresentam versatilidade em relação às condições ambientais, uma vez que alteram facilmente suas atividades metabólicas em resposta a variações das condições físico-químicas de um ambiente (Alexopoulos et al., 1996; Kavanagh, 2005). Outra vantagem destes organismos em comparação às bactérias e leveduras deve-se a elevada capacidade de expressão, síntese e excreção de proteínas heterólogas e de realizar processos bioquímicos moleculares pós-traducionais como a glicosilação e a formação de pontes dissulfeto (Bon et al., 2008).

Segundo Bon et al. (2008) modificações genéticas têm sido empregadas para o melhoramento da capacidade de produção de enzimas nesses organismos, uma vez que o rendimento da produção em fungos selvagens é geralmente baixo. Dentre as técnicas empregadas, as principais são a indução aleatória de mutações, seleção de fenótipos desejados e o estabelecimento de fungos doadores de genes e de hospedeiros para expressão heteróloga de genes selecionados. Segundo os autores, as estratégias da célula, dependendo do sinal, para produção enzimática são: 1) Capacidade de sentir e possibilitar a entrada de matérias primas disponíveis do meio externo; 2) Potencial de alterar ou adicionar funções por indução ou modulação; 3) Capacidade de mudar a maquinaria

celular, para que possa lidar com situações desejadas; 4) Gerenciamento e alterações em nível celular; 5) Capacidade de efetuar operações metabólicas necessárias a sobrevivência, crescimento e competição; 6) Produzir compostos secundários indesejáveis para mecanismos de competição; e 7) Inativar-se na forma de esporos quando encontra-se em condições ambientais adversas.

Além dos conhecimentos relacionados aos fungos, as informações adquiridas acerca da natureza das enzimas como a produção, importância e utilização pelos fungos possibilitam a exploração destes biocatalizadores em inúmeros processos industriais e ambientais. Este fator é importante economicamente, uma vez que são muitos os usos industriais e farmacêuticos.

2.5.1. Fungos produtores de enzimas celulolíticas

A maioria das enzimas celulolíticas industriais são produzidas por fungos filamentosos, uma vez que estes organismos são eficientes produtores de enzimas hidrolíticas (Gomes, 2007; Silva, 2011). Os fungos decompositores de substâncias celulósicas geralmente habitam o solo, onde colonizam os vegetais nas suas raízes e resíduos, desempenhando significativa participação na reciclagem de nutrientes. Entre estes fungos encontram-se diversas espécies de *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Trichoderma* (Lynd et al., 2002; Zúniga, 2010; Santos, 2011).

Os fungos filamentosos possuem diferentes níveis de resistência a condições ambientais extremas. Habitats e nichos também têm sido estudados, dentre estes, os fungos termofílicos, devido a sua estabilidade térmica. A vantagem em se explorar estes organismos é sua capacidade de produção de celulasas em condições extremas de altas temperaturas compatíveis a diversas exigências de procedimentos industriais. As principais espécies que têm sido estudadas são *Chaetomium thermophile*, *Thermoascus aurantiacus*, *Talaromyces emersonii*, *Sporotrichum thermophile* e vários integrantes do gênero *Humicola* (Maheshwary et al, 2002). Estes organismos também produzem celulasas resistentes ao pH de alta alcalinidade ou acidez (Silva, 2008). Fungos degradadores de celulose presente no trato digestório de ruminantes também têm sido pesquisados, como a espécie *Neocalimastix frontalis* e outros Chytridiomycota como os dos gêneros *Caecomyces*, *Piromyces*, *Orpimimycetes* e *Ruminomyces* (Teunissen e Op den Camp, 1993; Singh e Hayashi, 1995).

Os fungos endofíticos, em condições favoráveis, estabelecem relações mutualistas com as plantas e, para colonizar seus tecidos, produzem enzimas que degradam a parede celular dos hospedeiros, necessitando dentre as enzimas que catalizam as reações de degradação, as celulasas. Dos endofíticos isolados, os gêneros *Monotospora*, *Fusicoccum* e *Periconia* apresentam espécies que foram registradas como produtoras de celulasas e lignases (Rondon, 2003; Harnpicharnchai et al., 2009).

Nas últimas décadas, alguns fungos têm sido explorados comercialmente na produção de celulasas e xilanases industriais, o gênero *Trichoderma* constitui o grupo mais estudado e explorado, devido ao seu alto nível de expressão e secreção, além de versatilidade nos processos industriais (Almeida, 2009). Os integrantes deste táxon são fungos filamentosos mesofílicos e saprófitos edáficos (Santos, 2008). Entre as espécies mais importantes encontram-se *T. reesei*, *T. koningii* e *T. lignorum*.

O gênero *Aspergillus* é o segundo grupo mais pesquisado e explorado, embora produza em maior quantidade enzimas como pectinesterase, endo e exopoligalaturonase e pectina liase (Maciel et al., 2013). Também é um produtor de exo e endoglucosidases e de β -glucosidases que apresentam elevadas atividades (Castro et al., 2010). Duas espécies de expressão são *Aspergillus niger* e *A. heteromorphus* (Bhat, 2000; Santos, 2008; Singh et al., 2009). Este grupo é constituído por fungos de hábito sapróbio e adaptados na degradação de moléculas complexas de restos de vegetais depositados nos solos (De vries, 2003). Rodríguez-Zúñiga et al. (2011) observaram que as atividades de celulase total e endoglucanase de *A. niger* em farelo de trigo, obtidas após 72 horas de cultivo, alcançaram os índices de: 0,4 e 21,0 U/g, respectivamente, enquanto Devi e Kumar (2012), obtiveram 3.9 U/g de celulase total.

Em relação ao gênero *Penicillium*, o número de investigações aumenta, porque o grupo apresenta grande potencial biotecnológico, produzindo muitas enzimas em quantidades adequadas. Grande número de isolados deste grupo são capazes de produzir enzimas celulolíticas (Lynd et al., 2002), porém nem todos apresentam o mesmo potencial (Silva, 2008). As duas espécies mais estudadas são *P. funiculosum* e *P. iriensis* (Bisaria e Ghose, 1981; Castro et al., 2010; Maeda et al., 2011).

Outros gêneros de fungos utilizados na produção destas enzimas são *Schizophyllum*, *Chaetomium* e *Humicola* (Bortolazzo, 2011). Quanto às leveduras, espécies de *Trichosporium* e *Saccharomyces* também são utilizadas como produtoras de celulasas (Stevens e Payne, 1977; Castro, 2006; Ferreira, 2010).

2.5.2. Fungos Fitopatogênicos produtores de enzimas

Fungos fitopatogênicos produzem grande variedade de enzimas, as quais são necessárias durante os processos de penetração e colonização do tecido parasitado (Walton, 1994; Mendgen Hahn, 1996). Algumas delas são capazes de degradar os componentes da parede celular (Ryan, 1973; Baer e Gudmestad, 1995), enquanto outras estão envolvidas na degradação de materiais celulares e transporte de nutrientes para a hifa (Bateman e Basham 1976). Vários estudos têm sido realizados buscando-se enumerar e caracterizar enzimas produzidas durante o processo de colonização do tecido hospedeiro e ao mesmo tempo avaliar seu potencial em aplicações biotecnológicas (Bastos, 2005; Moreira, et al., 2005; Marchi, et al., 2006; Fernandes, et al., 2007). Maia et al. (1999) constataram a produção de lipase pelo fungo fitopatogênico *Fusarium solani*. Lima Filho et al. (2003), trabalhando com isolados de *Colletotrichum* causadores de antracnose em folhas de caju, manga, maracujá, mamão e banana, verificaram também a produção de amilase, lipase, protease e celulase.

Mais recentemente, a partir do estudo de isolados fúngicos de pinha (*Annona squamosa*), manga fruto (*Mangifera indica*), manga folha (*Mangifera indica*), graviola (*Annona muricata*), berinjela (*Solanum melongena*) e eucalipto (*Eucalyptus citriodora*), Bauermeister et al. (2009) verificaram a produção de lipase e lacase por *Lasioidiplodia theobromae* em óleo de mamona (*Ricinus communis*) como fonte de carbono. Bueno et al. (2009), também constataram a produção das enzimas extracelulares amilase, lipase, celulase, caseinase (protease) e lacase (oxidase) por *Fusarium solani*, agente causal da podridão do colo do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* flavicarpa).

Quanto aos estudos biotecnológicos dos fungos presentes nos tecidos da mandioca *Manihot esculenta*), Rondon (2003) destacou a ação amilolítica de fungos endofíticos isolados das raízes representados pelos gêneros *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Phomopsis*, e *Phyllosticta*. A investigação das espécies de fungos fitopatogênicos serviria então como material complementar ao presente estudo relacionado ao potencial biotecnológico desses fungos, enfocando o potencial de outros grupos de fungos relacionados a esta euforbiacea.

Os fungos fitopatogênicos considerados eficientes produtores de celulasas relatados recentemente são *F. graminearum*, *F. oxysporum* e *Myrothecium roridum* (Kikot, et al., 2010; Okunowo et al., 2010; Ramanathan et al., 2010; Kaushal et al., 2012).

2.6. Fermentação Submersa

Entre as principais estratégias para produção enzimática por fungos, destacam-se os processos fermentativos. Existem fundamentalmente dois processos de fermentação quanto a natureza física do meio: a fermentação em estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FSm) (Fernandes, 2006; Esposito e Azevedo, 2010).

A FSm utiliza um meio de cultura líquido, já a FES baseia-se na utilização de substratos sólidos com baixas porcentagens de água em sua composição (Pinheiro, 2006).

Embora a FES seja amplamente realizada na Ásia, especialmente nos processos de produção de alimentos levedados a base de arroz (*Oryza sativa*) (Kavanagh, 2005; Fernandes, 2006; Martin, 2010), a FSm é mais largamente utilizada para produção de enzimas em todas as escalas de produção, devido aos seguintes fatores: melhor controle de alguns parâmetros do processo como pH e crescimento celular; além de maior facilidade recuperação de enzimas extracelulares, bem como da determinação da biomassa (Fernandes, 2006b; Oliveira et al., 2011). Castro e Pereira Júnior (2010), comparando os dois tipos de fermentação, citam outras vantagens como 1). A purificação das moléculas alvo é facilitada pela ausência ou baixa concentração de partículas do substrato; 2). O alto teor de água e a natureza diluída do meio facilitam o controle da temperatura de cultivo, reduzindo a degradação do produto, em especial enzimas com baixa termoestabilidade e 3). Os processos difusionais e de mistura são facilitados devido ao caráter homogêneo do sistema.

Devido a estes fatores, no que diz respeito à produção de celulasas industriais, aproximadamente 90% dos preparados enzimáticos são obtidos por FSm, realizada na maioria das vezes, por fungos e micro-organismos geneticamente modificados (Singhania et al., 2010; Rodríguez-Zúñiga et al., 2011).

Devido ao amplo uso, estes processos de fermentação são bastante estudados e aplicados além de apresentarem diversas formas de condução e aplicação que os classificam em processos descontínuo, descontínuo alimentado, contínuo e semicontínuo (Schimidell e Facciotti, 2001).

Segundo Ângelo (2010), o processo de preparação enzimática a partir da FSm consiste inicialmente na seleção de um micro-organismo e sua inoculação em um biorreator, o qual contém o meio nutritivo adequado para produção e indução enzimática. Neste biorreator, estabelecem-se as condições físico-químicas e operacionais necessárias para produção da enzima requerida. Após o término da fermentação, ocorre o processo de

separação da enzima do caldo fermentado, o qual é realizado por processos como centrifugação, filtração, precipitação e purificação.

O avanço das técnicas deste processo tem possibilitado a obtenção de diversos produtos, dentre estes, uma grande variedade de metabólitos como enzimas, antibióticos, ácidos orgânicos e proteínas recombinantes (Papagianni, 2004; Grimm et al., 2005). No tocante à eficiência do cultivo de fungos em meio submerso, é necessário o estudo preliminar de diversas variáveis como, por exemplo, os constituintes físico-químicos do meio, a composição dos nutrientes, pH, temperatura, taxa de oxigênio dissolvido e as forças mecânicas que exercem mudanças na formação do micélio. Dentre as desvantagens de aplicação estão a facilidade de formação de *pellets*, lento crescimento, possibilidade de agregação micelial, múltiplos modelos matemáticos e dinâmicas de crescimento, fragmentação do micélio e até ausência de elaboração do produto de interesse biotecnológico (Silva, 2008).

2.7. Substratos para produção de celulases

Uma grande diversidade de materiais vegetais tem sido estudada como substratos para produção de enzimas celulolíticas, dentre estes, os principais são os resíduos das atividades agroindustriais. Estes recursos são os mais acessíveis, baratos, abundantes e largamente encontrados (Rocha, 2010). Além destas vantagens, sua estrutura polimérica insolúvel em água, composição química e riqueza em carbono e nitrogênio, contribuem como suporte para o crescimento de micro-organismos (Correia, 2004).

A aquisição de substratos de baixo custo e que induzam significativamente a produção de celulases contribui para diminuição do custo do processo de produção destas enzimas, o que torna viável a exploração de diversas fontes compatíveis oriundas das atividades agroindustriais e florestais. Por outro lado, considera-se o alto valor agregado dos resíduos lignocelulósicos acumulados destas atividades, uma vez que podem ser aproveitados em diversas aplicações biotecnológicas, dentre estas, a transformação da biomassa lignocelulósica em biocombustíveis, como o bioetanol (Menezes et al., 2009; Singh et al., 2009). Recentes investigações científicas tratam de avaliar as propriedades destes compostos, investigando sua viabilidade e seu potencial indutivo de produzir celulases, utilizando determinada espécie e otimizando as condições físico-químicas exigidas (Menezes et al., 2009).

A função dos substratos é servir como fonte única de carbono disponível no meio de cultivo fúngico, agindo então como indutores da produção de enzimas celulolíticas, as quais, por sua vez, possibilitam a estes organismos a aquisição de moléculas de glucose a partir do processo de despolimerização por meio de hidrólise da celulose integrante das paredes celulares vegetais durante o processo fermentativo (Farinas et al., 2008; Singh et al., 2009).

Nos processos fermentativos, a maioria destes substratos não é utilizada da forma bruta em que se encontram na natureza, mas são submetidos à pré-tratamentos, os quais visam melhorar ou ajustar as condições para um melhor aproveitamento pelo fungo. Estes processamentos tornam a estrutura física das partículas mais suscetíveis à penetração das hifas e micélio, propiciando maior acessibilidade aos componentes químicos. Como pré-tratamentos físicos, citam-se a trituração e a moagem dos substratos, os quais resultam na diminuição dos tamanhos das partículas. No pré-tratamento químico, por sua vez, utiliza-se ácidos a altas temperaturas, os quais rompem barreiras internas das partículas e hidrolisam macromoléculas (Mielenz, 2001; Rocha, 2010).

Como foi mencionado anteriormente, a grande maioria dos substratos estudados consiste do aproveitamento de resíduos da atividade agroindustrial. Seguindo-se esta linha, Devi e Kumar (2012) utilizaram para produção de celulasas, pó de madeira e papel celulose, subprodutos da atividade da indústria papel e polpa e obtiveram o valor de 3,9 U/mL do extrato enzimático adquirido a partir do fungo *A. niger* após sete dias de Fsm, a 45 °C e pH 5,0. Farinas et al. (2008) avaliaram a aplicação de bagaço de cana (*Saccharum spontaneum*), bagaço de laranja (*Citrus sinensis*), casca de arroz (*Oryza sativa*) e farelo de soja (*Glycine Max*) e concluíram que o bagaço de laranja e o farelo de soja foram os substratos mais eficientes em termos de produtividade enzimática de celulasas totais também utilizando *A. niger*. Enquanto em determinados trabalhos foram adicionados aos substratos, substâncias orgânicas e inorgânicas ricas em determinados nutrientes, tais como nitrogênio (Narasimha et al., 2006; Rashid et al., 2009; Rocha, 2010). Outros autores aproveitaram o mesmo material de isolamento dos fungos, tais como Herculano et al. (2012), que utilizaram mamona (*Ricinus communis* L.) como substrato, obtiveram atividades máximas por *A. japonicus* URM5620 de β G, FPAse e CMCase de 88,3; 953,4 e 191,6 U/g seca de substrato. As maiores atividades foram observadas à 25° C, 120 h de

Entre as recentes investigações científicas que buscam obter substratos com propriedades adequadas para produção de celulasas, cita-se o estudo de materiais como o bagaço de cana, farelo de trigo e de arroz ou de soja, polpa de maçã ou de café, quirela de

milho, bagaço de cana, abacaxi e pedúnculo de caju (Correia, 2004). O aproveitamento da palha de trigo (*Triticum* spp.), um barato resíduo na Índia, apresentou propriedades eficientes como fonte de carbono para meios de cultivo do fungo *A. heteromorphus* (Singh et al., 2009). No mesmo país, resíduos de aguapés (*Eichhornia crassipes*), que infestam águas poluídas, também foram avaliados como substratos para produção de celulasas por espécies de *Aspergillus* isolados da mesma planta (Talekar et al., 2011).

Capítulo I

LEVANTAMENTO E AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DAS DOENÇAS DA MANDIOCA NO ESTADO DA PARAÍBA¹

RESUMO

Objetivando-se levantar e quantificar a incidência de doenças da mandioca em plantios comerciais no Estado da Paraíba, foram realizadas coletas em 21 municípios de quatro microrregiões do Estado no primeiro semestre de 2011. As doenças detectadas foram mancha parda (*Cercosporidium henningsii*), mancha branca (*Phaeoramularia manihotis*), antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) e podridão mole (*Fusarium oxysporum*). A incidência apresentou-se com variação, sendo os maiores índices constatados nos municípios das microrregiões do Curimataú Ocidental, Sapé e Brejo paraibano. A mancha parda ocorreu em todos os municípios avaliados, seguida da mancha branca, cuja porcentagem de plantas atacadas foi inferior. A antracnose foi detectada em cerca de 70% dos municípios avaliados, porém com incidência reduzida. A maior incidência da podridão causada por *F. oxysporum* foi observada na cidade de Imaculada, microrregião de Serra do Teixeira.

Palavras-chave: Quantificação, etiologia, manchas, podridão, microrregiões

¹ Morais, M.S., Nascimento, L.C., Moreira, K.A., Cavalcanti, M.S., Oliveira, N.T. 2013. Levantamento e avaliação da incidência das doenças da mandioca no estado da Paraíba. Summa Phytopathologica 3: 204-206.

3.1. Introdução

A mandioca é cultivada em todas as regiões do Brasil, tendo-se como maiores produtoras as regiões Norte e Nordeste, com 32,8 e 29,7%, respectivamente (IBGE, 2012). A maior parte da produção nestas regiões é destinada à indústria artesanal de farinha, enquanto as raízes e a folhagem são utilizadas como alimento para animais (Furlaneto et al., 2006). No interior do Estado da Paraíba, a mandioca é uma cultura de subsistência e adquire caráter comercial no litoral, microrregião do Brejo e áreas circunvizinhas (Rodriguez, 2002).

Várias doenças foram registradas causando prejuízos na produtividade desta cultura, como: podridões radiculares, manchas foliares, bacterioses, superalongamento e viroses (Lozano e Booth, 1974). Não foram ainda realizados estudos acerca da identificação de possíveis agentes infecciosos fúngicos da cultura no Estado, sendo assim, o presente trabalho teve então como objetivo, determinar a etiologia das doenças da mandioca em plantios comerciais do Estado da Paraíba e relacionar a incidência com a pluviosidade.

As coletas de dados de campo foram realizadas nos meses de janeiro a junho de 2011 e o levantamento em 21 municípios distribuídos em quatro microrregiões paraibanas (Figura 1). As amostras, constituídas de folhas e raízes sintomáticas, foram enviadas para isolamento e identificação no Laboratório de Fungos Fitopatogênicos da Universidade Federal de Pernambuco. O isolamento dos fungos foi realizado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e câmara úmida, sendo identificados em microscópio óptico com auxílio de literatura especializada (Chupp, 1954; Sutton, 1980). Nos testes de patogenicidade foram utilizadas folhas e raízes de mandioca provenientes da cidade de Imaculada - PB. As folhas foram inoculadas com uma suspensão de 10^6 conídios mL^{-1} e fragmentos radiculares com discos de 10 mm de diâmetro oriundo de culturas de *F. oxysporum* isolado.

Os dados de precipitação pluviométrica acumulada no mês anterior e meses posteriores das coletas em cada município foram fornecidas pelo Laboratório de Meteorologia da Agência Executiva de Gestão de Águas da Paraíba (Figura 1). Para análise estatística, as médias da incidência das doenças nos municípios foram comparadas aplicando-se a análise de variância e o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. O processamento dos dados foi realizado utilizando-se o programa Software SAS, desenvolvido pelo SAS Institute, ano 1992.

3.2. Resultados

As doenças detectadas nos campos agrícolas do Estado da Paraíba foram mancha parda (*Cercosporidium henningsii* Allescher), mancha branca [*Phaeoramularia manihotis* (F. Stevens & Solheim) MB Ellis], antracnose, (*Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *manihotis* Henn (Penn.)) e a podridão mole (*Fusarium oxysporum* Schlent). Os maiores valores de incidência de doenças foram constatados nos municípios pertencentes às microrregiões do Brejo Paraibano, seguida do Curimataú Ocidental e Sapé (Tabela 1).

A mancha Parda ocorreu em todos os municípios estudados (Tabela 1). Outros autores confirmaram também a dispersão da doença em praticamente todos os locais de cultivo (Teri et al., 1981; Lozano, 1989;). Os sintomas desta doença são manchas de 5 a 10 mm de diâmetro, amareladas a pardo-avermelhadas, de formato angular e contornadas por bordas escuras (Lozano e Booth, 1974). Os municípios que apresentaram maior número de plantas afetadas pela mancha parda foram Lagoa Grande, Lagoa Nova e Areia, com 93,15%, 92,75 e 90,10%, respectivamente, pertencentes à microrregião Brejo Paraibano. Houve incremento da doença em consequência do aumento do índice de precipitação do mês anterior à coleta, o que é corroborado por Lozano e Booth (1974) (Figura 1). Nos municípios que apresentaram alta incidência, é possível prever queda de produtividade (Lozano, 1989, Teri et al., 1981).

Tabela 1. Incidências de doenças da mandioca no Estado da Paraíba – 1º semestre de 2011.

	M.P.	M.B.		AC		P.R	
Lagoa Grande	93.15a ¹	Riachão do poço	52.00a	Lagoa nova	43.15a	Imaculada	21.00a
Lagoa Nova	92.75a	Sapé	22.15b	Matinhas	32.50a	Princesa Isabel	11.70b
Areia	90.10a	Lagoa Nova	19.00b	Areia	20.00b	Remígio	0.00c
S. M. de Taipú	88.50a	Areia	15.00c	Jurú	10.00c	Areia	0.00c
Cuité	88.33a	Remígio	12.50c	Teixeira	7.95c	Pilões	0.00c
Lagoa Seca	82.15a	Matinhas	9.70d	Sapé	4.50c	Tavares	0.00c
Sapé	81.50a	Cuité	5.05e	Nova Floresta	3.65c	Jurú	0.00c
S. J. dos Ramos	81.00a	S. J. dos Ramos	2.60e	Pocinhos	3.15c	Teixeira	0.00c
Sobrado	72.70a	S. M. de Taipú	2.35e	S. M. de Taipú	2.50c	Soledade	0.00c
Pilões	65.85a	Imaculada	1.75e	Sobrado	2.00c	Pocinhos	0.00c
Matinhas	56.15a	Soledade	1.65e	Pilões	1.30c	Nova Floresta	0.00c
Imaculada	46.00b	Lagoa Grande	1.65e	Remígio	1.00c	Cuité	0.00c
Teixeira	44.60b	Princesa Isabel	1.40e	Soledade	0.70c	Lagoa Seca	0.00c
Princesa Isabel	13.90b	Pilões	1.30e	Cuité	0.30c	Sapé	0.00c
Remígio	12.00b	Teixeira	1.30e	Princesa Isabel	0.30c	Sobrado	0.00c
Jurú	9.60b	Tavares	1.30e	Lagoa Seca	0.00c	S. M. de Taipú	0.00c
Soledade	9.00b	Pocinhos	0.70e	S. J. dos Ramos	0.00c	Riachão do poço	0.00c
Nova Floresta	8.95b	Sobrado	0.00e	Lagoa Nova	0.00c	S. J. dos Ramos	0.00c
Riachão do poço	4.20b	Lagoa Seca	0.00e	Matinhas	0.00c	Lagoa Grande	0.00c
Pocinhos	3.00b	Jurú	0.00e	Areia	0.00c	Lagoa Nova	0.00c
Tavares	0.72b	Nova Floresta	0.00e	Jurú	0.00c	Matinhas	0.00c

¹ Médias de mesmas letras não diferem entre si estatisticamente (Teste de Scott-Knotta 5% de probabilidade).

² Doenças: M.P. – Mancha parda; M. B. – Mancha branca; AC – Antracnose; P.R. – Podridão radicular.

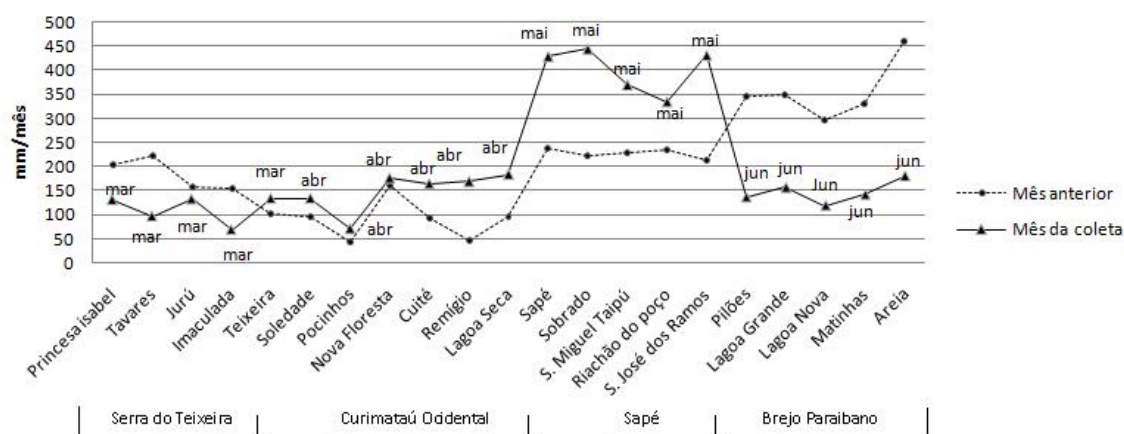


Figura 1. Precipitação bimensual acumulada (mês anterior e exato da coleta) em municípios do Estado da Paraíba - Primeiro semestre de 2011.

A mancha branca na maioria dos municípios de ocorrência registrou-se baixa taxa de incidência da doença. Os municípios em que foram observados os maiores percentuais pertencem às microrregiões Brejo Paraibano e Sapé. A mancha branca é encontrada mais comumente em regiões úmidas e frias (Lozano e Booth, 1974), correspondendo ao clima da microrregião Brejo Paraibano. Em Riachão do Poço, situado na região ocidental de Sapé, ocorreu a maior incidência (52%), não havendo relação direta entre o índice da doença e a precipitação. Na microrregião de Sapé, a doença está relacionada à preferência do patógeno a áreas situadas em baixadas e próximas ao litoral (Tabela 1). Os sintomas para mancha branca são lesões circulares ou angulares, medindo de 1-7 mm de diâmetro brancas ou marrons claras (Lozano e Booth, 1974).

Para a doença foi encontrada em pouco mais 70% dos municípios. A maior incidência ocorreu no Brejo Paraibano, junto aos municípios: Lagoa Nova, Matinhas e Areia com 43,15%, 32,5% e 20%. Esta doença é caracterizada por causar cancos nas hastes, ramos e frutos, manchas foliares e morte dos ponteiros (Sutton, 1980, Teri et al., 1981).

Podridão Radicular mole: A maior incidência da podridão mole, causada por *F. oxysporum* foi observada na cidade de Imaculada, na microrregião de Serra do Teixeira, atingindo 21% das plantas (Tabela 1). Bandyopadhyay et al. (2006) também registraram que em Camarões 30% das tuberosas apodrecidas foram atacadas por *Fusarium*, sendo as principais espécies identificadas, *F. oxysporum* e *F. solani* e no Estado do Pará, Poltronieriet al. (2002), relataram a morte de 30% das mudas de mandioca da variedade

Olho de Boto, causada pela ação de *F. solani*. Os sintomas reflexos manifestados pelo ataque dos patógenos da doença são murcha e queda de folhas, enquanto o sintoma direto é o apodrecimento progressivo dos tecidos radiculares.

Capítulo II

DOENÇAS FOLIARES DA MANDIOCA (*Manihot esculenta*) NO MUNICÍPIO DE ALAGOA NOVA- PARAÍBA²

RESUMO

A mandioca é explorada na alimentação humana, animal e na indústria. No Estado da Paraíba esta cultura apresenta caráter comercial no Litoral e Brejo e de subsistência no interior. Tendo em vista a existência de fatores de disseminação e a ausência de estudos epidemiológicos de doenças foliares da cultura no Estado, objetivou-se com este trabalho avaliar o progresso da severidade e da incidência de três doenças foliares (mancha parda, mancha branca e antracnose) em condições naturais ao longo de um ano no Sítio Geraldo Alagoa Nova-PB, microrregião do Brejo paraibano. Os dados utilizados para os estudos epidemiológicos foram registrados a cada décimo oitavo dia de cada mês, no período de setembro de 2012 a agosto de 2013. Para avaliação da incidência, calculou-se a porcentagem de plantas apresentando sintomas. A severidade foi quantificada a partir das observações das lesões nos tecidos foliares com o emprego de escala diagramática, escala descritiva e índice de Índice de Mackinney para cálculo. Os dados da curva de progresso foram submetidos à análise de correlação de Pearson em relação aos dados meteorológicos mensais. Calculou-se também a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Das plantas selecionadas 95, 17 e 8,5% apresentaram os sintomas de mancha parda, mancha branca e antracnose, respectivamente. As lesões destas doenças foram observadas na ordem de 13,3; 4,7 e 3,3 % de extensão nos tecidos foliares. Os valores de incidência como de severidade das três doenças aumentaram gradativamente no decorrer dos meses da avaliação, atingindo o resultado final de 61,02; 32,45 e 15,28, para AACPD. As mais elevadas taxas de progresso da severidade mensais foram de 0,441 mancha parda, no mês de setembro e para mancha branca e antracnose, 0,197 e 0,192 nos meses de novembro e dezembro respectivamente. Observou-se correlação fortemente positiva entre o índice pluviométrico e progresso das doenças e negativa em relação à diminuição das temperaturas médias mensais para as três enfermidades.

Palavras-chave: mancha parda, folhas, severidade, AACPD, *Phaeoramularia manihoti*

² Artigo a ser enviado no periódico Summa Phytopathologica em fevereiro de 2014.

4.1. Introdução

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta dicotiledônea, arbustiva e pertencente à família *Euphorbiaceae* (Ávila, 2002). O produto comercial mais explorado desta cultura é o amido, que age como fonte de reserva energética do vegetal, sendo acumulado nas raízes tuberosas. Este polissacarídeo é elaborado durante o processo de acumulação de nutrientes e tuberização radicular (Ribeiro et al., 2012).

A mandioca é cultivada em todo o Brasil. Nas regiões sudeste, sul e centro-oeste encontram-se os plantios tecnificados da cultura, os quais destinam-se a atender às demandas das indústrias de farinha e fécula. Já no norte e nordeste, a produção é rudimentar e quase toda destinada à elaboração artesanal de farinha, enquanto a mandioca mansa (macaxeira) é utilizada diretamente na alimentação humana (Souza, 2009). Cerca de 85% da produção da mandioca no país é destinada à fabricação de farinha, a qual é consumida especialmente pela população de baixa renda na ordem de 18 Kg/hab/ano. O restante da produção é direcionado ao consumo *in natura* (raízes frescas) e à indústria alimentícia (Furlaneto et al., 2009; Fialho e Vieira, 2011).

Além da indústria alimentícia, o amido da mandioca pode ser utilizado nas indústria têxtil, papelreira e farmacêutica, participando dos processos de engomagem das fibras, enrijecimento da lamina de papel e na produção de xarope de glucose e maltodextrinas (Nunes et al., 2009; Fialho e Vieira, 2011). Na indústria siderúrgica, este composto está envolvido no processo de flotação de minério de ferro (Foloni et al., 2010). A mandioca também tem sido aproveitada como alimento animal. Este aproveitamento da planta prevalece principalmente em regiões climáticas de precipitações irregulares e concentradas em poucos meses do ano, como acontece no semi-árido nordestino. Nestas condições, tanto as raízes como a folhagem são produtos primários que são utilizados na nutrição animal como componentes da ração (Almeida e Ferreira Filho, 2005).

No Estado da Paraíba a cultura adquire caráter comercial no litoral, microrregião do Brejo paraibano e áreas circunvizinhas, sofrendo um processo de concentração, devido à mecanização das casas de farinha. No sertão do Estado, porém, atua como cultura de subsistência (Rodriguez, 2002). Em 2012, foi registrado 28.790 h de área plantada, 21.900 h de área colhida e uma produção de 201.871 t para o Estado em 2012 (Conab, 2012).

Vários fatores têm contribuído para o decréscimo da produção agrícola da mandioca, dentre estes as doenças provocadas por fungos, uma vez que ocorrem desde o comércio das manivas e perduram até a pós-colheita. Os principais fatores relevantes na

disseminação de doenças foliares e radiculares são a falta de controle eficiente quando da ocorrência de doença, ausência de tratamentos culturais, tradicionalismo dos agricultores e plantio de material vegetativo infectado (Cavalcanti, 2001; Takahashi, 2004; Vidal et al, 2009).

Em nível nacional destacam-se como as doenças mais importantes a podridão radicular (*Fusarium* spp. *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora* spp.) bacterioses (*Xanthomonas campestris*, *Erwinia carontovora*), superbrotamento (Fitoplasma), superalongamento *Sphaceloma manihoticola*) e viroses (mosaico comum e das nervuras) (Mattos et al., 2002; Oliveira et al., 2008; Notaro, et al., 2013). Além destas doenças, as manchas parda, mancha branca e antracnose apresentam relativa importância devido principalmente a alta frequência em que ocorrem nos plantios, independente das condições climáticas e épocas do ano (Massola e Bedendo, 2005). As perdas ocasionadas pelas doenças não são quantificadas porque faltam estudos epidemiológicos que sirvam de base para comparação em condições naturais. (Takatsu e Fukuda, 1990; Massola e Bedendo, 2005).

A importância da correta representação da proporção de determinada doença contra o tempo e a interação desta com o patógeno, hospedeiro e ambiente, apresenta-se como ferramenta primordial para estabelecer o adequado tratamento a ser empregado no estudo de determinada enfermidade incidente numa dada área geográfica, além de possibilitar a recuperação da cultura e diminuição dos prejuízos causados (Paula e Oliveira, 2003). Sendo assim, objetivou-se com este trabalho, avaliar o progresso da severidade e da incidência da mancha parda, mancha branca e antracnose da mandioca em condições naturais ao longo de um ano no município de Alagoa Nova, microrregião do Brejo Paraibano.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Área de estudo

Os estudos epidemiológicos e avaliações dos índices de severidade e incidência da mancha parda, mancha branca e antracnose em mandioca, foram realizadas no Sítio Geraldo, localizado à Latitude 07°03'07"S e Longitude 35°45'56"W, nos anos 2012 e 2013. Esta propriedade está localizada na zona rural do município de Alagoa Nova-PB, situada na microrregião do Brejo Paraibano. Na área de estudo não havia sido cultivada

qualquer espécie na safra anterior, estando presente apenas a vegetação natural, composta de espécies arbustivas e gramíneas, bem como não havia restos culturais infectados nas proximidades da área. As temperaturas máxima e mínima e o índice pluviométrico médios mensais estão apresentados na Figura 1.

Os dados de incidência e severidade foram registrados a cada 18° dia de cada mês, no período de setembro de 2012 a agosto de 2013, perfazendo um total de 12 avaliações. A amostra consistiu de 75 plantas centrais selecionadas e marcadas em uma área de produção que media 50 x 24 m x 0,60 m entre as covas.

O início da avaliação do progresso das doenças foi realizado quando as plantas se encontravam com dois meses de idade.

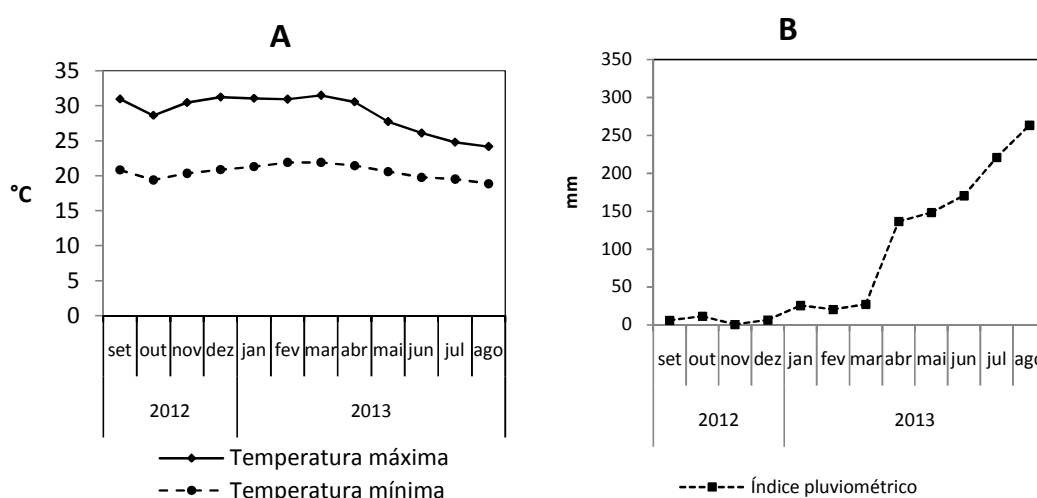


Figura 1. Temperaturas (°C) máximas e mínimas (A) e precipitação acumulada média mensal (mm) (B) em Alagoa Nova (PB), durante setembro de 2012 a agosto de 2013. Dados: AESA (Agência de águas da Paraíba).

4.2.2. Dados epidemiológicos

A intensidade das doenças foi determinada considerando a incidência e severidade segundo os conceitos de James e Shik (1973). Para avaliação da incidência, calculou-se a porcentagem de plantas apresentando os sintomas característicos das doenças em relação ao número total de plantas avaliadas. Este parâmetro foi realizado empregando-se a fórmula: $I (\%) = \text{NPS} / \text{NTP} \times 100$, onde, I = Incidência, NPS = número de plantas sintomáticas e NTP = número total de plantas. A severidade das doenças foi quantificada diretamente a partir das observações das lesões nos tecidos foliares para manchas parda e

branca e nas folhas e caules para a antracnose. Empregou-se para o cálculo, a escala diagramática proposta por Michereff et al. (1999) (Figura 2) e a escala descritiva adaptada proposta por Amusa (1998), para antracnose, a qual, contém as seguintes notas: 0 – Ausência de sintomas; 1 - Desenvolvimento de canchros profundos sobre hastes abaixo na planta (1 até 25%); 2 - Desenvolvimento de sucessivos canchros a 40 cm do nível do solo, antes da ramificação, com os canchros nas hastes mais velhas tornando-se grandes e depressivos (25-50%); 3 - Desenvolvimento de lesões sobre ponteiros, pecíolos e folhas (50-75%); 4 - Colapso dos ponteiros e folhas jovens, seguido de morte parcial (75-99%) e 5- Morte total da planta (100%).

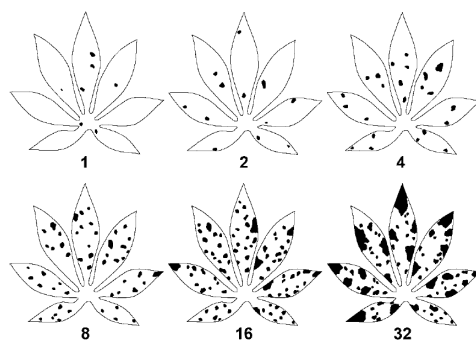


Figura 2. Escala diagramática para quantificação da mancha parda da mandioca, causada por *Cercosporidium henningsii*, indicando níveis de 1, 2, 4, 8, 16 e 32% de severidade da doença. Fonte: Michereff et al. (1998).

A porcentagem da severidade (índice de infecção) foi obtida pelo emprego do Índice de Mackinney (Chester, 1950), pela seguinte fórmula: $S = \frac{\sum F(N)}{NTF} \times NM \times 100$, da qual, S = Severidade; $\sum F(N)$ = Somatório das frequências de notas, NTF = número total de folhas examinadas e NM = nota máxima da escala.

Para identificação das espécies fúngicas fitopatogênicas, foram realizadas coletas de folhas apresentando sintomas de doenças. No Laboratório de Fungos Aquáticos da Universidade Federal de Pernambuco, fragmentos de lesões foram retirados das folhas e mantidos em câmara úmida, composta de placas de Petri esterilizadas e papel de filtro umedecido com água destilada esterilizada, por 72 h. Após o desenvolvimento dos conídios e conidióforos, foram feitas preparações microscópicas e observadas ao microscópio ótico, sendo efetuadas as identificações conforme a literatura especializada (Chupp, 1954; Sutton, 1980).

Para os testes de patogenicidade foram utilizadas plantas de mandioca sadias cultivadas em solo esterilizado contido em vasos plásticos (5 Kg de solo) e ambiente de

casa de vegetação. Inicialmente, foi realizada a limpeza com algodão esterilizado no limbo das folhas das plantas. Posteriormente, estes limbos foram feridos com auxílio de lâmina esterilizada. Estas folhas foram em seguida inoculadas quatro vezes em semanas consecutivas, com suspensões de 10^6 conídios mL^{-1} obtidos a partir dos conídios dos fungos desenvolvidos em câmara úmida nos fragmentos de folhas apresentando os sintomas e agentes patogênicos das três doenças. As inoculações foram realizadas com o auxílio de um atomizador de Vilbiss n.15. A seguir todas as plantas foram submetidas à condição de câmara úmida, sendo envolvidas por sacos plásticos transparentes umedecidos com água destilada esterilizada por um período de 12 h. Os sintomas foram observados e fotografados de acordo com seu aparecimento gradual.

Os dados da curva de progresso absoluta foram submetidos à análise de correlação de Pearson, ao nível de 5% de probabilidade com dados meteorológicos do mesmo período em que se efetuou o levantamento e obtidos junto a Agência de águas da Paraíba-AESA

Utilizando os dados originais da intensidade das doenças, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) pela equação: $\text{AACPD} = \{\sum[(y_i + y_{i+1})/2] \cdot (t_{i+1} - t_i)\} / n$. Para esta equação, y_i e y_{i+1} correspondem aos valores de severidade registrados em duas avaliações consecutivas, $t_{i+1} - t_i$ o intervalo entre as duas avaliações e n a duração do período de avaliação (Fry, 1978; Madden, 1980).

Para a curva de progresso das doenças, os valores originais da severidade foram transformados a partir da equação $y = \ln[1/(1-y)]$, sendo expressos pelo modelo matemático de crescimento logístico e ajustados ao modelo de regressão linear simples (Figura 3). Estes dados foram considerados como a variável dependente, a qual esteve em função do tempo nos 12 meses (variável independente). Por meio destes ajustes, foi estimada a taxa de progresso da doença (r), determinada pelo parâmetro “b” da equação de regressão. A análise estatística dos dados foi processada através do software STATISTICA (Statsoft INC, 2008).

4.3. Resultados e discussão

4.3.1 Intensidade de doenças: incidência e severidade

Os valores de incidência e severidade das três doenças avaliadas aumentaram gradativamente no decorrer dos meses da avaliação, sendo que as maiores variações foram observadas para severidade da mancha parda (Tabela 1).

A incidência também avançou mais rapidamente para mancha parda. A curva de progresso absoluta para esta doença correspondeu à curva que expressou o aumento da incidência de manchas causadas por *Cercospora apii* em populações de aipo (*Apium graveolens*) suscetíveis durante 140 dias (Berger, 1973).

Na última avaliação, 95,3, 17 e 8,5% das plantas de mandioca apresentaram os sintomas de mancha parda, mancha branca e antracnose, respectivamente. As doenças atingiram 13,3; 4,7 e 3,3 % dos tecidos foliares (Tabela 1). Este índice de severidade sugere redução da área fotossintética e, como consequência, diminuição da elaboração de amido pelas raízes, produto que é explorado economicamente desta cultura (Teri et al., 1980). O agente patogênico identificado para a mancha parda foi o fungo *Cercosporidium henningsii* Allescher, enquanto para mancha branca e antracnose foram os fungos *Phaeoeramularia manihots* (F. Stevens & Solheim) MB Ellis e *Colletotrichum gloeosporoides* f. sp. *manihotis* Henn (Penn.).

Tabela 1. Curva de progresso absoluta da incidência e severidade da mancha parda (MP), mancha branca (MB) e antracnose (AC) em mandioca (*Manihot esculenta*) em Alagoa Nova, Paraíba do mês de setembro de 2012 à agosto de 2013.

Meses/ano	Mancha parda (%)		Mancha branca (%)		Antracnose (%)	
	Inc	Sev	Inc	Sev	Inc	Sev
Setembro/2012	12,73	1,57	3,62	0,93	3,01	0,24
Outubro/2012	18,52	1,83	4,06	0,94	3,08	0,26
Novembro/2012	36,66	1,95	10,66	1,7	3,18	0,32
Dezembro/2012	41,33	2,01	12,33	1,73	3,23	0,69
Janeiro/2013	49,33	2,33	13,52	1,86	4,33	0,76
Fevereiro/2013	64,1	2,7	15,22	2,12	5,33	1,03
Março/2013	68,7	3,02	15,48	3,5	5,65	1,05
Abril/2013	78,33	5,48	15,6	3,86	7,66	1,73
Mai/2013	81,7	7,83	15,62	4,13	7,85	1,82
Junho/2013	86,6	12,4	16,13	4,65	7,87	2,6
Julho/2013	92,3	13,25	16,75	4,68	8,05	3,12
Agosto/2013	95,3	13,3	17	4,7	8,5	3,33

4.3.3 Teste de patogenicidade e identificação dos fungos

Oito dias após a última inoculação, os sintomas foram observados em casa de vegetação. A partir das lesões, obtiveram-se os conídios dos fungos *Cercosporidium henningsii*, *Phaeoeramularia manihots* e *C. gloeosporoides*, agentes etiológicos da mancha parda, branca e antracnose, respectivamente. Os macrocnídios de *Cercosporidium henningsii* apresentavam formato filiforme, reto a ligeiramente curvo, papilado, medindo de

39-55 x 5-7 μm , e constituídos de 3 – 10 septos, enquanto os conídios de *Colletotrichum* eram de formato reto e obtuso nas extremidades, com dimensões de 13-14,8 x 1,5-4 μm , apressórios irregulares. Já os macroconídios do fungo *Phaeoramularia manihots*, apresentavam formato filiforme, reto atingindo de 23-43 x 6-8 μm . Estas características corresponderam às descritas na literatura consultada (Chupp, 1954; Sutton, 1980).

4.3.4 Área Abaixo da Curva de Progresso das Doenças (AACPD)

No cálculo da área abaixo da curva de progresso das doenças, obteve-se o resultado total de 61,02; 32,45 e 15,28 para severidades da mancha parda, mancha branca e antracnose respectivamente (Figura 3). O resultado da AACPD confirmou a necessidade de buscar formas efetivas de manejo em relação à mancha parda. As outras doenças avaliadas, devido ao fato de apresentarem baixos índices na área de estudo, não justificam a adoção de medidas de controle para cultura, porém medidas preventivas devem ser aplicadas.

O resultado da AACPD para mancha parda foi quase 50% superior ao valor da mancha branca 75 % em relação à antracnose. Este fato sugere que parte da área foliar atacada apresentava as três doenças simultaneamente, embora a severidade das duas últimas enfermidades tenha sido consideravelmente inferior.

Estes dados preliminares servem para comparações em estudos posteriores de resistência de cultivares nas mesmas condições de avaliação.

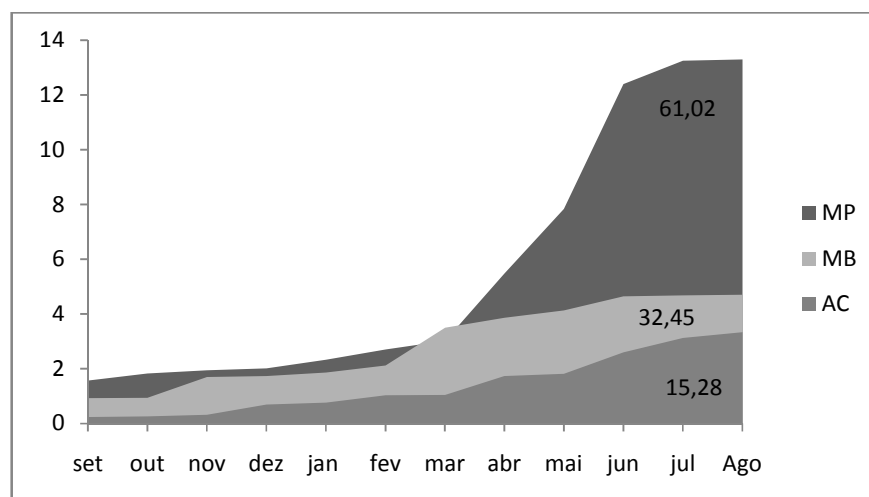


Figura 3. Área abaixo da Curva de progresso da severidade da mancha parda (MP), mancha branca (MB) e antracnose (AC) em mandioca (*Manihot esculenta*) em Alagoa Nova, Paraíba do mês de setembro de 2012 à agosto de 2013.

4.3.5. Taxa de progresso

Em relação à taxa do progresso mensal da extensão das três doenças nos tecidos das plantas, em determinados períodos da avaliação ocorreram aumentos expressivos (Figura 4). Para a mancha parda, observou-se no mês de setembro, a taxa de 0,441, enquanto para mancha branca e antracnose, 0,197 e 0,192, respectivamente nos meses de novembro e dezembro, respectivamente. No mês de setembro, embora tenha sido observado um baixo índice pluviométrico e as maiores temperaturas (Figura 1), a maior taxa de progresso para mancha parda pode ter decorrido do fato de que este período corresponda a fase posterior à infecção inicial e adaptação do patógeno nos tecidos do hospedeiro e consequente aumento das lesões, para a futura disseminação. Para antracnose, a maior taxa de progresso ocorreu durante o mês dezembro, no qual, registraram-se uma das mais altas temperaturas médias registradas para o período de avaliação.

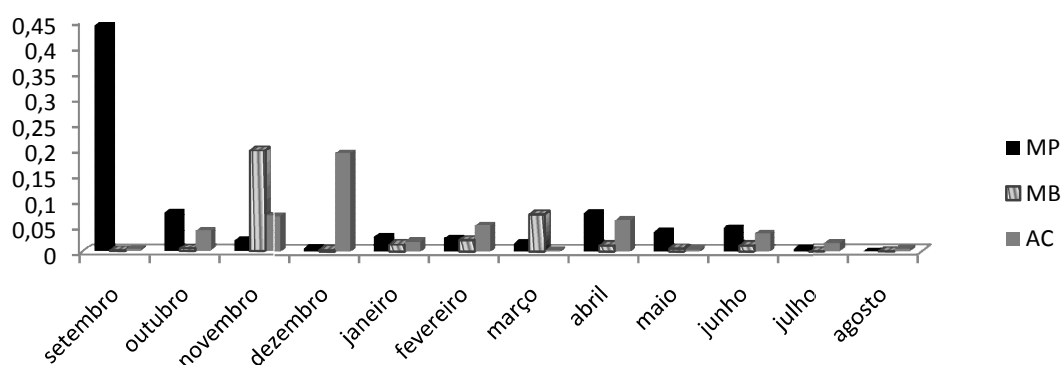


Figura 4. Taxas de progresso mensais da mancha parda (MP), mancha branca (MB) e antracnose (AC), no período de setembro de 2012 a agosto de 2013. Alagoa Nova- PB .

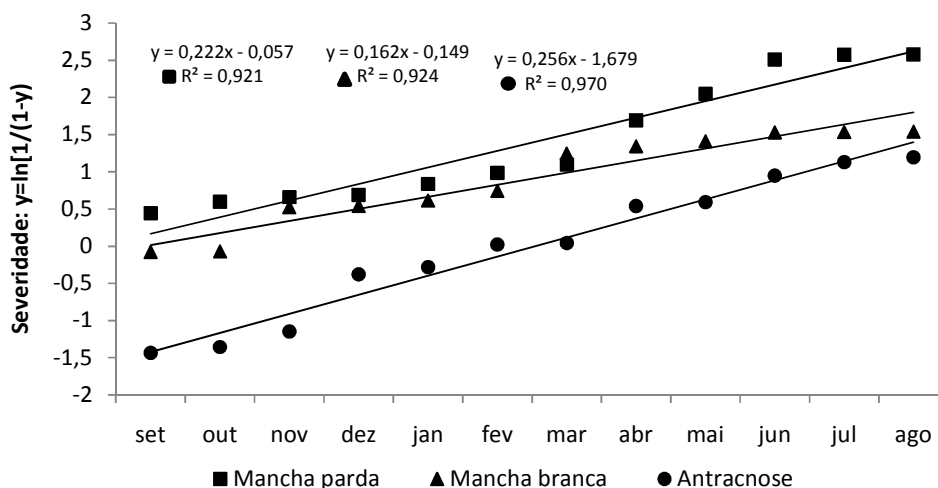


Figura 5. Curva de progresso da severidade de mancha parda, mancha branca e antracnose em mandioca (*Manihot esculenta*) durante o período de setembro de 2012 a agosto 2013, através do modelo logístico, em condições de campo em Alagoa Nova – PB.

Para severidade da mancha parda, observou-se correlação fortemente positiva entre o aumento da doença e o índice pluviométrico e negativa em relação à diminuição das temperaturas médias mensais, sendo o maior coeficiente observado na relação com as temperaturas máximas, o que sugere influência significativa com a precipitação e com uma discreta diminuição da temperatura (Tabela 2).

O aumento da temperatura mínima e máxima foi acompanhado pela diminuição dos sintomas da mancha parda, com coeficientes de correlação negativos. O aumento da pluviosidade indica um aumento de todas as doenças avaliadas (Tabela 2).

Tabela 2. Efeitos das variáveis meteorológicas no progresso de mancha parda, mancha branca e antracnose da mandioca (*Manihot esculenta*) cultivada em Alagoa Nova –PB.

Doenças	Dados meteorológicos		
	Temperatura Mínimas	Temperatura Máximas	Pluviosidade
Mancha Parda	- 0,63*	- 0,93*	+ 0,92*
Mancha branca	- 0,28 ^{ns}	- 0,70*	+ 0,92*
Antracnose	- 0,50 ^{ns}	- 0,86*	+ 0,91*

*Grau de correlação de Pearson significativo

Segundo Massola Jr. e Bedendo (2005), a estação chuvosa é mais favorável à ocorrência da mancha parda, porém é comum encontrar a doença tanto em regiões quentes e secas como em regiões frias e úmidas, o que reflete a grande capacidade de adaptação do agente patogênico, *C. heningsii* a diversas condições climáticas. Os autores explicam que

essa é a razão pela qual doença possui ampla distribuição geográfica e pode ser encontrada em qualquer época do ano. Vários trabalhos apontaram a difusão da doença em praticamente todos os locais de cultivo (Wydra e Msikita, 1998; Michereff et al. 1998; Wydra e Verdier, 2002). Este fenômeno foi observado recentemente em campos agrícolas comerciais no Estado da Paraíba (Moraes et al., 2013). A larga faixa de capacidade adaptativa de *C. heningsii* às variações climáticas foram confirmadas por Sousa e Dias (1991), que registraram no Estado do Maranhão, a incidência da mancha parda com maior frequência na estação seca, seguida de outras doenças, como a mancha branca.

Quanto à mancha branca, o incremento da doença ocorreu em temperaturas mais baixas e com altos índices pluviométricos. Segundo a literatura, esta enfermidade é encontrada mais comumente em regiões úmidas e frias (Lozano e Booth, 1974), o que corresponde ao clima da cidade de Alagoa Nova, onde ocorreram as avaliações. Ferreira et al., (2012) registraram que a mancha branca é a principal doença que acomete a cultura da mandioca na região do Alto Juruá, Estado do Acre. Em municípios desta região foram observados altos índices de incidência e severidade (de 61 a 100 % e 11 a 66 %, respectivamente segundo a variedade) e os autores explicaram que esse fato decorreu das condições climáticas da região amazônica, sendo mais visíveis na estação chuvosa e provocando altos índices de desfolha.

Em relação à antracnose, ocorreram semelhantes correlações observadas para mancha branca. Esta doença é causada pelo fungo *C. gloeosporioides f. sp. manihotis* Henn (Penn.) e é bastante comum da América Latina. Foi registrada em pouco mais de 70% dos municípios do Estado da Paraíba, com maior incidência no Brejo Paraibano, no município de Lagoa Nova, Matinhas e Areia com 43,15%, 32,5 e 20%, respectivamente (Banito et al., 2007; Moraes et al., 2013). Embora os fatores climáticos favoráveis ao parasitismo do patógeno são alta umidade e temperaturas entre 18 e 23 °C (Leite e Maringoni, 2002), em levantamentos realizados no oeste da Nigéria, houve correlação positiva entre a incidência e severidade da doença (0,91) com a estação seca em 12 genótipos de mandioca (Fokunang et al., 1999). No mesmo continente, nos trabalhos de Banito et al., (2007) a doença foi raramente encontrada em Togo, enquanto Wydra e Verdier (2002) a observaram em todas as regiões de plantio da República Popular do Congo, mas somente em baixa severidade e associadas a mancha parda e podridão radicular.

Considerando os dados epidemiológicos obtidos a partir das avaliações dos fatores versatilidade adaptativa dos agentes etiológicos aliados à condições pluviométricas e

climáticas locais são causas dos altos índices da mancha parda, os quais podem ocasionar redução na produtividade da cultura no município.

Capítulo III

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE CELULASES POR *C. gloeosporioides* URM 7080³

RESUMO

O complexo celulolítico agrupa as exoglucanases, endoglucanases e β -glucosidases, que são enzimas depolimerizadoras da celulose, tendo que sua ação explorada em diversos setores industriais. O objetivo deste trabalho foi otimizar a produção de celulases por *C. gloeosporioides* URM 7080 e purificar parcialmente a Celulases totais: atividades das exoglucanases + endoglucanases em em papel de filtro (FPase). Para seleção, obteve-se 27 fungos das espécies *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium oxysporum* isolados a partir de um levantamento em plantios comerciais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) realizado previamente em 11 municípios do Estado da Paraíba. Para determinação das atividades FPase e atividade da hidrólise de Carboximetilcelulose por endoglucanases (CMCase). Para as atividades da β -glucosidase (β G), utilizou-se a liberação de Paranitrofenol. Na otimização com *C. gloeosporioides* URM 7080 utilizou-se os substratos farelo da entrecasca da mandioca (MA) e palma triturada (PA). Na purificação realizou-se a precipitação em Sulfato de amônia e cromatografia por exclusão molecular. As atividades mais elevadas foram: 23,13 e 1,51 U/ml para FPase e CMCase pelos isolados *C. gloeosporioides* URM 7124 e 7125. Para β G, 0,0014 U/mL, pelo isolado 13. Na otimização, os valores máximos atingidos pelo complexo foram: 3,47; 1,21 e 0,015 U/mL, respectivamente, sendo os melhores parâmetros para produção: 1% de MA e 0,5% de PA, 28° C e pH inicial 5,0 para FPase, pH 7,0 para CMCase e pH inicial 5,0 e 36° C para β G, com a agitação de 140 rpm para as três enzimas. Nessas condições e adicionado o Fluoreto de fenil-metil-sulfonida (PMSF), a FPase atingiu 5,50 U/mL em 3,167 mg/mL de biomassa micelial após 144h de fermentação. Na purificação parcial da FPase, a precipitação em sulfato de Amônia F60-80%, resultou em um aumento de atividade de 1,29 Um/L, com rendimento de 14,27 % e a cromatografia de exclusão molecular em DEAE celulose, 0,81 U/mL, com 14,79 % de rendimento. As maiores taxas de atividade foram observadas na aplicação do pH do valor de 6,0 e da temperatura de 60 °C e permanecendo ativa a 60 °C e pH 5,0 após 180 minutos.

Palavras-chave: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium*, celulases totais, mandioca,

³Artigo a ser enviado ao periódico Journal of Biotechnology and Biodiversity

5.1. Introdução

A celulose é um polímero abundantemente encontrado na natureza (Okunowo et al., 2010; Ramanathan et al., 2010) e sua ampla distribuição deve-se principalmente à sua participação como principal componente estrutural das paredes celulares dos vegetais (Narasimha et al., 2006). A celulose é constituída por cadeias lineares de D-glucose conectadas por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4). Estas cadeias são fortemente alinhadas e unidas entre si, formando uma fita cristalina, o que dificulta a acessibilidade e ataque enzimático. Devido a esta estrutura molecular, a celulose é muito resistente, estável e de difícil degradação (Basso et al., 2010). A atuação das celulasas como agentes de hidrólise desta molécula nos componentes vegetais, é explorada em diversos processos industriais e ambientais. Dentre estes estão o seu uso em determinadas etapas dos processamentos de diversos materiais nas indústrias alimentícia, farmacêutica, de óleos essenciais, rações animais, polpa celulósica e papel, bem como na conversão da biomassa de resíduos agrícolas e industriais em produtos químicos e biocombustíveis e no controle da poluição (Singh et al., 2009; Okunowo et al., 2010; Talekar et al., 2011).

Segundo Lynd et al. (2002) as celulasas classificam-se de acordo com seu modo de ação catalítica e local de atuação no substrato celulósico. Estas características químicas dividem o complexo em três grandes grupos: endoglucanases (EnG, EC 3.2.1.4), que clivam internamente as ligações glucosídicas nas regiões amorfas da fibra celulósica; exoglucanases (ExG, EC 3.2.1.74) que atuam na região externa das fibras celulósicas e β -glucosidases (β G, EC 3.2.1.91) que hidrolisam oligossacarídeos solúveis, derivados das ações catalíticas das duas enzimas citadas anteriormente, como celodextrinas e celobioses em glicose (Castro e Pereira, 2010).

Os micro-organismos apresentam grande capacidade de metabolizar diferentes compostos orgânicos, inorgânicos, naturais ou sintéticos (Vasconcelos et al., 2003). Eles desempenham esta ação biológica de modo mais rápido e específico quando catalizam reações químicas por meio de enzimas (Gautam et al., 2012). Dentre estes agentes biológicos, os fungos são organismos que apresentam elevada versatilidade em relação às condições ambientais, podendo alterar suas atividades metabólicas em resposta a induções ocasionadas por variações das condições físico-químicas do meio (Vasconcelos et al., 2003; Kavanagh, 2005). Aliados a este fato, fungos filamentosos apresentam grande potencialidade na produção de enzimas hidrolíticas, de proteínas diversas e relativa facilidade em sua excreção (Carlile et al., 2001; Bon et al., 2008; Ângelo, 2010; Silva,

2011), tendo contribuído significativamente no campo da produção industrial (Carlile et al., 2001; Ângelo, 2010). Para suprimento das necessidades nutricionais e energéticas, muitos destes organismos produzem enzimas celulolíticas visando decompor a celulose de fontes vegetais. Todavia, somente poucos destes produzem quantidades significativas *in vitro* (Sukumaran et al., 2005).

No que concerne à aquisição de substratos com propriedades adequadas para indução à produção das celulases, cita-se o aproveitamento de vários resíduos contendo biomassa vegetal oriundos de atividades agroindustriais como o bagaço de cana, farelo de trigo e de arroz ou de soja, polpa de maçã ou de café, quirela de milho, bagaço de cana, abacaxi e pedúnculo de caju (Pandey, 2002).

Os fungos fitopatogênicos, devido a sua adaptação natural para invadir e parasitar a célula vegetal, têm a capacidade de produzir e secretar várias enzimas hidrolíticas que atuam degradando a celulose e outros componentes da parede celular das plantas, dentre estas, as celulases (Baer e Gudmestad, 1995; Mendgen e Hahn, 1996; Moreira et al. 2005). Como produtores destas enzimas, foram estudados recentemente os seguintes fungos: *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum* e *Myrothecium roridum* (Kikot et al. 2010; Okunowo et al. 2010; Ramanathan et al. 2010; Kaushal et al. 2012).

Os fungos fitopatogênicos da cultura da mandioca apresentam estas mesmas adaptações para realizarem os processos de infecção, especialmente para a penetração dos tecidos hospedeiros (Pascholati, 1995; Massola e Bedendo, 2005).

Levando-se em consideração tais fatores, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a produção de enzimas celulolíticas por fungos fitopatogênicos isolados de mandioca, otimizar a produção e purificar parcialmente estas enzimas.

5.2. Material e métodos

5.2.1. Manutenção dos micro-organismos

A partir do material coletado em um levantamento de doenças realizado no Estado da Paraíba (Morais et al., 2013), obtiveram-se isolados de fungos fitopatogênicos que acometiam a mandioca em caules, folhas e raízes de duas áreas denominadas I e II de campos agrícolas comerciais de 11 municípios do Estado (Tabela 1). Cada área abangeu o número total de 75 plantas e distanciava de 5 a 10 metros uma da outra, dependendo do tamanho do plantio.

Tabela 1. Fungos isolados de tecidos infectados de mandioca no Estado da Paraíba.

Isolado	Espécie	Município	Localização
1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Lagoa Nova I	S: 07°03'12"/O: 35°45'55"
2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Lagoa Nova II	S: 07°03'14"/O: 35°45'56"
3	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	S.Miguel Taipú II	S: 07°04'51"/O: 35°43'42"
4	<i>Fusarium oxysporum</i>	Imaculada II	S: 07°21'52"/O: 37°29'21"
5	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Matinhas II	S: 07°06'18"/O: 35°43'43"
6	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Pilões I	S: 06°51'56"/O: 35°37'47"
7	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> URM 7081	Pocinhos II	S: 07°08'35"/O: 36°02'97"
8	<i>Fusarium oxysporum</i> URM 7083	Imaculada II	S: 07°21'52"/O: 37°29'21"
9	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Sapé I	S: 07°05'11"/O: 35°14'49"
10	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Cuité II	S: 06°27'98"/O: 36°10'27"
11	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Princesa Isabel I	S: 07°45'16"/O: 37°57'42"
12	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Pilões II	S: 06°51'53"/O: 35°37'48"
13	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Pocinhos I	S: 07°07'22"/O: 36°02'93"
14	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Teixeira II	S: 07°16'78"/O: 37°19'51"
15	<i>Fusarium oxysporum</i>	Princesa Isabel I	S: 07°44'86"/O: 37°57'23"
16	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Pocinhos I	S: 07°07'22"/O: 36°02'93"
17	<i>Fusarium oxysporum</i>	Princesa Isabel I	S: 07°44'86"/O: 37°57'23"
18	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Matinhas I	S: 07°06'17"/O: 35°48'42"
19	<i>Fusarium oxysporum</i>	Princesa Isabel II	S: 07°44'86"/O: 37°57'23"
20	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Cuité I	S: 06°27'96"/O: 36°10'13"
21	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Nova Floresta II	S: 06°27'12"/O: 36°13'43"
22	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> URM 7125	Areia I	S: 07°01'41"/O: 35°45'39"
23	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> URM 7124	Areia II	S: 07°02'65"/O: 35°37'73"
24	<i>Fusarium oxysporum</i> URM 7082	Imaculada I	S: 07°21'56"/O: 37°29'37"
25	<i>Fusarium oxysporum</i>	Imaculada I	S: 07°21'56"/O: 37°29'37"
26	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> URM 7080	Nova Floresta I	S: 06°27'11"/O: 36°13'42"
27	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Pocinhos II	S: 07°08'36"/O: 36°02'92"

5.2.2. Seleção dos fungos com potencial celulolítico

A fermentação para seleção dos fungos foi realizada em frascos de Erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de meio composto de 2,0g: KH_2PO_2 , 1,4g: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3 g: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,3 g: $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5,0 g: NaNO_3 , 1 mL: Tween: 80 e 1 mL de solução de micronutrientes (2,0 g: CoCl_2 , 1,6 g: $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,4 g: $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,5 g: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{L}$), pH inicial 5,0 e de carboximetilcelulose (CMC) 1% (p/v) como única fonte de carbono. Os frascos e seu conteúdo foram esterilizados a 121 °C durante 15 minutos. Em seguida foram preparadas suspensões de 10^6 conídios/mL de cada isolado (culturas com 8 dias de crescimento). Posteriormente os frascos de Erlenmeyers foram inoculados e acondicionados em agitador orbital (TECNAL TE424), na temperatura de 30 °C e 120 rpm durante 7 dias. O Ensaio foi realizado em duplicata.

5.2.3. Extração enzimática

O extrato enzimático bruto foi obtido do meio fermentado, após filtração e centrifugação a 9.000g, 4° C durante 15 minutos para separação da biomassa e sobrenadante. Em seguida, o sobrenadante foi acondicionado em tubos e congelados a temperatura de - 20° C para posteriores determinações analíticas.

5.2.4. Determinações analíticas

5.2.4.1. Proteínas totais

O teor de proteínas totais foi determinado empregando-se o método de Bradford (1976), utilizando-se albumina sérica bovina como proteína padrão da curva de calibração. As determinações foram realizadas em triplicata e a média dos resultados foi utilizada.

5.2.4.2. Atividade Enzimáticas

As atividades FPase (Celulase Total) e CMCase (endoglucanases) foram determinadas de acordo com o método proposto por Ghose (1987). Para determinação da FPase, Tiras de papel de filtro Whatman nº 1 (50 mg, 1x6 cm), recortadas e enroladas foram mergulhadas em solução de 0,5 mL do extrato enzimático com 1,0 mL de tampão citrato (50 mM, pH 5,0) contida em tubos de ensaio. Em seguida, o material foi incubado a 50 °C por 60 minutos. Para determinação da CMCase, foram incubados 0,5 mL do extrato enzimático com 0,5 mL da solução de CMC a 1% (p/v) em tampão citrato (50 mM, pH 5,0). Em seguida, esta solução foi incubada a 50 °C durante 30 minutos em banho termostatizado. A hidrólise foi interrompida com a adição de 1 mL do reagente Ácido Dinitrossalicílico (DNSA) e seguiu-se a quantificação do conteúdo de açúcares redutores. A absorbância das soluções contendo os açúcares foi mensurada a 540 nm de comprimento de ondas, por meio de espectrofotômetro e por confrontação da leitura óptica com uma curva de calibração, na qual a D-glucose foi utilizada como padrão.

Para a determinação da β G, seguiu-se a metodologia descrita por Deshpande e Eriksson (1988) modificada: 200 μ L do extrato enzimático foram adicionados a uma solução de 300 μ L de p -nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (PNPG) diluído em tampão

acetato de sódio (50 mM, pH 5,0). A mistura foi incubada a 50 °C por 30 minutos. A seguir foram adicionados 500 µL de solução de carbonato de sódio (1M), para interrupção da reação. O *p*-nitrofenol liberado foi quantificado espectrofotometricamente a 405 nm. Os dados obtidos a partir da leitura das absorbâncias foram calculados segundo curva padrão de *p*-nitrofenol.

Uma Unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um mmol de glucose por minuto a partir de substratos apropriados.

5.2.5. Análise estatística

Para a avaliação da produção de celulasas pelos fungos, a análise estatística dos dados foi processada através da análise de variância e teste Scott-Knott para as médias das atividades totais (U/ml) obtidas. O programa estatístico empregado para análise foi o SISVAR (2008), desenvolvido pela Universidade Federal de Lavras.

5.2.6. Otimização da produção de enzimas celulolíticas

Para o processo de otimização foram utilizados como substratos o farelo da entrecasca de mandioca e a palma forrageira triturada de acordo com o planejamento fatorial (Tabela 2).

Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial 2⁵ e dos níveis das variáveis para produção do complexo celulolítico por *Colletotrichum gloeosporioides*.

Variáveis	-1	0	+1
Palma forrageira triturada (% p/v)	0,5	0,75	1
Farelo da entrecasca de mandioca (% p/v)	0,5	0,75	1
pH inicial	5	6	7
Agitação (rpm)	80	110	140
Temperatura (°C)	28	32	36

Apenas o fungo com potencial para produção das três enzimas em quantidades o mais uniforme possível foi selecionado para os posteriores experimentos.

Para análise estatística dos dados foi empregada a análise multivariada de um planejamento experimental fatorial fracionário 2⁵. Deste fatorial, obteve-se um total de 32 ensaios com quatro repetições no ponto central. Através dos resultados das atividades totais de cada enzima do complexo celulolítico (U/mL), foi avaliada a resposta de cada

tratamento de acordo com as variáveis e níveis relacionados (Tabela 2) após 96 h de fermentação. Os componentes observados explicaram 97,53% da variação nos dados ($\lambda > 0,97$) e suas correlações. O processamento estatístico dos dados foi realizado utilizando-se o software STATISTICA (Statsoft INC, 2008).

5.2.7. Determinação da biomassa micelial

Para determinação da biomassa seca, 10^6 conídios/mL do fungo foram inoculados em 45 mL de meios líquidos constituídos das concentrações de palma e farelo de mandioca nas condições físicas otimizadas estatisticamente na fase anterior da investigação. Aos meios de cultivo foi acrescentado o inibidor de proteases fenilmetilsulfonida (PMSF) para evitar a ação proteolítica das celulasas.

Após um período de incubação de 144 h foi mensurado o peso seco através da determinação da matéria seca em g. A cada 24 horas, um frasco de Erlenmeier contendo a cultura, era retirado do agitador orbital e seu conteúdo, filtrado e centrifugado a 9600g durante 20 minutos. O sobrenadante foi estocado a -20 °C para posteriores análises e o material filtrado contendo a biomassa micelial foi submetida a secagem e total retirada da umidade em estufa a 109 °C por 18 horas, sendo posteriormente pesado.

No sobrenadante, foram quantificadas as proteínas solúveis totais segundo protocolo de Bradford et al., (1976) modificado e as atividades FPAse, CMCase e β G.

5.2.8. Purificação Parcial da FPAse

O extrato enzimático que apresentou melhor resultado para FPAse foi submetido a saturação de 60-80%, com sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, conforme a metodologia proposta por Bollag et al. (1996). A solução resultante foi centrifugada a 9000g por 15 minutos a 4° C. Em seguida o precipitado coletado foi dializado em membrana de poliamida 0,2 μm – Sartorius por 2 horas inicialmente, utilizando água milliQ e em seguida por água destilada overnight a temperatura de 4° C e agitação. O dializado foi resuspendido em solução tampão Citrato de sódio pH 4,8 e mantido a 20 °C.

5.2.9. Cromatografia em gel por exclusão molecular

Para cromatografia por exclusão molecular utilizaram-se colunas (30 x 1,5 cm) com o trocador aniônico dietilaminoetil-celulose (DEAE-celulose Sigma-Aldrich, EUA), equilibradas com citrato-fosfato 50 mM pH 4,8 a um fluxo de 20 mL/h. A fração 60-80%, após dializada foi aplicada à coluna e a eluição foi efetuada com NaCl 1 M. Foram coletadas frações de 2 mL. Logo em seguida foram também monitoradas pela absorbância a 280 nm. As frações que continham material protéico foram avaliadas quanto às atividades enzimáticas.

5.2.10. Efeitos da Temperatura e pH

Após a cromatografia, a fração que apresentou as maiores atividades enzimáticas foi submetida a diferentes valores de pH e temperatura. Para o efeito do pH, foram testados diferentes valores em diferentes tampões: tampão acetato de sódio (pH 3.0 – 5.0; 0,05 M), tampão citrato-fosfato (5.0 – 7.0; 0,05 M) e Tris-HCl (8.0 – 10.0; 0,05 M). Para a temperatura ótima, foram testados valores da faixa de variações entre 30 a 90°C, ajustados no pH ótimo obtido anteriormente.

Em relação à estabilidade ao pH, a fração enzimática purificada foi diluída na proporção 1:2 nos mesmos valores de pH e tampões anteriormente mencionados, e mantidos a 25 ° C durante 24 h. Após este período, foi quantificada a atividade enzimática nos valores ótimos de pH e temperatura. Quanto à estabilidade térmica, a fração foi incubada à temperaturas de variações 30-90 °C por 180 min. Logo em seguida, a atividade enzimática foi determinada.

5.2.11. Efeito de íons sobre a atividade enzimática

Para se determinar o efeito de íons sobre a atividade da FPAse, foram realizados testes utilizando a fração de maior atividade. Os ensaios enzimáticos foram realizados em conjunto com soluções contendo 1,0 mM de MgCl₂, CuSO₄, CaCl₂, FeSO₄·H₂O, ZnSO₄, NaNO₃, MnCl₂(H₂O) e Pb(NO₃)₂. Os valores das atividades de cada tratamento foram comparados ao do tubo controle, sem a presença de sais. Estes testes foram realizados nas condições ideais obtidas dos testes anteriores.

5.3. Resultados

5.3.1. Seleção

A variação da atividade celulolítica para as enzimas foi significativa entre os fungos e em todos os casos houveram atividades mesmo que em baixos índices (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade celulolítica (U/ml*) de *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de tecidos infectados de mandioca em fermentação submersa.

Isolados	Espécie	FPase	CMCase	βG
1	<i>C. gloeosporioides</i>	3.01c**	0.34c	0.0005c
2	<i>C. gloeosporioides</i>	3.71c	0.36c	0.0006c
3	<i>C. gloeosporioides</i>	1.27c	0.28d	0.0008b
4	<i>F. oxysporum</i>	3.85c	0.35c	0.0005c
5	<i>C. gloeosporioides</i>	2.84c	0.28d	0.0006c
6	<i>C. gloeosporioides</i>	3.02c	0.33c	0.0008b
7	<i>C. gloeosporioides</i> URM 7081	2.96c	0.24d	0.0013a
8	<i>F. oxysporum</i> URM 7083	2.85c	0.28d	0.0002e
9	<i>C. gloeosporioides</i>	4.73c	0.30d	0.0003d
10	<i>C. gloeosporioides</i>	4.96c	0.31d	0.0008c
11	<i>C. gloeosporioides</i>	13.21b	0.45c	0.0002e
12	<i>C. gloeosporioides</i>	5.12c	0.24d	0.0013a
13	<i>C. gloeosporioides</i>	10.95b	0.23d	0.0014a
14	<i>C. gloeosporioides</i>	0.95c	0.28d	0.0012a
15	<i>F. oxysporum</i>	5.22c	0.41c	0.0003d
16	<i>C. gloeosporioides</i>	4.69c	0.26d	0.0005c
17	<i>F. oxysporum</i>	3.69c	0.25d	0.0010b
18	<i>C. gloeosporioides</i>	1.08c	0.24d	0.0003d
19	<i>F. oxysporum</i>	4.92c	0.29d	0.0006c
20	<i>C. gloeosporioides</i>	1.01c	0.29d	0.0004c
21	<i>C. gloeosporioides</i> URM 7080	5.66c	0.24d	0.0004c
22	<i>C. gloeosporioides</i> URM 7125	4.29c	1.51a	0.0001e
23	<i>C. gloeosporioides</i> URM 7124	23.13a	1.20b	0.0001e
24	<i>F. oxysporum</i> URM 7082	5.89c	0.23d	0.0007c
25	<i>F. oxysporum</i>	4.79c	0.28d	0.0002e
26	<i>C. gloeosporioides</i>	5.55c	0.37c	0.0002e
27	<i>C. gloeosporioides</i>	5.51c	0.27d	0.0002e

* 1 U define a quantidade de enzima necessária na liberação de 1 μmol de glucose/min de reação

** médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

De acordo com a Tabela 3, foram atingidas as maiores atividades para FPase a partir do extrato enzimático do isolado 23 de *C. gloeosporioides*, atingindo 23,13 U/mL. Para o mesmo isolado obteve-se atividade de 1,20 U/mL da enzima endoglucanase (CMCase), valor que seguiu imediatamente o isolado 22, em que observou-se os valores mais elevados para esta enzima.

Em relação à CMCase, o isolado 22 de *C. gloeosporioides*, foi o fungo que apresentou a mais elevada atividade, 1,51 U/mL.

A maior atividade para β G foi apresentada pelo isolado 13, espécie de *C. gloeosporioides*. A atividade observada foi de 0,0014 U/mL, a qual não diferenciou estatisticamente dos isolados 7, 12 e 14.

Em relação a espécie *F. oxysporum*, o isolado 15 apresentou os índices de atividades de 5,22, 0,41 e 0,0003 U/mL de FPase, CMCase e β G, respectivamente. Para atividade da FPase, o valor quantificado não diferiu estatisticamente dos isolado 24, que correspondeu a maior atividade observada (5,89 U/mL). (Tabela 3).

5.3.2. Otimização da produção

O maior valor observado para a atividade da FPase foi de 3,47 U/mL, sendo obtido a partir das fermentações com pH inicial 5,0. As variáveis que influenciaram este resultado foram a concentração de palma triturada e a interação: agitação (140 rpm) x temperatura (28 °C), como evidenciado pela Tabela 4 ($p < 0,05$).

Em relação à agitação, foi requerido o maior nível de velocidade para atingir o melhor resultado, 140 rpm. Esta operação exerceu efeito significativo conjuntamente com a temperatura empregada, 28 °C. Por meio da Tabela 4, observou-se também que a concentração necessária para os dois substratos foi a mínima (0,5 %), sendo que a palma triturada predominou como fator de indução da enzimas.

Em relação à CMCase, detectou-se a atividade de 1,21 U/mL como o maior valor observado (Tabela 4).

Quanto aos resultados da atividade da β G, a interação das variáveis agitação e temperatura foi significativa para atuação desta enzima (Tabela 4), particularmente no ensaio 23, onde foi obtido o valor mais elevado, 0,015 U/mL. Os níveis e variáveis que influenciaram as outras enzimas repetiram-se para este caso, exceto em relação à temperatura, na qual foi requerido o maior nível empregado. As concentrações de substrato foram 0,5 e 1% de palma e farelo de mandioca com pHs 5,0 e 7,0, para os dois ensaios respectivamente.

Tabela 4. Planejamento fatorial 2⁵ para estudo dos efeitos de variáveis e interações sobre a produção de celulasas em 96h de fermentação submersa por *Colletotrichum gloeosporioides* URM 7080.

Ensaio	C. Sub (%)		A (rpm)	pH	T (°C)	Atividades U/mL		
	PA	MA				FPAse	CMCase	βG
1	0,5	0,5	80	5	28	0,77	0,27	0,005
2	1	0,5	80	5	28	0,35	0,13	0,008
3	0,5	1	80	5	28	0,72	0,21	0,006
4	1	1	80	5	28	0,37	0,13	0,006
5	0,5	0,5	140	5	28	3,47	0,57	0,004
6	1	0,5	140	5	28	3,33	0,59	0,003
7	0,5	1	140	5	28	1,24	0,59	0,005
8	1	1	140	5	28	2,55	0,43	0,007
9	0,5	0,5	80	7	28	1,05	0,23	0,006
10	1	0,5	80	7	28	0,42	0,13	0,007
11	0,5	1	80	7	28	1,16	0,25	0,010
12	1	1	80	7	28	0,48	0,15	0,004
13	0,5	0,5	140	7	28	1,88	0,54	0,004
14	1	0,5	140	7	28	2,62	1,15	0,002
15	0,5	1	140	7	28	2,64	1,21	0,001
16	1	1	140	7	28	0,97	0,24	0,007
17	0,5	0,5	80	5	36	3,18	0,68	0,002
18	1	0,5	80	5	36	2,23	0,66	0,002
19	0,5	1	80	5	36	1,15	0,42	0,002
20	1	1	80	5	36	0,67	0,26	0,002
21	0,5	0,5	140	5	36	1,43	0,28	0,011
22	1	0,5	140	5	36	1,04	0,30	0,012
23	0,5	1	140	5	36	1,28	0,35	0,015
24	1	1	140	5	36	1,42	0,32	0,011
25	0,5	0,5	80	7	36	2,36	0,96	0,002
26	1	0,5	80	7	36	1,70	0,84	0,003
27	0,5	1	80	7	36	0,83	0,05	0,004
28	1	1	80	7	36	0,90	0,26	0,010
29	0,5	0,5	140	7	36	0,86	0,43	0,003
30	1	0,5	140	7	36	1,84	0,90	0,006
31	0,5	1	140	7	36	1,60	0,19	0,014
32	1	1	140	7	36	0,64	0,26	0,011
33	0,75	0,75	110	6	32	1,07	0,32	0,009
34	0,75	0,75	110	6	32	0,76	0,26	0,001
35	0,75	0,75	110	6	32	0,57	0,25	0,007
36	0,75	0,75	110	6	32	0,70	0,33	0,009

PA: concentração de Palma forrageira (% p/v); MA: concentração de farelo da entrecasca da mandioca (% p/v); A: Agitação (rpm); T: Temperatura (°C); U: Unidade de atividade enzimática ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$).

Conforme as Tabela 5, detectou-se por meio das variáveis empregadas que os efeitos significativos sobre as atividades enzimáticas foram a quantidade de palma forrageira e a agitação para FPAse e a interação entre a agitação x temperatura (3 x 5) para atividade da FPAse e βG. As variáveis e interações não exerceram influencia sobre a atividade CMCase.

Tabela 5. Efeitos dos níveis e variáveis para produção de FPase, CMCase e β -glucosidase (β G) com 96 horas de fermentação submersa (FSm) por *Colletotrichum gloeosporioides* URM 7080.

Variáveis/interações	FPase	CMCase	β G
(1) PA	5,657*	2,885	1,093
(2) MA	0,053	0,024	0,108
(3) Agitação	5,133*	2,269	2,172
(4) pH	0,002	0,659	0,425
(5) Temperatura	1,921	1,121	0,095
1 x 2	0,000	0,516	0,176
1 x 3	0,061	0,368	0,072
1 x 4	2,274	1,018	0,023
1 x 5	1,410	2,737	0,044
2 x 3	0,189	0,342	0,055
2 x 4	1,195	0,177	1,341
2 x 5	0,506	1,146	0,009
3 x 4	2,212	3,785	0,115
3 x 5	6,529*	4,200	5,755*
4 x 5	3,839	3,012	0,999

*Significativo a 5% de probabilidade

PA: concentração de Palma forrageira (% p/v); MA: concentração de farelo da entrecasca da mandioca (% p/v); A: Agitação (rpm); T: Temperatura (°C)

Detectou-se por meio da projeção plana multivariada das variáveis, que o fator principal 1, que correspondeu às atividades da FPase e CMCase em contraste às da β G foi responsável pela explicação de 63,86% da variação dos resultados, enquanto o fator 2, que correspondeu a ação das atividade β G e FPase, em relação à CMCase, representou 33,67%. A combinação dos dois fatores, por sua vez, correspondeu no plano cartesiano de 97,53% da variação dos resultados totais (Figura 1).

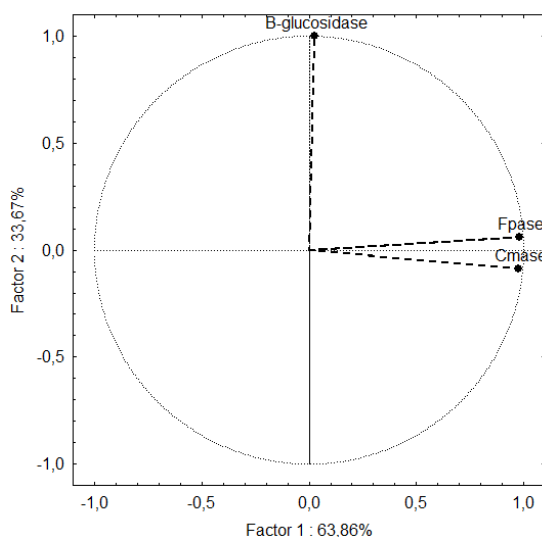


Figura 1. Projeção plana multivariada das variáveis em relação às atividades totais (U/mL) de FPase (celulases totais), CMCase (endoglucanases) e β G. Carregamento das variáveis dos Fatores principais 1 e 2 para atividades celulolíticas por *Colletotrichum gloeosporioides* URM 7080 em fermentação submersa.

De acordo com a projeção plana multivariada dos ensaios (Figura 2), o ensaio 15 posiciona-se no quadrante inferior direito (peso negativo para o fator 2 e positivo para o fator 1). O 13 se encontra no quadrante superior direito (peso positivo para os dois fatores). Estes são os mais distantes do eixo de intersecção do gráfico, indicando sua significância estatística em comparação aos demais ensaios.

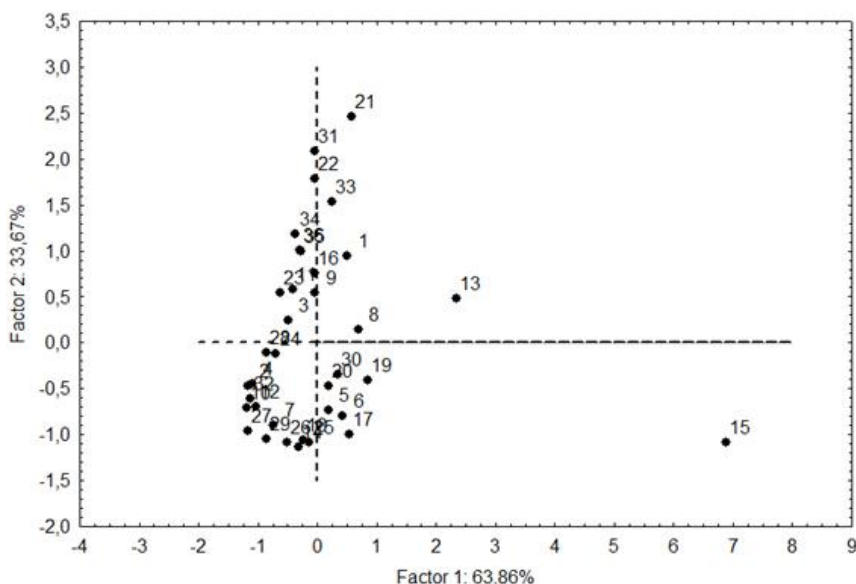


Figura 2. Projeção plana multivariada dos ensaios para dados da atividade total de FPAse, CMCase e β G por *Colletotrichum gloeosporoides* URM 7080 em fermentação submersa.

5.3.3. Biomassa Micelial

Houve crescimento progressivo da biomassa micelial do fungo durante o período de fermentação. Os períodos de crescimento pouco pronunciados foram de 48 à 72h e de 96 à 120h, nas condições otimizadas do experimento anterior. Ao final do processo, alcançou-se a biomassa total micelial de 3,167 mg/mL (Figura 3).

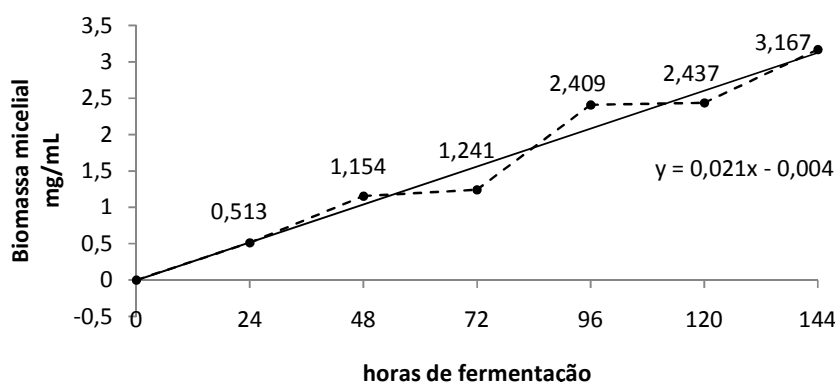


Figura 3. Crescimento da biomassa de *Colletotrichum gleosporioides* URM7080 durante 144 horas de fermentação em cultivo submerso composto de farelo de entrecasca de mandioca (1,0%) e palma triturada (0,5%) em pH 5,0, 28 °C e 140 rpm.

A Figura 4 indica que houve incremento das atividades totais da FPase, CMCase e β G, principalmente durante as primeiras 72 horas, sendo logo após percebida uma tendência mais estável da produção do complexo celulolítico. As mais elevadas atividades observadas após as 144 h, foram para FPase, 5,5 U/mL e 3,37 e 0,036 U/mL para as atividades das CMCase e β G, respectivamente.

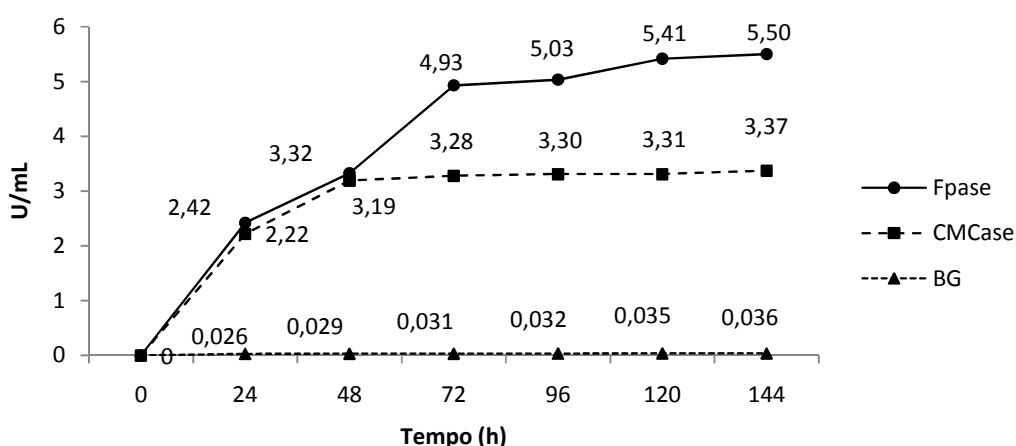


Figura 4. Produção do complexo celulolítico por *Colletotrichum gleosporioides* URM 7080 em cultivo submerso composto de farelo de entrecasca de mandioca e palma triturada em pH 5.0, 28 °C e 140 rpm.

As mais elevadas atividades foram obtidas para as FPases. Um sumário da purificação parcial destas enzimas é mostrado na Tabela 6. A atividade FPase foi purificada 49 vezes em relação ao extrato bruto nas 144h e nas três etapas de purificação.

Tabela 6. Perfil das Atividades FPase de *Colletotrichum gloeosporioides* URM 7080 em três etapas de purificação.

Etapas da purificação	Proteínas Totais (mg/mL)	FPase			Fator de purificação
		Atividade Total (U/mL*)	Atividade Específica (U/mg)	Rendimento	
Extrato bruto (144h)	0,0878	5,49	62,58	100,00	1
F60-80%	0,0011	1,29	893,20	23,42	14,27
DEAE-celulose	0,0002	0,81	3110,65	14,79	49,70

* 1 U define a quantidade de enzima necessária na liberação de 1 μ mol de glucose/min de reação

5.3.4. Efeitos da temperatura e pH e estabilidade na atividade da FPase

As atividades enzimáticas da FPase com relação aos efeitos de vários pH e temperaturas testados podem ser observados na Figura 8. A maior taxa de atividade observou-se na aplicação do valor de pH 6,0 em citrato-fosfato (Figura 8A). O valor que seguiu-se a este foi o pH 4,0, com 69,13 % da atividade relativa, havendo uma diminuição evidente a partir da faixa de pH 8,0 – 10,0. Com relação à temperatura, a mais elevada taxa de atividade relativa, obteve-se empregando-se a temperatura de 60 °C (Figura 8B).

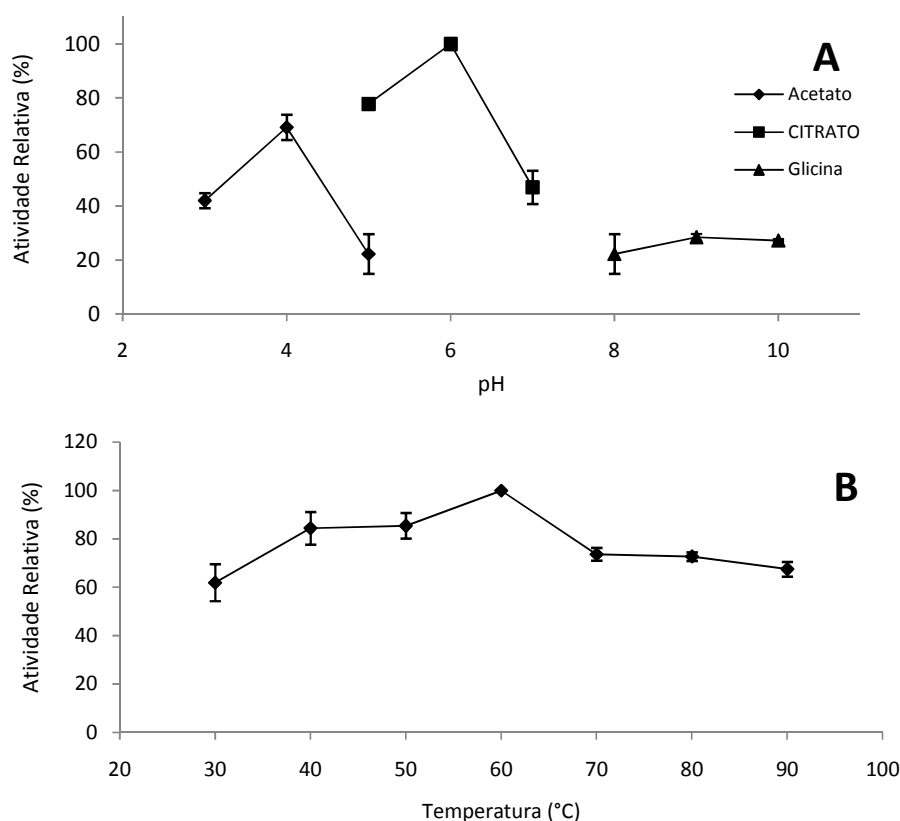


Figura 5. Efeito de diferentes valores de pH (A) e Temperatura (B) sobre fração parcialmente purificada de FPases de *Colletotrichum gloeosporioides* URM 7080 isolado de folhas de mandioca (*Manihot esculenta*).

Em relação à estabilidade aos valores de pH na faixa empregada, a atividade FPase manteve-se estável em tampão citrato fosfato, pH 5,0 após 180 minutos (Figura 9A). Logo após observou-se, de acordo com a Figura 9, uma pequena queda de atividade (3,43 %) após aplicação dos pH 6,0 e 7,0. Posteriormente, os índices foram diminuindo a partir dos pH mais básicos. Já em relação à temperatura, as mais elevadas atividades permaneceram em níveis ótimos nas menores temperaturas testadas (30 °C), com 58,5 % começando a diminuir somente a partir de 60 °C, com perda de até 14,3 % (Figura 9B).

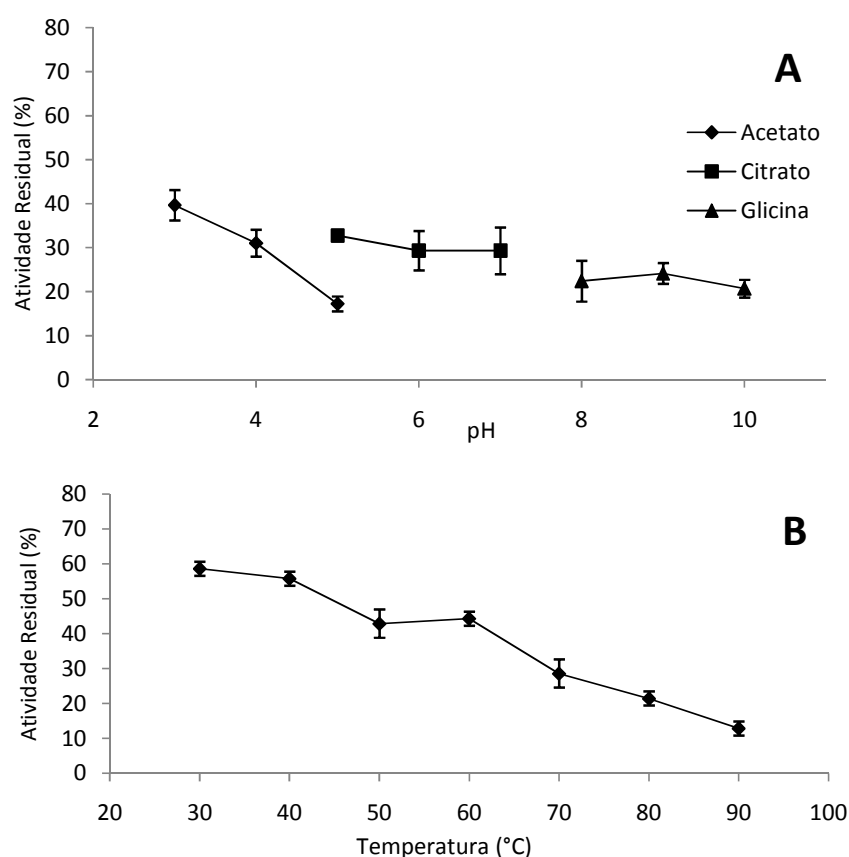


Figura 6. Estabilidade em diferentes valores de pH (A) e termoestabilidade a faixa de temperaturas 30 -90 °C (B) sobre sobre atividade de fração parcialmente purificada de FPases por *Colletotrichum gloeosporioides* URM 7080 isolado de folhas de mandioca.

5.3.5. Efeito de íons e outras substâncias sobre atividade FPase

De acordo com a Tabela 7, pode-se observar que a atividade celulolítica foi incrementada frente a aplicação dos sais contendo Mn^{2+} e Cu^{2+} . Por outro lado, a maioria das substâncias utilizadas apresentaram agentes iônicos inibidores, com níveis variando de 38,55 % a 80, 73. O que mais exerceu esta ação foi o íon Pb^{2+} .

Tabela 7: Efeito de íons sobre a atividade enzimática de FPase produzida por *Colletotrichum gloeosporioides* URM 7080 isolado de folhas de mandioca (*Manihot esculenta*).

Íons	Atividade FPase Relativa (%)
Controle	100
MgCl ₂	100±3,41
CuSO ₄	128,91±8,30
CaCl ₂	80,73±9,25
FeSO ₄ .H ₂ O	75,90±5,59
ZnSO ₄	43,37±1,19
NaNO ₃	57,83±3,86
MnCl ₂ (H ₂ O)	195,18±9,99
Pb(NO ₃) ₂	38,55±1,97

5.4 Discussão

A divergência significativa entre as atividades enzimáticas dentro de uma espécie permite diferenciar isolados dentro desse âmbito taxonômico (Lima filho et al. 2003; Paterson e Bridge, 1994). Lima Filho et al (2003) avaliando a atividade da FPase e de outras enzimas provenientes de isolados de *Colletotrichum* sp. fitopatogênicos de frutíferas, verificaram valores pouco superiores. As atividades também variaram de acordo com os isolados de cada vegetal: 4,89 U/mL em isolados de manga, 4,46 U/mL em isolados de mamão, 4,04 U/mL em isolados de cajú.

Outro fator que atua no incremento da atividade é a idade da cultura do fungo. Para isolados do gênero, a correlação da atividade FPase decresce linearmente com o tempo de cultivo (Prakash et al 1989). Anand et al (2008) utilizando pectina e carboximetilcelulose como fontes de carbono, constataram que a atividade FPase de isolados de *C. capsici* aumentava de acordo com a virulência da linhagem e com a idade da cultura, alcançando de 9,00 a 12,00 U/mL, mas somente após 20 dias de cultivo. Como foi observado, em relação à esta atividade alguns fungos isolados da mandioca foram significativamente superiores como o *C. gloeosporioides* URM 7124, que atingiu 23,13 U/mL e o isolado 11, com 13,21 U/mL. Em estudos utilizando-se a espécie *Trichoderma reesei*, o valor alcançado utilizando-se espiga de milho triturada como fonte de carbono em fermentação submersa, foi de 5,20 U/mL (Liming e Xueliang, 2004), enquanto Alam et al. (2008), trabalhando com *T. harzianum*, visando a bioconversão do estado líquido de lodo de esgoto doméstico, obtiveram a atividade de 6,90 U/mL, a 32,5°C, pH inicial 5,0 e 175 rpm. Estes índices corresponderam às atividades de seis isolados fúngicos do presente trabalho.

Para a CMCase, o valor mais elevado atingido neste trabalho, 1,51 U/mL divergiu das observações de Ortega (1994), por esta mesma espécie (52,28 U/mL). Porém o meio utilizado no seu trabalho continha xilana além de carboximetilcelulose (CMC). No presente trabalho, *C. gloeosporioides* URM 7125 se destacou dos demais, embora não houvesse fontes complementares de carbono, além de carboximetilcelulose.

Em fungos saprofíticos se observa variada atividade para esta enzima: Sukumaran et al. (2009) obtiveram 14,98 U/mL de CMCase, utilizando *Trichoderma reesei* RUT C30. Enquanto Malik et al. (2010) obteve o máximo de produção 1,57 para *T. viride*, em fermentação submersa pelo período de incubação de 72h a 30° C e ajustando-se o pH para 5,5, alcançou-se a máxima produção de 1,66 U/mL. Estes valores são equivalentes ao alcançado pelo presente trabalho (1,51 U/mL).

No que diz respeito à β G, a taxa de atividade do isolado 13, *C. gloeosporioides*, foi próxima, porém inferior, as de valores atingidos por fungos da mesma espécie fitopatogênicos de seringueira (*Hevea brasiliensis*), os quais apresentaram atividades 0,030 e 0,014 U/mL após 10 dias em fermentação extrativa contendo carboximetilcelulose como fonte de carbono (Senaratna et al 1991). Embora o gênero *Colletotrichum* seja produtor desta enzima, baixas atividades podem ser previsíveis, uma vez que a maioria das espécies produzem esta enzima intracelularmente e com pequena atividade extracelular. Este fenômeno é observado tanto para espécies de fungos filamentosos como para bactérias (Moldoveanu e Dieterkluepfel, 1983) e que mesmo em espécies mais exploradas para produção de celulasas industriais, como *T. reesei*, sua secreção *in vitro* é insuficiente (Enoch et al., 2011; Sternberg et al., 1977; Wen et al., 2005).

Os isolados de *F. oxysporum* apresentaram moderada produção de enzimas, sendo os valores de FPAse superiores aos isolados da mesma espécie, patogênicos ao tomateiro. Os mais elevados valores obtidos para estes fungos foram de 1,43 U/mL, para FPAse, 1,92 para CMCase e 1,78 para β G, sendo necessário um período de fermentação de 12 dias à temperatura de 50° C, pH 6.0 e tendo carboximetilcelulose como substrato indutor (Ramanathan, et al, 2010), o que difere do presente trabalho, no qual se obteve superiores resultados no período de 96 h. Para CMCase, Kikot et al. (2010) obtiveram 0,33 U/mL como maiores valores de atividade para *F. graminearum*, no quarto dia de incubação. Estas observações confirmam as conclusões de vários estudos do potencial celulolítico por fungos integrantes deste gênero. Trivedi e Rao (1981) avaliaram o início da produção do complexo celulolítico em espécies de *Fusarium* e detectaram que a atividade da β G foi

detectada desde o primeiro dia de cultivo submerso, a aticidade da endoglucanase no segundo dia e da exoglucanase a partir do terceiro, tendo celulase insolúvel e cristalina como substrato.

No que concerne aos experimentos de otimização, os mais elevados valores da FPAse foram atingidos no pH de menor nível testado (pH 5,0). Este valor é considerado dentro da faixa ótima para produção e atividade das enzimas celulolíticas pela grande maioria dos fungos filamentosos mesófilos (3,6-5,0) (Castro e Pereira Júnior, 2010).

Embora as variáveis estudadas não tenham influenciado estatisticamente as atividades da CMCase, as condições dos ensaios em que foram observados os resultados superiores de CMCase foram semelhantes aos da FPAse, exceto o pH, em que foi necessário aplicar o maior nível, 7,0. Através do ensaio 15 obteve-se valores de atividades superiores a outras espécies fúngicas fitopatogênicas. Okunowo et al. (2010), por exemplo, registraram as produções de 0,95, 0,92 e 0,36 U/mL para *Curvularia pallescens*, *Fusarium solani* e *Myrothecium roridum*, tendo como substratos serragem e folhas secas de aguapé à 25 °C.

No presente caso de projeção plana multivariada, obteve-se, por meio dos dois fatores um modelo que responde quase totalmente ao padrão da dinâmica de cada uma das enzimas no processo fermentativo. No fator 1, as atividades das FPAse e CMCase corresponderam ao peso positivo, enquanto as da β G, também peso positivo, porém próximo ao eixo de intersecção. Esta disposição confirmou a ação similar das atividades das duas primeiras enzimas em comparação com as da β G. Este fenômeno pode confirmar então a complementação das atividades enzimáticas e sua ação sinérgica (Ogeda e Petri, 2010). Segundo Castro e Pereira Júnior (2010), quando as enzimas do complexo celulolítico hidrolisam o substrato conjuntamente, apresentam maior rendimento do que a soma dos rendimentos individuais, quando agem isoladamente umas das outras. As variáveis que contribuíram para este comportamento das FPAse e CMCase foram as concentrações de 0,5 e 1%, de palma triturada e farelo de entrecasca de mandioca, respectivamente, com agitação de 140 rpm.

No fator 2, os resultados das atividades da FPAse e β G tenderam também ao peso positivo, mas com tendências distantes entre si, enquanto a CMCase tendeu ao negativo, mas com tendências próximas a da FPAse. Percebeu-se por meio destes parâmetros que a variável velocidade de agitação de 140 rpm, influenciou a ação enzimática comum da

relação β G/FPase. Enquanto para a CMCase, nenhuma das variáveis e interações influenciaram a atividade.

Em relação à projeção plana multivariada dos ensaios, como os pontos correspondentes aos ensaios 13 e 15 são os mais distantes do eixo de intersecção dos dois fatores, se estabelece que estes ensaios se sobressaíram em sua influência para atividades enzimáticas, principalmente ao se confrontarem os dados dos escores com os dados referentes do carregamento (Figura 2). A aplicação do ensaio 15 resultou valores superiores para CMCase e intermediários para FPase. Para este ensaio, as concentrações de palma e farelo de mandioca foram 0,5 e 1%. A agitação foi de 140 rpm, pH 7,0 e temperatura de 28°C. Estes mesmos níveis foram semelhantes aos observados no ensaio 13, exceto a concentração do substrato, que consistiu de 0,5% de farelo de entrecasca de mandioca. Estatisticamente, os níveis das variáveis e as interações do ensaio 15 resultaram as mais elevadas atividades do complexo enzimático e nestas condições, realizaram-se as atividades de acordo com a produção biomassa, a purificação parcial e efeitos de temperatura, pH e íons sobre a fração purificada. Comprovou-se também que as condições de agitação em conjunto com a temperatura foram necessárias para indução das mais elevadas atividades celulíticas.

Conforme os dados deste trabalho indicam, o fator mais efetivo na influência da produção das enzimas celulíticas de *C. gloeosporioides* URM 7080 consistiu da combinação agitação a 140 rpm e temperatura 28°C. Com exceção da concentração de palma para FPase, a concentração dos dois substratos não influenciou significativamente a produção das celulasas para o fungo.

Um rendimento de biomassa micelial semelhante ao do presente trabalho foi observado no trabalho de Ahamed e Vermette (2008), que utilizaram celulose suplementada com extrato de levedura e o fungo *T. reesei*. Neste experimento foi obtida uma produção de 0,14 mg/mL de biomassa após 72 horas de fermentação. Considera-se a biomassa atingida nos últimos períodos de fermentação elevada devido à natureza física do substrato, pois segundo Soccol (1994) a textura de substratos como o bagaço de mandioca puro e similares pode influenciar no crescimento micelial, pois tendem a ficar excessivamente densos e compactos, ocasionando uma queda na produção de micélio.

Para as atividades obtidas durante o período de 144 h fermentação, 5,50, 3,37 e 0,036 U/mL para FPase, CMCase e β G, os resultados das FPAse são semelhantes ao comportamento da curva de crescimento de *T. reesei*, o qual apresenta capacidade de resposta à indução por lactose para produção de FPAse (Andreotti et al., 1980). Para outro

isolado dessa mesma espécie, utilizando-se 30g/L de celulose de salgueiro pré-tratado em fermentador de capacidade de 22 L, 30 °C e 350 rpm Reczey et al. (1996) obtiveram 2,80 U/mL após 144h. O presente trabalho, mesmo realizado em frascos de Erlenmeyers e no mesmo período de fermentação superou em quase 100% aquele trabalho em relação à atividade total.

Curvas de crescimento semelhantes ao presente trabalho foram observadas nos trabalhos de Naghavi (2013) e Devi e Kumar (2012). No primeiro trabalho, a autora registrou valores pouco superiores (7,00 U/mL) aos do presente trabalho para FPAse, utilizando *A. terreus* e palha de trigo como fonte de carbono e como condições de fermentação, pH de 4 – 7, no intervalo de 40-50 °C. Quanto ao trabalho de Devi e Kumar, o fungo utilizado foi *A. niger*, isolado de resíduos de indústria papelreira. Pó de serragem e papel celulose foram as fontes de carbono, sendo fermentados na mesma faixa de pH do trabalho anterior e 20-50° C. A atividade máxima obtida para CMCase foi de 3,90 U/mL no sétimo dia, 45° C e pH 5,0.

Concernente aos efeitos do pH em relação à FPAse produzida pelo fungo, segundo Coelho et al. (2008), os efeitos do pH na atividade enzimática devem-se à necessidade de manter os grupos críticos do centro ativo no estado de ionização correto para que a reação ocorra numa velocidade máxima. Os valores obtidos estão dentro da faixa ótima (3,6-5,0) para produção e atividade de enzimas celulolíticas pela grande maioria dos fungos filamentosos mesófilos segundo Castro e Pereira Júnior (2010).

A temperatura, por sua vez, exerce efeitos contrários sobre a atividade enzimática, pois aumenta a reatividade do complexo ativo Enzima-substrato, mas também aumenta a velocidade de inativação como consequência da alteração da estrutura tridimensional ativa da enzima (Coelho et al., 2008). O valor ótimo observado no presente trabalho, 60 °C aproxima-se do observado no trabalho de Dutta et al. (2008), que verificaram a atividade máxima de FPAse de *P. citrinum* MTCC6489 a 65 °C.

Devi e Kumar (2012), obtiveram 3,90 U/mL de atividade FPAse produzidas por *A. niger*, utilizando-se como substratos indutores bioresíduos lignocelulósicos industriais como pó de madeira e papel celulose. As condições estudadas foram temperatura de 45° C e pH 5,0 que são valores menores que os do presente estudo e menos adequados aos processamentos industriais em que se exploram estas enzimas. Estes, geralmente exigem condições mais extremas (Paiva e Sá-Pereira, 2008). Em relação ao comportamento de fungos fitopatogênicos, as condições de temperatura foram também de menores taxas para *F. oxysporum*, 40 °C e pH 5,0 (Talekar et al., 2011) e pH do valor de 5,5 para *C.*

lindenmuthianum, fitopatôgeno do feijoeiro, quando submetido a temperatura de 30 °C (Acosta-Rodríguez et al., 2005).

A estabilidade do pH e temperatura é um importante fator quando se pretende estudar a importância industrial da enzima (Porna e Prema, 2006). Herculano et al., (2011), trabalhando com *A. japonicus* URM 5620, em 90 h de tratamento de FPase, registraram que a FPase permaneceu estável a 90°C em pH 8, mantendo 97% dos níveis atividade após 90 min. Estas condições foram mais elevadas que as do presente trabalho, todavia, em trabalhos como os de Gache (2008) a FPase do fungo *Trichoderma* sp. A-001, também diminuiu atividade (20 - 33%) após 60° C, sendo submetida à 4h de tratamento.

Em relação ao efeito de íons sobre a atividade relativa das FPases, sabe-se que para apresentar atividade catalíticas, algumas enzimas requerem a participação de moléculas menores (cofatores) de natureza não protéica, entre estas estão os metais, que se encontram na forma iônica (Coelho et al., 2008). De acordo com Castro e Pereira Júnior (2010) uma propriedade das enzimas celulolíticas comumente reportada na literatura é sua capacidade de ser influenciada por outras moléculas, especialmente metais, seja sofrendo efeitos inibitórios ou indutores. Segundo estes autores, dentre os íons que inibem mais frequentemente as celulasas são Hg^{2+} , Ag^{+} e Zn^{2+} que chegam a provocar até a perda total da atividade catalítica, estando presentes em concentrações tão baixas quanto 2 mM.

Os dados do presente trabalho se confirmam os resultados obtidos por Santos (2008), segundo o qual, a presença de Mn^{2+} e Cu^{2+} também aumentou-se a atividade FPase relativa de *T. Reesei* RUT C-30, na ordem de 162,02 e 170,38 % e quanto a *T. reesei* QM 9414, aumentou-se em 124 % a atividade frente ao Cu^{2+} .

Os resultados do presente trabalho confirmam que fungos fitopatogênicos isolados de mandioca produzem celulasas que em conjunto com outras enzimas, depolimerizam componentes das paredes celulares vegetais durante a penetração e colonização do tecido parasitado. Este fenômeno é necessário para nutrição de fungos desta modalidade (Ryan, 1973; Walton, 1994; Baer e Gudmestad, 1995; Bateman e Basham 1976). A produção e atividade celulásica já foi estudada em vários fungos patogenicos a plantas, como *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum* e *Myrothecium roridum*, (Kikot, et al. 2010; Okunowo et al., 2010; Ramanathan et al., 2010; Kaushal et al., 2012).

Em vista destes resultados, há potencial biotecnológico dos fungos estudados para produção de celulasas, sugerindo a necessidade de estudos futuros de caracterização e otimização das condições de produção destas e de outras enzimas, com possibilidade de exploração em benefício do meio ambiente e contribuição para indústria biotecnológica.

Considerações Gerais

6. Considerações Gerais

Em vista das informações obtidas neste trabalho de tese, é coerente considerar que a difusão das doenças da mandioca, bem como sua rápida evolução em determinado período e local do Estado e sua relação com os fatores climáticos e meteorológicos locais são dados que evidenciam a possibilidade de futuros problemas econômicos para a agricultura familiar, já em precárias condições devido ao baixo suporte técnico e tecnológico, a ausência de organização empresarial e do auxílio de iniciativas e programas de investimentos por parte dos poderes públicos.

As doenças nessa cultura passam a ser fatores importantes quando paralelamente se existe uma tradição regional de encará-la, assim como outras, como lavoura de subsistência na qual seja necessário recorrer ao menor custo possível através do uso de mão-de-obra desqualificada, de descapitalização dos produtores rurais, de baixo uso de tecnologia e de organização do setor.

Considerando os dados em relação à produção de enzimas celulolíticas pelos fungos trabalhados, principalmente pelo *C. gloeosporioides*, observa-se que o estudo da sua atividade biocatalítica é relevante tanto para fitopatologia, como para indústria e meio ambiente.

Espera-se que este e outros trabalhos na área de biocatálise e de prospecção contribuam não só diretamente para economia e mercado da indústria biotecnológica, mas também, para melhoria das condições de vida no ambiente do mundo moderno, através da obtenção de combustíveis oriundos de fontes renováveis e com resíduos menos prejudiciais para atmosfera, bem como por meio da diminuição dos resíduos lignocelulósicos agroindustriais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta-Rodriguez, I., Pinon-Escobedo, C., Zavala-Paramo, M. G., Lopez-Romero Everardo, Cano-Camacho, H. 2005. Degradation of cellulose by the bean-pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. Production of extracellular cellulolytic enzymes by cellulose induction. *Antonie van Leeuwenhoek* 87:301–310.
- Ahamed, A., Vermete, P. 2008. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in Bioreactor Culture Conditions. *Biochemical Engineering Journal* 40:399-407.
- Alam, M. Z., Muyibi, S. A., Wahid, R. 2008. Statistical optimization of process conditions for cellulase production by liquid state bioconversion of domestic wastewater sludge. *BioresourceTechnology* 99: 4709-4716.
- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., Blackwell, M. 1996. *Introductory mycology*. 4th edition. New York, John Wiley.
- Almeida, J., Ferreira Filho, J. R. 2005. Mandioca: Uma boa alternativa para alimentação animal. *Bahia Agrícola* 1: 50-56.
- Almeida, M. N. 2009. *Celulases e hemicelulases de Acremonium endofíticos*. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola). 70 f. Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa.
- Amusa, N. A. 1999. Evaluation of clones for resistance to antracnose disease using phytotoxic metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *Manihots* and its correlation with field disease reactions. *Tropical Agricultural Research and Extension* 2: 116-120.
- Anand, T., Bhaskaran, R., Karthikeyan, T. R. G. M. R., Senthilraja, G. 2008. Production of cell wall degrading enzymes and toxins by *Colletotrichum Capsici* and *Alternaria alternate* Causing Fruit rot of Chillies. *Journal of Plant Protection* 4:437-451.

- Andreotti, R.E., Medeiros, J.E., Roche, C. e Mandels, M. (1980), Effects of strain and substrate on production of cellulases by *Trichoderma reesei* mutants. In.: Ghose, T.K. (ed.) *Bioconversion and Bioengineering Symposium*, Biomedical Engineering Research Centre, Indian Institute of Technology, Nova Deli, p. 353-371.
- Ângelo, R. S. 2010. Enzimas hidrolíticas. In. Esposito, E. Azevedo, J. L. (Eds.) *Fungos: Uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia*. 2nd edition. Caxias do Sul, Educs. pp. 245-260.
- Anjos, J. R. N. dos., Silva, M. S. , Vieira, E. A., Fialho, J. F. 2011. Principais doenças da mandioca no Cerrado. In: Fialho, J. F.,Vieira, E. A. (eds). *Mandioca no Cerrado: orientações técnicas*. Planaltina, Embrapa Cerrados. pp. 116-136.
- Aplevicz, K. S., Demiate, I. M. 2007. Caracterização de amidos de mandioca nativos e modificados e utilização em produtos panificados. *Ciência e tecnologia de alimentos* 27: 478-484.
- Aranda, E., Sampedro, I., Ocampo, J.A.I., García-Romera, I. 2004. Contribution of hydrolytic enzymes produced by saprophytic fungi to the decrease in plant toxicity caused by water-soluble substances in olive mill dry residue. *Applied Microbiological Biotechnology* 64:132–135.
- Arias, S. M. S. 2005. Patógenos Associados à Cultura da mandioca no Estado de Mato Grosso do Sul. In: *Congresso Brasileiro de Mandioca*, 11. Campo Grande. *Anais...* Campo Grande: Sociedade brasileira de mandioca/MS, 2005.
- Ávila, G. A. C. 2002. *Cultura da mandioca de mesa Informação Tecnológica*. Belo Horizonte, EMATER-MG (EMATER-MG. Boletim Técnico, 17).
- Baer, D., Gudmestad, N.C. 1995. In vitro cellulolytic activity of the plant pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Canadian Journal of Microbiology* 1: 877-888.

- Bandyopadhyay, R., Mwangi, M., Aigbe, S. O., Leslie, J. F. 2006. *Fusarium* species from the cassava root rot complex in West Africa. *Phytopathology* 96: 673-676
- Bajpai, P. 1999. Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnology Progress* 15: 147-157.
- Ballesteros, M. 2001. Estado del desarrollo tecnológico del aprovechamiento de biomasa: Biocombustibles para el sector del transporte. *Energía* 161: 29-34.
- Bhat, M. K. 2000. Cellulases and Related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18: 355-383.
- Banito, A. Verdier, V. K, Essotina, K., Wydra, K. 2007. Assessment of major cassava diseases in Togo in relation to agronomic and environmental characteristics in a systems approach. *African Journal of Agricultural Research* 9: 418-428.
- Baptista, N. M. Q., Santos, A. C. , Arruda, F. V. F., Gusmão, N. B. 2012. Produção das Enzimas Lignina Peroxidase e Lacase por Fungos Filamentosos. *Scientia Plena* 1: 23-31.
- Barnett, H. L., Hunter, B. B. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*, 4th edition. St. Paul, American Phytopathological Society.
- Basso, T. P., Gallo, C. R., Basso, L. C. 2010. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-acúcar e madeira em decomposição. *Pesquisa agropecuária brasileira* 11: 1282-1289.
- Bastos, C.N. 2005. Produção de enzimas extracelulares por *Crinipellis perniciosa*. *Fitopatologia Brasileira* 30: 286-288.
- Bateman, D.F., Basham, H.G. 1976. Degradation of plantcell walls and membranes by microbial enzymes. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 2: 316-355.

- Bauermeister, A., Messias, J.M., Dekker, R.F.H., Barbosa, A. M., Rezende, M.I. 2009. Avaliação da produção de lipase e lacase por Ascomiceto do Gênero *Botryosphaeria* em Óleo de mamona como fonte de carbono. In: *Semana de Biotecnologia*, 5. Londrina. *Anais...*Londrina: Departamento de Bioquímica e Biotecnologia/ UEL. 2009.1 CD-ROM.
- Bedendo, I. P. Manchas Foliares. 1995. In: Bergamin Filho, A., Kimati, H., Amorim, L.. *Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas v. 1*. 3ª edição, São Paulo, Ceres. pp. 848-858.
- Berger, R. D. 1973. Infection rates of *Cercospora apii* in mixed populations of susceptible and tolerant celery. *Phytopathology* 63: 535-537.
- Bisaria, V. S., Ghose, T. K. 1981. Biodegradation of cellulosic materials – substrates, microorganisms and enzymes and products. *Enzyme and Microbial Technology* 2: 90-104.
- Bollag D. M, Rozycki M. D., Edelstein S. J. (eds.). 1996. *Protein methods*, 2nd edition. Wiley, New York.
- Bon, E. P. S., Costa, R. B., Silva, V. A., Leitão, V. S. F., Freitas, S. P., Ferrara, M. A. 2008. Mercado e perspectivas de uso de enzimas industriais e especiais no Brasil. In: Bon, E. P. S., Ferrara, M. A., Corvo, M. L. (Eds.) *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro, Interciência, pp. 463-488.
- Booth, C. 1971. *The genus Fusarium*. Kew, Commonwealth Mycological Institute.
- Bortolazzo, N. G. 2011. *Isolamento e Seleção de Fungos Celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar*. Dissertação (Mestrado em Ciências). 77f. Escola Superior Agricultura, Universidade de São Paulo.
- Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

- Bueno, C. J., Fischer, I. H., Rosa, D. D., Furtado, E. L. 2009. Produção de enzimas extracelulares por *Fusarium solani* de maracujazeiro amarelo. *Tropical Plant Pathology* 5: 343-346.
- Carlile, M. J. Watkinson, S. C., Gooday, C.H. 2001. *The fungi*. 5th Edition. Londres, Academic Press Ltd.
- Castro, A. M. 2006. Produção e propriedades de celulasas de fungos filamentosos obtidas a partir de Celulignina de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Dissertação (Mestrado em Bioprocessos). 87f. Universidade Federal do rio de Janeiro.
- Castro, A. M., Carvalho, M. L. A., Leite, S. G. F., Pereira Júnior, N. 2010. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 37: 151-158.
- Castro, A. M., Pereira Júnior, N. 2010. Produção, propriedade e aplicação da celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova* 33: 181-188.
- Cavalcanti, J. 2001. *Material de plantio de mandioca no semiárido*. Petrolina, MAPA: EMBRAPA. (MAPA: EMBRAPA. Circular técnica, 60).
- Cereda, M. P.(Coord.). 2002. *Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas* .v. 2. São Paulo, Cargill.
- Cereda, M. P., Daiuto, E. R., Vilpoux, O. F. *Metodologia de determinação de amido digestão ácida em microondas*. Disponível em: <http://www.abam.com.br/reveista8/metodologia01>>Acesso em: 01 abril 2005.
- Chester, K.S. 1950. Plant disease losses: their appraisal and interpretation. *Plant Disease Reporter* 193:190-362.
- Chupp, C. A. 1954. *Monograph of the fungus Genus Cercospora*. New York, Ithaca.

- Coelho, M. A. Z., Salgado, A. M., Ribeiro, B. D. 2008. Tecnologia enzimática. Rio de Janeiro, FAPERJ.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. *Conjuntura sobre a raiz, farinha e fécula*. Câmara setorial da cadeia produtiva de mandioca e derivados, Brasília, CSCPNB-CONAB (CONAB, Apresentação). Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/camaras_setoriais/mandioca/ Acesso em: 13 agosto 2012.
- CONAB - Estudos de prospecção de mercado. Safra 2012/2013. Brasília - DF, setembro de 2012. Câmara setorial da cadeia produtiva de mandioca e derivados, Brasília, CSCPNB- 148p. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivosProspecção_12_13.pdf. Acesso em 16 julho 2013.
- Conceição, A. J. *A mandioca*. 1983. 3ª edition. São Paulo, Nobel.
- Correia, R. T. P. 2004. *Estudo do cultivo semi-sólido de Saccharomyces cerevisiae e Rhizopus oligosporus em resíduo de abacaxi*. Tese (Doutorado em Engenharia Química). 163f. Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- Cunha, R. T. 1999. *Aplicação de enzimas em processos industriais têxteis*. Monografia (Graduação em Engenharia química) 122f. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Devi, M. C., M. Kumar, S. 2012. Production, Optimization and Partial purification of Cellulase by *Aspergillus niger* fermented with paper and timber sawmill industrial wastes. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 1:120-128.
- Deshpande, V., Eriksson, K. E. 1988. 1,4-β-D-glucosidases of *Sporotrichum pulverulentum*. In: Wood, W. A., Kellogg, S.T. (Eds). *Methods in Enzymology*. San Diego, Academic Press, pp. 415-424.

- De Vries, R. P. 2003. Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes, relevance for industrial production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61: 10-20.
- Dominguez, C. E., Ceballos, L.F., Fuentes, C. 1982. *Morfologia de la planta de yuca*. In. *Yuca: Investigacion, produccion y utilizacion*. Cali, Colombia. pp. 29-49.
- Dutta, T., Sahoo, R., Sengupta, R., Ray, S. S., Bhattacharjee, A., Ghosh, S. 2008. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35: 275–282.
- Eida, M. F., Nagaoka, T., Wasaki, J., Kouno, K. 2011. Evaluation of Cellulolytic and Hemicellulolytic Abilities of Fungi Isolated from Coffee Residue and Sawdust Composts. *Microbes Environmental* 3: 220–227.
- Esposito, E., Azevedo, J. L. 2010. *Fungos: Uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia*. 2^a edition. Caxias do Sul, EDUCS.
- FAO (Fundation Agricultural Organization). *Participação dos continentes na produção mundial de mandioca em 2008*. FAOSTAT Database Gateway – FAO. Roma, Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/013/al969e/al969e00.pdf> Acesso em 30 jun 2012.
- Farinas, C. S., Lemo, V., Rodríguez-Zúñiga, U. F., Neto, V. B., Couri, S. 2008. *Avaliação de Diferentes Resíduos Agroindustriais como Substratos para a Produção de Celulases por Fermentação Semi-sólida*. São Carlos: Embrapa-SP, (Embrapa/SP: Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 22).
- Fernandes, C. F., Santos, M. R. A., Silva, D. S. G., Santiago, V., Alves, A. A., Santana, T. C. de J., Nunes, A. M. L. 2006. *Levantamento dos principais agentes fitopatogênicos presentes em culturas no Estado de Rondônia*. Rondônia: Embrapa-RO, (Embrapa/RO: Documento, 108).

- Fernandes, L. P., Ulhoa, C. J., Asquieri, E. R., Monteiro, V. N. 2007. Produção de Amilases pelo Fungo *Macrophomina Phaseolina*. *Revista de farmácia* 4: 43-51.
- Fernandes, M. L. M. 2006. *Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise*. Tese (Doutorado em Química). 130f. Setor de Ciências Exatas. Universidade Federal do Paraná.
- Ferreira, D.F. (2006). SISVAR: System Statistical Analysis for balanced data. UFLA/DEX, Lavras, Software.
- Ferreira, V. 2010. *Produção de β -D-glucosidase em *Saccharomyces cerevisiae* recombinante e avaliação de seu emprego no processo de hidrólise enzimática simultânea à fermentação para a produção de etanol de segunda geração*. Tese (Doutorado em Ciências). 134f. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Ferreira, J. B., Nascimento, G. O., Neves, Y. Y. B., Gomes, F. A., Nascimento, L. O. 2012. Levantamento de doenças e avaliação da incidência e severidade da mancha branca (*Cercospora caribaea*) em mandiocais na região do Alto Juruá, acre. *Enciclopédia biosfera* 712-723.
- Fialho, J. F., Vieira, E. A (Eds). 2011. *Mandioca no Cerrado: orientações técnicas*. Planaltina, Embrapa Cerrados, 208 p.
- Fokunang, C. N., Akem, C. N., Ikotun, T., Dixon A.G.O. Effect of planting season on cassava anthracnose disease development. *Crop Protection* 18: 407-413.
- Foloni, J. S.S., Tiritan, C. S., Santos, D. H. (2010). Avaliação de Cultivares de Mandioca na Região Oeste do Estado de São Paulo. *Agrarian* 7: 44-50.
- Franco, C.M.L., Daiuto, E.R., Demiate, I.M., Carvalho, L.J.C.B., Leonel, M., Cereda, M. P., Vilpoux, O. F., Sarmiento, S.B.S. 2001. *Propriedades gerais do amido*. v. 1. Campinas, Fundação Cargill.

- Fry, W.E. 1978. Quantification of general resistance of potato cultivars and fungicide effects for integrated control of potato late blight. *Phytopathology* 68: 1650-1655.
- Fukuda, W.M.G. 1999. Melhoramento da Mandioca. In: Borém, A. (Ed.). *Melhoramento de espécies cultivadas*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, p. 409-428.
- Furlaneto, F.P.B., Kanthack, R.A.D., Bonissoni, C. 2009. *O agronegócio da mandioca na região paulista do médio Paranapanema*. Análises e indicadores do agronegócio n. 4. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=5280> Acesso em 09 de set. 2010.
- Gashe, B. A. 2008. Cellulase production and activity by *Trichoderma* sp. A-001 1: 79-82.
- Gautam, S.P., Bundela, P.S., Pandey, B.S., Jamaluddin, A.K., Awasthi, M.K., Sarsaiya, S. (2012). Diversity of Cellulolytic Microbes and the Biodegradation of Municipal Solid Waste by a Potential Strain. *Journal of Microbiology*. ID 325907. <http://www.hindawi.com/journals/ijmb/2012/325907/>. Acesso em: 23 de junho de 2013.
- Ghose, T. K. 1987. Measurement of Cellulase Activities. *Pure and Applied Chemistry* 59: 257-268.
- Gomes, D. N. F. 2007. *Diversidade e potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco*. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos). 94 f. Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco.
- Grimm, L. H., Kelly, S., Krull, R., hempel, D., C. 2005. Morphology and productivity of filamentous fungi. *Applied microbiology Biotechnology* 69: 375-384.
- Gübitz, G. M., Mansfield, S. D., Böhm, D., Saddler, J. N. 1998. Effect of endoglucanases and hemicellulases in magnetic and flotation deinking of xerographic and laser-printed papers. *Journal of Biotechnology* 65: 209-215.

- Gulick, R. 1983. *Genetic Resources of cassava and wild relatives*. Rome, IBPG.
- Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K. D. 1996. Production of fungal xylanases. *Bioresource Technology* 58: 137-161.
- Haros, M., Rosell, C. M., Benedito, C. 2002. Effect of different carbohydrases on fresh bread texture and bread staling. *European Food Resource Technology* 215: 425-430.
- Harpicharnchai, P., Champreda, V., Sornlake, W., Eurwilaichitr, L. 2009. A thermotolerant β -glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia* sp., with a possible use for biomass conversion to sugars. *Protein Expression and Purification* 67: 61–69.
- Herculano, P. N., Porto, T. S., Moreira, K. A., Gustavo, A. S. Pinto, Souza-Motta, C. M., Porto, A. L. F. 2011. Cellulase Production by *Aspergillus japonicus* URM5620 Using Waste from Castor Bean (*Ricinus communis* L.) Under Solid-State Fermentation. *Applied Biochemistry Biotechnology* 165:1057-1067.
- Hillocks, J. R., Wydra, K. 2002. Bacterial, Fungal and nematode diseases. In: Hillocks, J. R., Thresh, J. M., Bellotti, A. C. *Cassava: Biology, production and utilization*. New York, CABI publishin. pp. 261-280.
- IBGE – ESTATÍSTICA DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA- Rio de Janeiro: IBGE – Departamento de Documentação e biblioteca- CDDI. Disponível: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/Ispa/estProdAgr_201303.pdf> Acesso 23 abril 2013.
- IBGE – LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA- Rio de Janeiro: IBGE – Departamento de Documentação e biblioteca- CDDI. Disponível: <[http:// www.ibge.gov.br/home/estatpisttica/indicadores/agropecuaria/Ispa](http://www.ibge.gov.br/home/estatpisttica/indicadores/agropecuaria/Ispa)> Acesso 13 agosto 2012.
- IBGE - PRODUÇÃO AGRÍCOLA MUNICIPAL IBGE- Rio de Janeiro: IBGE - Sistema IBGE de recuperação automática – SIDRA. Disponível: <[http:// www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)> Acesso 23 abril 2008.

- James, W. C., Shik, C. S. 1973. Relationship between incidence and severity of powdery mildew and leaf rust on wheat. *Phytopatology* 1: 183-187.
- Kang, S. W., Park, Y. S., Lee, J. S., Hong, S. I., Kim, S. W. 2004. Production of cellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource of Technology* 91: 153-156.
- Kaushal, R., Sharma, N., Tandon, D. 2012. Cellulase and xylanase production by co-culture of *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum* utilizing forest waste. *Turkish Journal of Biochemistry* 1: 35–41.
- Kavanagh, K. 2005. *Fungi: Biology and Applications*. England, John Wiley & Sons.
- Kikot, G. E., Hours, R.A., Alconada, T. M. 2010. Extracellular Enzymes of *Fusarium graminearum* Isolates. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 4: 779-783.
- Kimati, H., Amorim, L. 2005. Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas v. 2. 4 edn. Ceres, São Paulo.
- Kubicek, C.P., Messner, R., Gruber, F., Mach, R.L., Kubicek-Pranz, E. M. 1993. The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. *Enzyme and Microbial Technology* 15: 90-99.
- Kuhad, R. C., Gupta, R., Singh, A. 2011. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research* Article ID 280696. Disponível: SAGE-Hindawi Access to Research. Acesso em 23 janeiro 2013.
- Le Clinche, F., Pinaga F., Ramón, D., Vallés, S. 1997. β -D L-arabinofuranosidases from *Aspergillus terreus* with potential application on enology: induction, purification and characterization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 45: 2379-2383.
- Leite, R. M. V. B. C., Maringoni, A.C. 2002. Mandioca: Principais doenças e seu controle. In. Cereda, M. P. (Coord.). *Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas* v. 2. São Paulo, Cargill, pp. 275-301.

- Lima Filho, R. M., Oliveira, S. M. A., Menezes, M. 2003. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. associados a doenças de pós-colheita. *Fitopatologia Brasileira* 28: 620-625.
- Liming, X., Xueliang S. 2004. High-yeld production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. *Bioresource Technology*. 91: 259-262.
- Lin, Y., Tanaka, S. 2006. Ethanol Fermentation From Biomass resources: Current state and prospects. *Applied Microbiology biothechnology* 26: 627-642.
- Lopes, E. B. , Melo,S.A.P . 1988. *Levantamento das doenças da mandioca no Estado da Paraíba*. João Pessoa: EMEPA-PB, (EMEPA-PB: Comunicado Técnico, 12).
- Lozano, J.C. 1989. Outbreaks of cassava diseases and losses induced. *Fitopatologia Brasileira* 14: 7-11.
- Lozano, J. C., Booth, R. H. 1974. Diseases of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Pest articles and Summaries* 20: 30-54.
- Lynd, L.R., Weimer, P. J., Van Zil, W. H., Pretorius, I. S. 2002. Microbial Cellulose Utilization: *Fundamentals and Molecular Biology Rewiews* 3: 506-577.
- Lynd, L.R., Wyman, C.E., Gerngross, T.U. 1999. Biocommodity Engineering. *Biotechnology Progress* 15: 777-793.
- Maciel, M., Ottoni, C., Santos, C., Lima, N., Moreira, K., Souza-Motta, C. 2013. Production of Polygalacturonases by *Aspergillus* section *Nigri* Strains in a Fixed Bed Reactor. *Molecules* 2: 1660-1671.
- Madden, L.V. 1980. Quantification of disease progression. *Protection Ecology* 2: 159-176.

- Maeda, R. N., Serpa, V. I., Rocha, V. A. L., Mesquita, R. A. A., Santa Anna, L. M. M. , Castro, A. M., Driemeier, C. E., Pereira Júnior, N., Polikapov, I. 2011. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. *Process Biochemistry* 46: 1196-1201.
- Maheshwary, R., Bharadwagh, G., Bhat, K. M. 2002. Thermophilic Fungi: Their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 3: 506-577.
- Maia, M. de M. D., Morais, M. M. C., Morais Júnior, M. A. de., Melo, E. H.M., Lima Filho, J. L. de. 1999. Production of Extracellular Lípase by the phytopatogenic fungus *Fusarium Solani* FS1. *Revista de Microbiologia* 30: 304-309.
- Makut, M. D., Godiya, E. M.. 2010. A survey of cellulolytic mesophilic fungi in the soil environment of Keffi Metropolis, Nasarawa State, Nigeria. *African Journal of Microbiology Research* 21: 2191-2195.
- Maliki, S. K., Mukhtari, H., Farooqi, A. A., Ikram-ul-haq, M. 2010. Optimization of process parameters for the biosynthesis of cellulases by *Trichoderma viride* Pakistan Journal of Botany 42: 4243-4251.
- Marasimha G, Sridevi A, Buddolla V, Subhosh CM, Rajasekhar RB. 2006. Nutrient effects on production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger*. *African Journal of Biotechnology* 5: 472-476.
- Marchi, C.E., Borges, M. F., Mizubuti, E.S.G. 2006. Amilolytic and pectinolytic activities of *Alternaria solani* and aggressiveness in tomato plants. *Summa Phytopathologica* 32: 345-352.
- Martin, F. W. 1974. Introduction. In: Phillip, T. P. *Cassava utilization and potential markets*. Ottawa, IDCR, pp. 1-3.

- Martin, N. 2010. *Purificação e caracterização da poligalacturonase termoestável produzida pela linhagem fúngica Thermomucor indicae-seudaticae N31 em fermentação em estado sólido e submersa*. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). 103f. - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.
- Martins, L. F. 2005. Caracterização do complexo celulásico de *Penicilium echinulatum*. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). 121 f. Centro de Ciências Tecnológicas. Universidade Federal do Paraná.
- Martin, C., Thomsen, A. B. 2007. Wet oxidation pretreatment of lignocellulosic residues of sugarcane, rice, cassava and peanuts for ethanol production. *Journal Chemical Technology Biothechnology* 82: 174-181.
- Massola, N. S., Bedendo, I. P. 2005. Doenças da Mandioca. In: Kimati, H., Amorim, L., Rezende, J.A.M., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A. (Eds.). *Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas*. 4ª. Ed. São Paulo: Ceres. v.2, pp. 449-455.
- Mattos, P. L. P. , Gomes, J. C., Farias, A. R. N., Fukuda, C. 2002. Cultivo da Mandioca nas Regiões Norte e Nordeste do Brasil. In: CEREDA, M. P.(Coord.). 2002. *Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas* v. 2. São Paulo, Cargill, pp. 275-301.
- McMillan, J. D. 1994. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P. (Eds.), *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*. *American Chemical Society* 1: 292–324.
- Melo, S.A.P., Tokeshi, H. 1980. Etiologia da Podridão das raízes da Mandioca. *Agropecuária Técnica* 2: 162-164.
- Mendgen, K. M. , Hahn, H. 1996. Deising. Morphogenesis and Mechanisms of Penetration by Plant Pathogenic Fungi. *Annual Review of Phytopathology* 34: 364-386.

- Michereff, S.J., Pedrosa, R.A., Noronha, M.A., Martins, R.B., Silva, F.V. 1998. Escala diagramática e tamanho de amostras para avaliação da severidade da mancha parda da mandioca (*Cercosporidium henningsii*). *Agrotrópica* 3: 143-148.
- Mielenz, J. R. 2001. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. *Current Opinion in Microbiology* 4: 324–329.
- Miettinen-Oinonen A., Londesbourogh, J., Joutsjoki, V., Lantto, R., Vehmaanperä J., Primalco, L. 2004. Three cellulases from *Melanocarpus albomyces* for textiles treatment at neutral pH. *Enzyme and Microbial Technology* 34: 332-341.
- Morais, M.S., Nascimento, L.C., Moreira, K.A., Cavalcanti, M.S., Oliveira, N.T. 2013. Levantamento e avaliação da incidência das doenças da mandioca no estado da Paraíba. *Summa Phytopathologica* 3: 204-206.
- Moreira, F. G., Reis, S. dos., Costa, M. A. F., Souza, C. G. M. de, Peralta, R. M. 2005. Production of Hydrolytic Enzymes by the Plant Pathogenic Fungus *Myrothecium verrucaria* in Submerged Cultures. *Brazilian Journal of Microbiology* 36: 7-11.
- Mussato, S. I., Fernandes, M., Milagres, A. M. M. 2007. Enzimas: poderosa ferramenta na indústria. *Ciência Hoje* 242: 28-33.
- Naghavi, N., S. 2013. Partial Purification and Immobilization of Cellulase Enzymes from the Fungus *Aspergillus terreus* Isolated from Rotten Wood. *Journal of Life Sciences and Technologies* 1: 7-9.
- Narasimha, G., Sridevi, A., Buddolla, V., Subhosh C. M., Rajasekhar, R. B. 2006. Nutrient effects on production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger*. *African Journal of Biotechnology* 5: 472-476.
- Nechet, K. L., Halfeld-Vieira, B. de A. 2010. *Identificação e Manejo de Doenças da Mandioca em Roraima*. Boa Vista, EMBRAPA (EMBRAPA: Comunicado Técnico, 53).

- Notaro, K. A., Medeiros, E. V., Silva, C. A. D., Barros, J. A. 2013. Prospecção de fitopatógenos associados á podridão radicular da mandioca em Pernambuco, Brasil. *Bioscience Journal* 5: 1832-1839.
- Nunes Irmão, J., Figueiredo, M. P., Pereira, L. G. R., Ferreira, J. Q., Rech, J. L., Oliveira, B. M. 2008. Composição química do feno da parte aérea da mandioca em diferentes idades de corte. *Revista Brasileira Saúde Produção Animal* 1: 158-169.
- Nunes, L. B., Santos, W. de J., Cruz, R. S. 2009. Rendimento de Extração e Caracterização química e funcional de féculas de mandioca da região do semi-árido baiano. *Alimentos e Nutrição* 20: 129-134.
- Neves, Y.Y.B., Ferreira, J.B., Nascimento, G.O., Ferreira, R.C.S.L. 2009. Levantamento de doenças associadas à cultura da mandioca na região do Alto Juruá, Acre. In: *Congresso de fitopatologia*, 42. Rio de Janeiro. *Anais...* Rio de Janeiro: Sociedade brasileira de fitopatologia. Volume 34 (Suplemento) I a LIII - S1 a S370, 2009.
- Ogeda, T. L., Petri, D. F. S. 2010. Hidrólise enzimática de biomassa. *Química Nova* 7: 1549-1558.
- Okunowo, W. O., Gbenle, G. O., Osuntoki, A. A., Adekunle, A. A., Ojokuku, S. A. 2010. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by a phytopathogenic *Myrothecium roridum* and some avirulent fungal isolates from water hyacinth. *African Journal of Biotechnology* 7:1074-1078.
- Oliveira, A. C. D., Watanabe, F. M. F., Rodrigues, M. L. F. 2011. Comparação entre Fermentação no estado sólido e fermentação submersa para produção de α -D-amilases por *Penicillium* sp. e Caracterização da Enzima. *Biociência, Biotecnologia e Saúde* 1: 12-14.
- Oliveira, S. P. 2007. *Efeito da poda e de épocas de Colheita sobre características agrônômicas da mandioca*. Dissertação (Mestrado em Agronomia). 75f. Centro de Ciências Agrícolas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

- Oliveira, A. M. G, Cardoso, C. E. L. Silva, J. Ferreira Filho, J. R., Dita, M. A. R. 2008. Doenças da mandioca. In: EMBRAPA. *Curso sobre o cultivo da mandioca*. Cruz das Almas: EMBRAPA – CNPMFT. 2008.
- Ortega, J. 1994. Cell wall degrading enzymes produced by the phytopathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal Texas Science* 4: 329-335
- Paula, R. S., Oliveira, W. F. 2003. Resistência de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) ao patógeno *Alternaria solani*. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 2: 89-95.
- Paiva, C. L. A., Sá-Pereira, P. A aplicação da biologia molecular na produção de enzimas. In: Bon, E. P. S., Ferrara, M. A., Corvo, M. L. (Eds.) *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro, Interciência, pp. 29-53.
- Silva, D. C. V., Tiago, P. V., Matto, J. L. S., Paiva, L. M., Sousa-Motta, C. M. 2011. Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do Município de Bom Jardim com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. *Revista Brasileira de Botânica* 4:607-610.
- Pandey, A. 2002. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 3636: 1-4.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Mitchell, D. 2000. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry* 35: 1153-1169.
- Pappagianni, M. 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances* 22: 189-259.
- Park, E.Y., Kazuya, Naruse, K., Tatsuya, K. 2011. Improvement of cellulase production in cultures of *Acremonium cellulolyticus* using pretreated waste milk pack with cellulase targeting for biorefinery. *Bioresource Technology* 102: 6120–6127.
- Pascholati, S. F. 1995. Fitopatógenos: Arsenal Enzimático. In: Bergamin Filho, A., Kimati, H., Amorim, L. (Ed.). *Manual de Fitopatologia*. Princípios e Conceitos, São Paulo, Ceres. pp. 343-64.

- Paterson, R.R.M., Bridge, R.L.D.L. 1994. Biochemical techniques for filamentous fungi. Cambridge. CAB International.
- Pelach, M. A., Pastor, F. J., Vilaseca, F., Mutje, P. 2003. Enzymic deinking of old newspaper with cellulase. *Process Biochemistry*, London 38: 1063-1067.
- Philippidis, G. P., Smith, T. K., Wyman, C. E. 1993. Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process. *Biotechnology and Bioengineering* 41: 846–853.
- Pinheiro, T. L. F. Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como micro-organismo. Dissertação (mestrado em Engenharia de Alimentos). 106f. Centro de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões.
- Pinto, F. C. 2010. Aspectos da cadeia Produtiva da mandioca em Feira de Santana no Distrito de Maria Quitéria (povoados de Lagoa Grande e Olhos d'água das Moças). *Revista de Administração e Contabilidade* 1: 65-75.
- Poltronieri, L. S., Trindade, D. R., Albuquerque, F. C., Duarte, M. L. R., Cardoso, S. S. 2002. Incidência de *Fusarium solani* em mandioca no Estado do Pará. *Fitopatologia Brasileira* 5: 544.
- Poltronieri, L.S., Trindade, D.R., Silva, H.M. 1993. Podridão mole de raízes de mandioca induzida por *Phytophthora drechsleri* e *Phytophthora nicotianae* var. parasitica no Estado do Pará. *Fitopatologia Brasileira* 18: 282-283.
- Poltronieri, L. S., Trindade, D.R., Silva, H. M., Albuquerque, F. C. 1997. Patógenos associados a podridão mole de raízes de mandioca no estado do Pará. *Fitopatologia Brasileira* 22: 111-112.
- Poorna, C.A., P. Prema, 2006. Production and partial characterization of endoxylanase by *Bacillus pumilus* using agro industrial residues. *Biochemical Engineering Journal* 2: 106-112.

- Prakash P, Manoharachary C, Bochow H. (1989) Cellulolytic enzyme production by the mango anthracnose fungus *Colletotrichum gloeosporioides* Penz *Zentralb für Mikrob* 5: 341–343.
- Ramanathan, G., Banupriya, S., Abirami, D. 2010. Production and Optimization of Cellulase from *Fusarium oxysporum* by submerged fermentation. *Journal of Scientific & Industrial research* 69: 454-459.
- Rashid, S. S., Alam, M. Z., Karim, M. I. A., Salleh, M. H. 2009. Optimization of the nutrient suppliments for cellulase production with the basal médium palm oil Mill effluent. *World Academy of Science, Engineering & Technology* 36: 811-817.
- Reczey, K., Szengyel, Z., Eklund, R., Zacchi, G. 1996. Cellulase production by *Trichoderma reesei*. *Bioresource Technology* 5: 25-30.
- Ribeiro, M. N. O., Carvalho, S. P., Pereira, F. J., Castro, E. M. 2012. Anatomia foliar de mandioca em função do potencial para tolerância à diferentes condições ambientais. *Revista Ciência Agronômica* 2: 354-361.
- Riker, A.J. ,Riker, R.S. 1936. Introduction to research on plant diseases. St. Louis, John S.Swift.
- Rocha, C. P. 2010. *Otimização da produção de enzimas por Aspergillus niger em fermentação em estado sólido*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). 161f. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlandia.
- Rodriguez, J. L. 2002. *Atlas da Paraíba: espaço geo-histórico e Cultural*. 3ª edição, João Pessoa, Grafset.
- Rodriguez-Zuniga, U. F., Farinas, C. S., Bertucci Neto, V., Couri, S., Crestana, S. 2011. Produção de celulasas por *Aspergillus Níger* por fermentação em estado sólido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 8: 912-919.
- Rogers, D. J. 1963. *Studies of Manihot esculenta crantz and related species*. New York, Bulletin of the torrey botanical club, 90: 43-54.

- Rondon, A. C. F. 2003. *Atividade de fungos endofíticos isolados de Manihot esculenta* Crantz. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) 50f. Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas.
- Ryan, C.A. 1973. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. *Annual Review Plant Physiology* 24: 173-196.
- Sadhu, S., Maiti, T. K. 2013. Cellulase Production by Bacteria: A Review. *British Microbiology Research Journal* 3: 235-258.
- Santos, A. S. 2011. *Produção, concentração e caracterização parcial de extrato celulolítico produzido por linhagem fúngica mutante* Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de alimentos) 93 f. Centro de Ciências de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Santos, R.P., Carmo, M.G.F., Parraga, M.S., Macagnan, D., Lopes, C.A. 2004. Avaliação de cultivares de mandioca, para consumo in natura, quanto à resistência à mancha parda da folha. *Horticultura Brasileira* 2: 232-237.
- Santos, E. 2008. *Utilização de enzimas produzidas por Trichoderma reesei e Aspergillus niger na extração de óleos essenciais*. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas). 125 f. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- SAS Institute. *SAS Technical Report*. SAS/STAT software: Changes and Enhancement, Release 6.07, Cary NC: SAS Institute. 1992.
- Schimidell, W., Facciotti, M. C. R. 2001. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: Schmidell, W. , Lima, U. A. , Aquarone, E. , BorzaniI, W. (Eds.), *Biotechnologia Industrial*, São Paulo: Edgard Blücher v.2, pp.179-190.
- Senaratna LK, Wijesundera RLC, Liyanage AS (1991). Morphological and physiological characters of two isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from rubber (*Hevea brasiliensis*). *Mycol Res* 9: 1085-1089 doi: 10.1016/S0953-7562(09)80552-2.

- Serra, I. M. R. de S., Silva, G. S. da, Nascimento, F. S., Lima, L. K. F. 2009. *Scytalidium lignicola* em mandioca: ocorrência no Estado do Maranhão e reação de cultivares ao patógeno *summa phytopathologica* 4: 327-328.
- Silva, D. C. V., Tiago, P. V., Matto, J. L. S. de, Paiva, L. M., Souza-Motta, C. M. de. 2011. Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do Município de Bom Jardim com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. *Revista Brasileira de Botânica* 4: 607-610.
- Silva, D. C. V., Tiago, P. V., Matto, J. L. S. de, Paiva, L. M., Souza-Motta, C. M. de. 2011. Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do Município de Bom Jardim com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. *Revista Brasileira de Botânica* 4: 607-610.
- Silva, L. A. D. 2008. *Produção e caracterização de enzimas celulásicas por Aspergillus phoenicis*. Dissertação (mestrado em Microbiologia e meio ambiente). 105 f. Instituto de ciências básicas e da saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Silva, R., Lago, E. S., Merheb, C. W., Macchione, M. M., Park, Y. K., Gomes, E. 2005. Produção de xilanase e CMCase por fermentação em estado sólido em diferentes resíduos pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* miehe. *Brazilian Journal of Microbiology* 3: 235-241.
- Singh, A., Hayashi, K. 1995. Microbial Cellulases: Protein Architecture, molecular properties and biosynthesis. *Advances in Applied Microbiology* 40: 1-44.
- Singh, A., Singh, N., Bishnoi, N R. 2009. Production of Cellulases by *Aspergillus Heteromorphus* from wheat straw under submerged fermentation. *International Journal of Civil and Environmental Engineering* v. 1, n.1. Disponível em: http://idc-online.com/technical_references/pdf/civil_engineering/Production%20of%20Celulases.pdf

- Singhania, R.R., Sukumaran, R.K., Patel, A.K., Larroche, C., Pandey, A. 2010. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology* 46: 541-549.
- Silva, L. R. C., Santos, C., Lima, J. S., Fernandes, M. J. S., Moreira, K. A., Souza-Motta, C. M. 2013. Diversity of *Penicillium* in soil of Caatinga and Atlantic Forest areas of Pernambuco, Brazil: an ecological approach. *Nova Hedwigia* 97: 543-556.
- Silva, M. F. 1984. *Esporulação e patogenicidade de Cercospora caribea* Chupp & Ciferri e *Cercospora henningsii* Allescher, agentes causais de manchas foliares em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Dissertação (Mestrado em Criptógamos). 89f. Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco.
- Silva, M. K. D. 2013. *Avaliação da sustentabilidade na produção de mandioca no município de Pedras de fogo – PB*. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional). 138f. Pró-reitoria de Pós-graduação e Pasquisa, Universidade Estadual da Paraíba.
- Socol, C. R. 1994. *Contribuição ao estudo da fermentação no estado sólido em relação com a produção de ácido fumárico, biotransformação de resíduo sólido de mandioca por Rhizopus e Basidiomacromicetos do gênero Pleurotus*. Tese (Professor Titular. Universidade Federal do Paraná). 228 f. Universidade Federal do Paraná.
- Sousa, E. A. P., Dias, A. S. 1991. Doenças da cultura da mandioca no Maranhão. São Luiz, EMAPA. (EMAPA-MA. Comunicado técnico, 19).
- Sousa, R. B., Targino, I. 2009. Perfil da Produção Familiar Rural na Paraíba. In: *Encontro Nacional De Geografia Agrária*, 19. São Paulo. *Anais...*São Paulo: Unioeste, 2009. Resumo.
- Souza, C. de. 2009. *Acumulação de Fitomassa em variedades de mandioca submetidas a diferentes épocas de corte*. Tese (Doutorado em Agronomia). 146f. Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba.

- Stevens, B. J. H., Payne, J. 1977. *Cellulase and xylanase production by yeasts of genus Trichosporon*. *Journal of General Microbiology* 100: 381-393
- Sukumaran, R. K., R. R. Singhanian, Pandey, A. 2005. Microbial cellulases-production, applications and challenges. *Journal of Science Industrial and Research* 64:832–844.
- Sutton, B. C. 1980. *The coelomycetes*. Surrey, Commonwealth Mycological Institute.
- Sutton, B. C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Baile, J. A., Jeger, M. J. (eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford, CAB International, pp.1–26.
- Talekhar, S., Ghodake, V., Chavare, S. 2011. Production and characterization of Cellulase by local fungal isolate of India using water hyacinth as carbon source and reuse of fungal biomass for dye. *International Journal of Engineering Science and Technology* 3: 3236-3241.
- Takahashi, M. 2004. Controle das Doenças da Mandioca. *ABAM*, Curitiba, set. 2004. Seção Mandioca. Disponível em: <http://www.abam.com.br/mat_tecnicos/IAPAR%20-%20COLUNA%20M%C1RIO-doencas.doc>. Acesso em 01 novembro 2009.
- Takatsu, A., Fukuda, C. 1990. *Current status of cassava diseases in Brasil*. Ibadan, Nigéria: International Institute of Tropical Agriculture.
- Teunissen, M. J., Op den Camp, H. J. M. 1993. Anaerobic fungi and their cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Antonie van Leeuwenhoek* 63: 63-76.
- Teri, J. M., Lozano, J.C., Thurston, H. D. 1981. Epidemiology of cassava brown leaf spot. *Fitopatologia Brasileira* 3: 314-344
- Teri, J. M., Thurston, H.D., Lozano, J.C. 1980. Effect of brown leaf spot and cercospora leaf blight on cassava productivity. *Tropical Agriculture* 3: 239-243.

- Vasconcelos, W. E., Rios, M. S., Sousa, A. H., Medeiros, V., Silva, G. M. C., Maracajá, P. B. 2003. Caracterização bioquímica e enzimática de *Cunninghamella* isoladas de manguezal. *Revista de Biologia e Ciências da Terra* 2: 3. Disponível em: <<http://eduep.uepb.edu.br/rbct/sumarios/pdf/fungos.pdf>>. Acesso em 03 novembro 2009.
- Vidal, A. M., Sousa, F. V. D., Costa, M. A.P.C, Sousa, A. S. 2009. Micropropagação de variedades de mandioca cultivadas no Nordeste. In. *Congresso Brasileiro de Mandioca*, 13. Botucatu. *Anais...* Botucatu: FAPESP, 2009. Artigo.
- Walton, J. D. 1994. Deconstructing the Cell Wall. *Plant Physiology* 104: 1113-1118.
- Wen, Z., Liao, W., Chen, S. 2005. Production of cellulase/ β -glucosidase by the mixed fungi culture of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. *Applied Biochemistry Biotechnology* 5:93-104.
- Wydra, K., Verdier, V. 2002. Occurrence of cassava diseases in relation to environmental, agronomic and plant characteristics. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 93: 211–226.
- Wydra, K., Msikita, W., 1998. Overview of the present situation of cassava diseases in West Africa. In: Proceedings of the 6th Trienn. Symposium of the International Society of the Tropical Root Crops Africa Branch (ISTRC-AB). Lilongwe, Malawi, October 1995, pp. 198–206.
- Zandona Filho, A. 2001. *Modificação das qualidades processuais de fibras celulósicas através do uso de enzimas*. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos). 193 f. Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.
- Zúniga, U. F. R. 2010. *Desenvolvimento de um processo para produção de celulases específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração*. Tese (Doutorado em engenharia ambiental). 197 f. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

APÊNDICES

ANEXO A

Tabela 1. Análise de variância da incidência de doenças da mandioca em municípios da Paraíba

Doenças	Cidades	Graus de Liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados Médios	F
Mancha parda	Incidências	20	106257.21	5312.86	6.76*
	Erro	63	49480.16	785.40	
	Total	83	15573.37		
Mancha branca	Incidências	20	11990.94	599.55	89,88*
	Erro	63	419.79	6.67	
	Total	83	12410.73		
Antracnose	Incidências	20	10784.58	539.23	7.42*
	Erro	63	4573.38	72.59	
	Total	83	15357.96		
Podridão radicular	Incidências	20	2107.88	105.39	6.02*
	Erro	63	1102.68	17.50	
	Total	83	3210.56		

* Valores significativos a 5% de probabilidade

ANEXO B

Tabela 2. Correlação de Pearson entre incidências de doenças de mandioca e índice pluviométrico dos meses anteriores e exatos do levantamento de dados

Doenças	Índice Pluviométrico	
	Mês anterior	Mês exato
Mancha parda	0,48*	0,37 ^{ns}
Mancha branca	0,25 ^{ns}	0,31 ^{ns}
Antracnose	0,44*	-0,2 ^{ns}
Podridão radicular	-0,09 ^{ns}	-0,28 ^{ns}

* Significativa a 5% de probabilidade

ANEXO C

Tabela 3. Análise de variância de atividades do complexo celulolítico de *Colletotrichum gloeosporioides* e *F. oxysporum* fitopatogênicos da mandioca (*Manihot esculenta*).

	Fatores	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
FPAse	Isolados	26	1560,1	60,04	9,6*
	Erro	54	336,7	6,23	
	Total	80	1896,8		
CMCase	Isolados	26	6,605	0,254	51,8*
	Erro	54	0,268	0,0049	
	Total	80	6,873		
β G	Isolados	26	42001,7	0,079	60,7*
	Erro	54	1408,7	0,0013	
	Total	80	43410,4		