

UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA – UFOB
CENTRO MULTIDISCIPLINAR DE LUÍS EDUARDO MAGALHÃES

RENATA PEREIRA MIRANDA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES UTILIZANDO SUBPRODUTO
DE ALGODÃO COMO SUBSTRATO**

LUÍS EDUARDO MAGALHÃES

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA – UFOB
CENTRO MULTIDISCIPLINAR DE LUÍS EDUARDO MAGALHÃES

RENATA PEREIRA MIRANDA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES UTILIZANDO SUBPRODUTO
DE ALGODÃO COMO SUBSTRATO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado na Universidade Federal do Oeste da Bahia como requisito para obtenção de aprovação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II do curso de Engenharia de Biotecnologia, sob a orientação do professor Dr. Felipe da Silva Figueira.

LUÍS EDUARDO MAGALHÃES

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

M672 Miranda, Renata Pereira.

Otimização da produção de celulases utilizando subproduto de algodão como substrato. /
Renata Pereira Miranda. – 2023.

49 f.; il. color.

Orientador: Prof. Dr. Felipe da Silva Figueira.

Trabalho de Conclusão de Curso: (graduação em Engenharia de Biotecnologia) –
Universidade Federal do Oeste da Bahia. Centro Multidisciplinar de Luís Eduardo Magalhães,
Luís Eduardo Magalhães, BA, 2023.

1. Celulase – Aplicações biotecnológicas. 2. Substrato. 3. – Algodão - Resíduos.

I. Figueira, Felipe da Silva. II. Universidade Federal do Oeste da Bahia – Centro Multidisciplinar
de Luís Eduardo Magalhães. III. Título.

CDD: 660.6

BIBLIOTECAS UFOB - Biblioteca Universitária de Luís Eduardo Magalhães

RENATA PEREIRA MIRANDA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES UTILIZANDO
SUBPRODUTO DE ALGODÃO COMO SUBSTRATO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro Multidisciplinar de Luís Eduardo Magalhães da Universidade Federal do Oeste da Bahia – UFOB, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Felipe da Silva Figueira.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Felipe da Silva Figueira
Universidade Federal do Oeste da Bahia

Prof.^a Dr.^a Elida Simone Guido

Prof.^a Dr.^a Jamilly Ribeiro Lopes
Universidade Federal do Oeste da Bahia

(A versão assinada deste documento encontra-se com a coordenação de curso)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu pai (*in memoriam*) por ter sido meu maior incentivador desde o início.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe (*in memoriam*) e ao meu pai (*in memoriam*) por todo incentivo e esforço para sempre me proporcionar condições favoráveis de estudo, deixando claro desde cedo a importância da educação na formação das pessoas.

A minha irmã Carla e minha sobrinha Suzane por todo apoio, incentivo e companheirismo. A minha gratidão é eterna.

Ao grupo de pesquisa, Mateus, Stefânia e Adriana, pela amizade, conversas, incentivos e toda ajuda nos experimentos e análises dos dados. Meus sinceros agradecimentos.

Aos meus colegas e amigos, em especial Ozânia, Pedro, Kadma, Luís e Antônia, pela amizade e companheirismo ao longo desses anos.

Ao meu orientador Dr. Felipe Figueira, pela oportunidade de participar do grupo de pesquisa, por sempre estar presente orientando e compartilhando conhecimentos, e pelas contribuições dadas durante todo o processo de realização desse trabalho.

A todos os bons professores que tive durante a graduação, que mesmo diante de tantas dificuldades se mostraram firmes em suas profissões, me motivando sempre a continuar buscando conhecimento.

A todos responsáveis pelo funcionamento e manutenção da Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB), que de forma direta ou indireta tornaram possível a realização desse trabalho.

RESUMO

As celulasas são enzimas que tem a capacidade de despolimerizar as cadeias de celulose da biomassa lignocelulósica produzindo unidades de açúcares menores pela ação das endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases. Estas enzimas têm várias aplicações nas indústrias de biocombustíveis, têxtil, alimentos, dentre outras. A aplicação das celulasas na indústria é restrita pelo seu custo de produção. Assim, utilizar substratos e métodos de produção viáveis e otimizar a produção das celulasas é necessário para tornar o processo mais econômico. O objetivo desse trabalho foi otimizar a produção de celulasas por fermentação em estado sólido (FES) com *Penicillium janthinellum* 3921 utilizando resíduo de algodão como substrato. Após as análises dos substratos (caroço moído e mistura de torta e fibrilha), o caroço moído foi escolhido para a otimização. As análises estatísticas de Plackett-Burman (PB) com as variáveis temperatura, pH, polisorbato 80, inóculo, água e nitrogênio, indicaram um efeito significativo da água, temperatura e polisorbato 80 na produção de celulasas. Além disso, a otimização baseada no delineamento composto central rotacional (DCCR) mostrou que valores de água de 6,1 mL, temperatura de 27,9°C e 4,3% de polisorbato 80, foram ótimos para produção de celulasas.

Palavras-chave: Celulasas, resíduo de algodão, otimização.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ação das celulasas sobre a molécula de celulose	16
Figura 2 – Representação da estrutura de uma fibrila elementar da celulose.....	23
Figura 3 – Representação da parede celular vegetal.....	24
Figura 4 – Fermentação do fungo em arroz.....	28
Figura 5 - Solução de esporos do fungo	29
Figura 6 - Diagrama de Pareto dos efeitos para o DCCR.....	35
Figura 7 - Curva de nível gerada para polisorbato x água.....	38
Figura 8 – Curva de nível gerada para polisorbato x temperatura.....	38
Figura 9 – Curva de nível gerada para temperatura x água	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação de trabalhos que estudaram a produção de celulasas por <i>Penicillium</i>	20
Tabela 2 – Composição da solução de Mandels & Weber	28
Tabela 3 – Níveis dos parâmetros estabelecidos no planejamento experimental PB.....	30
Tabela 4 - Níveis dos parâmetros temperatura, concentração de polisorbato 80 e água usados no planejamento experimental da otimização (DCCR).....	30
Tabela 5 – Atividades enzimáticas obtidas para os diferentes substratos avaliados	33
Tabela 6 - Atividade enzimática obtida no PB	34
Tabela 7 - Matriz do DCCR com valores reais e a atividade enzimática máxima obtida em cada ensaio	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	JUSTIFICATIVA	13
3	OBJETIVOS	14
3.1	Objetivo Geral	14
3.2	Objetivos específicos	14
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
4.1	Enzimas	15
4.2	Aplicações das celulases	17
4.2.1	Etanol 2G	17
4.2.2	Indústria têxtil	17
4.2.3	Indústria de Ração Animal	18
4.3	Produção de celulases	19
4.3.1	Fungos	20
4.3.2	<i>Penicillium</i>	20
4.4	Fermentação em estado sólido	21
4.5	Biomassa lignocelulósica	22
4.6	Algodão	24
4.7	Produção de celulases utilizando resíduos de algodão como substrato	25
5	METODOLOGIA	27
5.1	Microrganismo	27
5.2	Inóculo	27
5.3	Seleção do substrato	29
5.4	Seleção de parâmetros	29
5.5	Otimização da fermentação	30
5.6	Recuperação das enzimas	31

5.7	Atividade de FPase	31
5.8	Determinação de açúcares redutores por DNS	31
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
6.1	Seleção do substrato	33
6.2	Seleção dos parâmetros	33
6.3	Otimização da produção de celulases	36
7	CONCLUSÃO	41
8	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	42
	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

Devido à expansão contínua da população mundial ocorre uma crescente busca por produtos sustentáveis que minimizem os impactos ambientais. A biomassa lignocelulósica surge como uma matéria-prima importante por ter grande potencial para produzir energia de fontes renováveis. Essa biomassa tem ganhado destaque nos últimos anos por ser um material de baixo custo e de grande abundância (ANTAR *et al*, 2021; VIEIRA, 2020).

Os componentes estruturais da biomassa lignocelulósica estão arranjados de modo que a celulose e hemicelulose ficam envoltas por lignina. A celulose se mantém por meio de ligações de hidrogênio e também pelas interações de Van der Waals. Os complexos de lignina-carboidratos tem importância na recalcitrância da biomassa, as ligações de hidrogênio interligam a celulose e hemicelulose. As estruturas das paredes celulares variam de acordo com a espécie (MARQUES *et al*, 2018).

A biomassa lignocelulósica, na natureza, é utilizada por fungos e bactérias como fonte de carbono. Esses microrganismos hidrolisam a celulose pela ação das celulasas, que são enzimas que conseguem degradar a celulose. Visando a aplicação comercial das enzimas, há uma busca por celulasas produzidas por microrganismos (PEIXOTO, 2019).

As celulasas são muito utilizadas industrialmente. Uma das aplicações que tem se destacado nos últimos anos é a utilização na obtenção de açúcares fermentescíveis para produção de etanol de segunda geração (etanol 2G), essa é uma aplicação que tem se destacado nos últimos anos (MARQUES, 2017). As celulasas também são aplicadas na indústria de papel; na indústria de alimentos, como por exemplo, na produção de sucos extraíndo os pigmentos do fruto; na indústria têxtil para ter tecidos mais lisos e macios; entre outras aplicações (AFONSO, 2012).

As celulasas são um complexo enzimático formado por três grupos principais de enzimas que agem sinergicamente. Essas enzimas que agem sinergicamente são: a endoglucanase, a exoglucanase e a β -glicosidase. As endoglucanases iniciam a hidrólise, o que resulta em uma rápida solubilização do polímero, as exoglucanases agem em terminais redutores e não redutores que são formados pelas endoglucanases e as β -glicosidases hidrolisam os celo-oligossacarídeos e celobiose para liberação de glicose (AFONSO, 2012).

A hidrólise enzimática apresenta como vantagem as condições moderadas de pressão e temperatura, a alta especificidade e geração de pouco ou nenhum subproduto tóxico. Assim, a hidrólise enzimática é mais comum que a química devido as essas vantagens (MARINHO *et al*, 2019; MARQUES *et al*, 2018).

Uma alternativa para produzir celulases é a fermentação em estado sólido (FES), utilizando resíduos agroindustriais como substrato. Em comparação com a fermentação submersa, a FES possui vantagens como a redução no custo da produção das celulases e obtenção de maiores produtividades (MARQUES *et al*, 2018).

Os microrganismos considerados mais adequados para a FES são os fungos filamentosos, já que se adaptam facilmente a vários tipos de biomassas, colonizando esses substratos através da produção de várias enzimas (MARQUES, 2017). São exemplos de biomassas lignocelulósicas O bagaço de cana, resíduo de algodão, palha de milho.

O algodão é uma matéria-prima muito utilizado na indústria. Por ano são gerados cerca de 25 milhões de toneladas de algodão mundialmente e grande parte é utilizado para o refinamento de fibras, e o que não é utilizado torna-se subproduto. A fibrilha é um resíduo extraído do algodão, ela é considerada um subproduto, visto que o produto principal é a pluma. A torta de algodão também é um resíduo, que é obtido na prensagem do caroço para a retirada do óleo. Esses resíduos são lignocelulósicos com potencial de ser um substrato para produção de enzimas. (BEZERRA *et al*, 2017; SILVA, 2012). No Brasil a produção de algodão se concentra no Mato Grosso e no Oeste da Bahia (OLIVEIRA, 2021).

São vários os fatores que influenciam na produção enzimática, como: pH, temperatura, teor de umidade, tempo de cultivo, quantidade de inóculo, fontes de nitrogênio, entre outros. Assim, para se ter uma maior produção enzimática a otimização das condições de cultivo se torna essencial (MARQUES *et al*, 2018).

O uso de metodologias de planejamento experimental facilita a otimização da produção enzimática, pois determina fatores que estão influenciando na produção e também a influência das suas interações. Com essas metodologias há uma diminuição no número de ensaios, pode-se estudar interações de muitos fatores, saber as interações desses fatores, estimar níveis ótimos e assim melhorar a precisão dos resultados (MARQUES *et al*, 2018). O presente trabalho teve como objetivo otimizar a produção de celulases por *Penicillium janthinellum* utilizando resíduo de algodão como substrato na FES.

2 JUSTIFICATIVA

As celulasas são enzimas que tem grande potencial na hidrólise da celulose e isso faz com que sejam funcionais em vários setores comerciais incluindo a produção de etanol utilizando biomassa lignocelulósica, melhoria da textura de alimentos, indústria têxtil, entre outras.

A viabilidade econômica do uso de celulasas requer a redução dos custos de produção e comercialização. Para atingir essa redução de custos e possibilitar aumento de produtividade, tem-se estudado a utilização de biomassa lignocelulósica, já que é um substrato de baixo valor agregado e amplamente disponível.

O algodão é um dos principais produtos do agronegócio no Brasil. De acordo com a Associação Brasileira dos Produtores de Algodão (Abrapa) a colheita da safra de 2021/2022 foi de aproximadamente de 2,5 milhões de toneladas. Para a safra de 2022/2023 é estimado uma produção de 3,1 milhões de toneladas e a área plantada é projetada em 1,78 milhão de hectares, com um crescimento de 9,3% se comparado com a safra de 21/22 que foi de 1,63 milhão de hectare. Essa produção em grande escala está diretamente ligada a produção de resíduos, principalmente no refinamento da fibra de algodão.

A celulose presente nesses resíduos de algodão tornam esse material bastante atrativo, já que tem grande potencial de serem utilizados como substrato para produção de celulasas. Devido a essa taxa de celulose é possível utilizar fungos filamentos (como o *P. janthinellum*) para a produção de celulasas por FES.

A grande produção de algodão no oeste da Bahia torna viável o estudo da obtenção de celulasas utilizando o subproduto do algodão. Assim, esse trabalho tem como objetivo otimizar a produção de celulasas por *P. janthinellum* utilizando os resíduos de algodão como substrato, na fermentação em estado sólido.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Otimizar a produção de celulases por fermentação em estado sólido (FES) com *Penicillium janthinellum* 3921 utilizando resíduo de algodão como substrato.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar diferentes substratos (caroço de algodão moído, torta e fibrilha) na produção de celulases;
- Estimar os efeitos do teor de água, nitrogênio, polisorbato 80, inóculo, pH e temperatura na produção de celulases por meio de um delineamento de Plackett-Burman (PB);
- Otimizar a produção de celulases a partir dos parâmetros selecionados usando um delineamento composto central rotacional (DCCR).

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Enzimas

As enzimas são muito importantes para a indústria, pois atuam como catalisadoras de reações bioquímicas. Elas atuam aumentando a velocidade da reação devido à diminuição de energia de ativação, e não altera o equilíbrio químico. Quando a enzima se liga a um substrato é formado o complexo enzima-substrato, esse complexo diminui a energia de ativação. O sítio ativo da enzima gera um ambiente ideal para que a reação ocorra e assim se obtém os produtos. As enzimas geralmente retornam ao seu estado original após uma reação. (PINHEIRO *et al*, 2019).

A eficiência catalítica das enzimas, normalmente é considerada maior que a de catalisadores químicos, já que tem maior especificidade. Em alguns casos são a única rota para obtenção de alguns produtos, pois não se tem alternativas químicas que sejam viáveis devido a geração de subprodutos difíceis de separar (ROMERA *et al*, 2019).

As enzimas atuam em condições brandas de pH, temperatura e pressão, e de acordo com as condições operacionais a sua atividade pode ser regulada (LIMA *et al*, 2020). Algumas enzimas necessitam da adição de outras moléculas para atuarem como uma enzima. Essas moléculas são chamadas de cofatores, e sem eles essas enzimas ficam inativas (apoenzimas), e quando é adicionado o cofator a enzima se torna ativa (holoenzima).

Todas as enzimas são proteicas, exceto um pequeno grupo de RNA catalítico. Essas enzimas proteicas são formadas por longas cadeias de aminoácidos ligadas entre si pelas ligações peptídicas (LIMA *et al*, 2020).

Existem várias enzimas que degradam materiais lignocelulósicos, dentre elas podem-se destacar as celulases, pectinases e xilanases. Uma mistura de diferentes enzimas constitui a composição do complexo enzimático e esse complexo atua na hidrólise do substrato (ARRUDA *et al*, 2019).

As celulases atuam na molécula de celulose, que é um polímero resistente e fibroso, e constitui a parede celular dos vegetais. A celulose é formada por moléculas de glicose unidas por ligações β -1,4-glicosídicas e uma molécula é ligada a outra com orientação de 180° , com cadeias não ramificadas. As regiões cristalinas são formadas, pois as cadeias são alinhadas de forma paralela e tem ligações de hidrogênio inter e intra cadeias. Mas também existem regiões

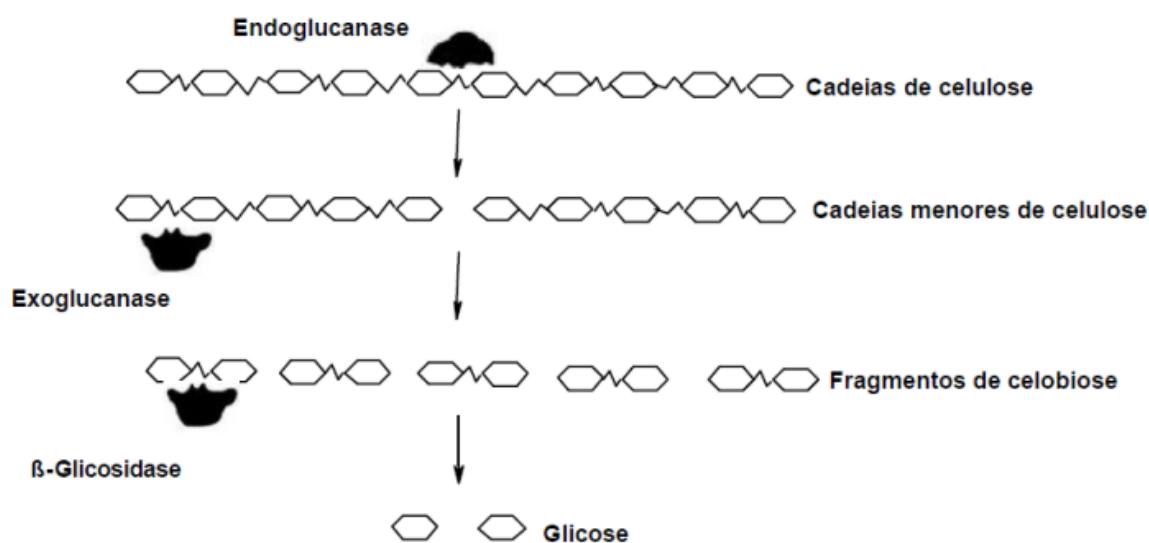
amorfas na região β -1,4-glicosídicas onde não apresentam ordenação espacial (PINHEIRO *et al*, 2019).

Só é possível ter uma conversão efetiva de celulose em açúcares simples quando as enzimas do complexo celulolítico estão atuando de forma sinérgica. A atuação conjunta das enzimas é chamado de sinergia. A atuação desse complexo celulolítico gera um maior rendimento do processo. Esse composto é formado por: endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases (ARRUDA *et al*, 2019).

A endoglucanase inicia a hidrólise atuando em regiões internas da estrutura amorfa da molécula de celulose. Dessa forma, há liberação de oligossacarídeos com diversos graus de polimerização e extremidades na cadeia com terminal redutor e outro não redutor (PINHEIRO *et al*, 2019). As exoglucanases atuam em terminais redutores e não redutores. Já as β -glicosidases hidrolisa a celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose (ARRUDA *et al*, 2019).

As celulasas são diferentes das outras enzimas do grupo das glicosil-hidrolases, pois tem capacidade de hidrolisar as ligações β -1,4-glicosídicas. Assim, esse tipo de enzima é muito utilizado em diversos processos industriais, como na indústria têxtil, de alimentos, detergentes, produção de biocombustíveis, entre outras (PINHEIRO *et al*, 2019) A Figura 1 mostra as celulasas formadas por três componentes enzimáticos as endoglucanases, as celobiohidrolases (exoglucanases) e as β -glicosidases.

Figura 1 - Ação das celulasas sobre a molécula de celulose



Fonte: modificado de WRIGHT *et al* (1988)

4.2 Aplicações das celulases

Por ter grande relevância na produção de etanol, na indústria farmacêutica, têxtil, alimentícia, etc. as celulases têm sido bastante estudadas (ARRUDA *et al*, 2019).

4.2.1 Etanol 2G

O consumo de energia fóssil tem gerado muitos problemas, como a emissão de gases do efeito estufa e insegurança no abastecimento devido ao esgotamento dos combustíveis fósseis. A utilização de energia de fontes renováveis seria uma solução para esses problemas. Pode-se ter combustíveis de primeira (1G), segunda (2G) e terceira geração (3G), a diferença entre eles está na matéria-prima utilizada e também na tecnologia utilizada para sua produção (ROBAK; BALCEREK, 2018).

O Brasil tem um grande potencial para produzir energia de fontes biorenováveis. Para a implementação de uma matriz energética sustentável no país a utilização de resíduos de biomassa vegetal é uma das principais alternativas viáveis (FERREIRA *et al*, 2019).

O etanol 2G depende da biomassa utilizada, nesse tipo de produção não há competição com o setor alimentício, pois são aproveitados os resíduos lignocelulósicos como bagaço de cana-de-açúcar, resíduos de algodão, palha de milho entre outros resíduos da agroindústria e resíduos florestais (BOHN, 2018).

A biomassa desses resíduos é basicamente composta por celulose, hemicelulose e lignina. O alvo do setor de etanol de segunda geração é converter a cadeia polissacarídica da celulose da parede celular vegetal em glicose (ROBAK; BALCEREK, 2018).

Para se obter o etanol de segunda geração, é necessário quatro etapas, que são: o pré-tratamento (químico, biológico ou físico), hidrólise enzimática, fermentação e destilação do etanol. A hidrólise enzimática é responsável por grande parte do custo de produção do bioetanol, por isso pesquisas e desenvolvimentos atuais são necessários para buscar melhorar esse processo e torná-lo mais econômico (ROBAK; BALCEREK, 2018).

4.2.2 Indústria têxtil

A indústria têxtil tem destaque nacional e internacional. De acordo com a Associação Brasileira da Indústria Têxtil (ABIT) o Brasil é considerado a maior Cadeia Têxtil completa do

ocidente, já que tem desde a produção das fibras, como a plantação de algodão, até os desfiles de moda. O faturamento da Cadeia têxtil e de confecção em 2020 foi de 161 bilhões (ABIT, 2022).

As enzimas são utilizadas na indústria têxtil na maioria dos processos úmidos, principalmente nas etapas de pré-tratamento e acabamento (BESEGATTO *et al*, 2018). As enzimas são aplicadas, pois tem a capacidade de substituir produtos químicos e dessa forma é possível ter processos ambientalmente mais corretos e utilização de menos água e energia (LIMA *et al*, 2020).

O acabamento têxtil é uma etapa importante do beneficiamento, já que são utilizados para melhorar a aparência e aumentar a durabilidade do produto (BATTISTI *et al*, 2017). As enzimas celulases são as mais usadas nesse processo e também no processo de biopolimento e bioestonagem. No biopolimento é removido as microfibrilas soltas que ficam presentes na fibra celulósica. Nas lavagens essas microfibrilas se rompem e acumulam na superfície chamadas de pilling. Na bioestonagem as celulases promovem remoção parcial do corante o que gera uma aparência desbotada ao jeans (LIMA *et al*, 2020).

4.2.3 Indústria de Ração Animal

Durante o processamento de ração animal as enzimas atuam em diversas etapas. As enzimas podem ter funções durante o armazenamento e também após a ingestão da ração (pode agir no sistema digestivo do animal). Devido a sua matéria-prima a ração tem componentes que são resistentes a digestão autoenzimática, por enzimas produzidas endogenamente (BEDFORD, 2018; PARIZA; COOK, 2010).

As enzimas celulolíticas são muito utilizadas como suplementação na alimentação de vacas leiteiras. Essa suplementação exógena de enzimas tem como função melhorar o aproveitamento dos alimentos pelos rebanhos, e isso contribui na produção de leite e seus componentes. As celulases podem contribuir no processo digestivo da fibra, e assim aumentar a biodisponibilidade de nutrientes (MACHADO, 2019).

As celulases também são muito utilizadas na produção de rações para aves, Também é adicionada para aumentar a biodisponibilidade dos nutrientes (THAPA *et al*, 2019). As enzimas auxiliam na digestão da ração dentro do sistema digestivo do animal, mas essa ação das enzimas pode também ocorrer antes da ingestão, e o consumo irá ter os mesmos benefícios (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002; PARIZA; COOK, 2010).

Assim as celulases podem ser utilizadas para o pré-tratamento de ração no intuito de melhorar o valor nutricional da ração animal. Além disso, degradam componentes antinutricionais, como pectinas, β -glucana, lignina, oligossacarídeos, celulose, dextrinas e arabinosilanos, e isso melhora o valor nutricional da ração e a saúde do animal (MORI *et al*, 2014; RASTOGI *et al*, 2010).

4.3 Produção de celulases

Diversas bactérias e fungos produzem celulases, utilizando a fermentação em estado sólido ou a fermentação submersa (FS). Entretanto, são apenas alguns que produzem níveis altos de celulase extracelular que tem a capacidade de solubilizar a celulose cristalina (PINHEIRO *et al*, 2019).

Os fungos e bactérias são eficientes na produção de celulases, com destaque para os fungos, pois secretam grandes quantidades de celulase para o meio, e isso facilita a recuperação e purificação dessas enzimas (PINHEIRO *et al*, 2019; RAY; TRIVEDI, 2022).

A fermentação submersa tem grande quantidade de água livre no meio de cultivo. É muito utilizada industrialmente, pois é mais fácil de controlar o processo, já que tem um meio mais homogêneo (NAMNUCH; THAMMASITTIRONG; THAMMASITTIRONG, 2020; PINHEIRO *et al*, 2019). Também há uma maior transferência de calor, oxigênio e massa por ser um meio líquido. A principal desvantagem desse tipo de fermentação é o longo período de incubação e menor produção de enzimas (BHATI; SHARMA, 2021).

Na fermentação em estado sólido os fungos filamentosos são os microrganismos mais utilizados, pois há uma semelhança entre o meio fermentativo e o habitat natural do fungo. Os fungos filamentosos crescem na superfície das partículas do substrato e os filamentos entram nos espaços vazios na matriz sólida, e vão para o interior do leito aumentando o acesso aos nutrientes que estão nos substratos (PINHEIRO *et al*, 2019). Atualmente a FES tem grande importância devido a reciclagem de resíduos ricos em lignocelulose e a produção de enzimas de forma econômica (BAJAR; SINGH; BISHNOI, 2020; BHATI; SHARMA, 2021).

É necessário ter condições ideais na fermentação para produção das celulases, mas também existem outras técnicas que melhoram a produção enzimática. Como exemplo, pode-se fazer uma modificação genética no microrganismo; pode-se realizar co-culturas de diferentes cepas, tendo assim um sistema enzimático mais completo, as co-culturas de fungos imitam o processo de biodegradação natural e aumentam atividades enzimáticas; aplicar biorreatores que tenha uma melhor troca de calor e massa (PINHEIRO *et al*, 2019; SPERANDIO *et al*, 2021).

4.3.1 Fungos

Na natureza, os fungos e as bactérias desempenham um papel muito importante na degradação da biomassa, na reciclagem de nutrientes e funcionamento do ecossistema (SETHUPATHY *et al*, 2021). Os fungos celulolíticos pertencem a diversas subdivisões como Ascomicetes, Basidiomicetos e Deuteromicetos. Dentre eles, os gêneros de fungos mais estudados são: *Chaetomium*, *Coriolus*, *Poria*, *Serpula*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Trichoderma* (CHRISTOPHER *et al*, 2021).

Nos últimos 20 anos, o ascomiceto *Penicillium* surgiu como um bom produtor de celulases. Muitas dessas espécies tem uma extensa gama de celulases, com boa estabilidade a 50°C, característica importante para aplicações industriais (CHRISTOPHER *et al*, 2021).

4.3.2 *Penicillium*

Na Tabela 1 estão listados diversos trabalhos avaliando espécies do gênero *Penicillium* que são bons produtores de celulases.

Tabela 1 – Relação de trabalhos que estudaram a produção de celulases por *Penicillium*

MICROORGANISMO	SUBSTRATO	MÉTODO	ATIVIDADE	REFERÊNCIA
<i>Penicillium</i> <i>Janthinellum</i>	Farelo de trigo + avicel	FS	3,1 U/ml	Singhania et al, 2014
<i>Penicillium</i> <i>Janthinellum</i>	Farelo de trigo + avicel	FES	FPase 20 U/g	Singhania et al, 2015
<i>Penicillium</i> sp. FSDE15	Farelo de trigo e sabugo de milho	FES	FPase 1,29 U/g	Santos et al, 2021
Cultivos mistos de <i>Penicillium</i>	Palha de arroz	FES	16,65 ± 1,83 U/g	Xu et al, 2021
<i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110	Casca de cacau	FES	0,89 U/g	Oliveira et al, 2019
<i>Penicillium citrinum</i>	Bagaço de agave	FES	0,1 U/g	Valle-Pérez et al, 2021

Fonte: autoria própria.

Estudos mostram que o *P. janthinellum* NCIM 1366 e seus mutantes são muito eficientes na hidrólise da biomassa lignocelulósica altamente recalcitrante como caule de algodão. Também relataram maiores quantidades de endoglucanases e β -glicosidases por mililitro da enzima se comparado com o *T. reesei* (um dos fungos mais utilizados para produção de celulases) (CHRISTOPHER *et al*, 2021).

4.4 Fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido é uma técnica que pode utilizar diferentes materiais lignocelulósicos para obter diferentes produtos com baixo custo, dessa forma contribuindo assim para a bioeconomia (OLIVERO *et al*, 2019; PINELA *et al*, 2020).

A fermentação em estado sólido é o processo no qual os microrganismos são cultivados em uma ambiente sem a presença de água livre ou com uma quantidade mínima de água livre (COUTO; LOPEZ; SANROMÁN, 2006). É necessário que o substrato tenha umidade que seja suficiente para garantir as atividades metabólicas do microrganismo e crescimento celular (PINHEIRO *et al*, 2019).

Para esse tipo de fermentação podem ser utilizados fungos filamentosos e bactérias. Os fungos filamentosos são mais utilizados, especialmente os das subdivisões do reino fúngico Basidiomycota e Ascomycota, devido a suas propriedades fisiológicas, bioquímicas e enzimáticas (ŠELO *et al*, 2021; STEUDLER, WERNER; WALTHER, 2019).

A fermentação em estado sólido tem muitas vantagens se comparada com a fermentação submersa. Na FES a quantidade de água utilizada é mínima o que gera uma baixa produção de efluente, diminuindo impactos ambientais; também não há necessidade da utilização de agentes antiespumantes; a demanda de energia é menor, pois é possível realizar o processo de FES em ambientes semi-estéreis; tem semelhanças com o habitat natural dos microrganismos; maior produtividade; menor custo e menor uso de produtos químicos (JAIN; MORLOK; HENSON, 2013; RODRÍGUEZ, 2008; SINGHANIA *et al*, 2015).

Apesar das vantagens, existem algumas preocupações que devem ser consideradas para melhorar o processo. Assim, a FES apresentam algumas desvantagens como: um meio heterogêneo, pois há dificuldade na agitação, e assim há formação de gradientes de umidade, temperatura e concentração de metabólitos; resistência à transferência de calor e massa; separação dos microrganismos do substrato; dificuldade em controlar o processo; dificuldade em determinar metabólitos e alguns parâmetros de cultivo (AFONSO, 2012; TIŠMA *et al*, 2021).

Alguns fatores são muito importantes e afetam o processo de fermentação em estado sólido como a composição química do substrato, tamanho da partícula e umidade; inóculo, a concentração, morfologia e idade; adições externas de nitrogênio ou carbono; concentração de oxigênio; temperatura e pH (ŠELO *et al*, 2021). Para a otimização da fermentação em estado sólido é essencial ter a descrição quantitativa desses fatores e suas influências sobre o crescimento microbiano (AFONSO, 2012).

Geralmente o substrato é escolhido de acordo com seu custo, disponibilidade e composição química; O objetivo pode ser a produção enzimática, produção de ácidos orgânicos, compostos fenólicos, entre outros. Dependendo do objetivo é necessário conhecer a composição química do substrato e selecionar o microrganismo adequado (FARINAS, 2015; SOCCOL *et al*, 2017).

Dependendo da composição química do resíduo, às vezes é necessário combinar diferentes tipos de resíduos para utilizar como substrato, garantindo assim nutrientes suficientes para o crescimento dos microrganismos (FILIPE *et al*, 2020). O teor de umidade do substrato é extremamente importante, pois afeta todo o processo de fermentação. Se o teor de umidade for muito alto os espaços intersticiais do resíduo serão preenchidos com água e a difusão do oxigênio será menor. Já se o teor de umidade for muito baixo, o microrganismo não conseguirá se desenvolver. O teor de umidade ideal depende do microrganismo e substratos utilizados e muda durante a fermentação (PIROTA *et al*, 2013; ŠELO *et al*, 2021).

Vários estudos são realizados para a produção de celulasas por FES, devido a possibilidade de usar resíduos agroindustriais (AFONSO, 2012). São utilizados diversos tipos de resíduos como substrato e diferentes tipos de microrganismos para produzir as enzimas (PINHEIRO *et al*, 2019).

4.5 Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica tem chamado a atenção da comunidade científica devido à sua disponibilidade e por ser renovável para consumo industrial. E como é uma alternativa de substrato econômico, várias indústrias estão reavaliando processos para utilizar compostos derivados desses materiais (SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ *et al*, 2020).

Na porção lenhosa das plantas e árvores está a maior fração da biomassa fotossintética, conhecida também por biomassa lignocelulósica. Essa biomassa é constituída por celulose, hemicelulose, lignina e extrativos, com composição variável, pois depende de cada espécie (HAFIZ *et al*, 2011; RODRIGUES *et al*, 2019).

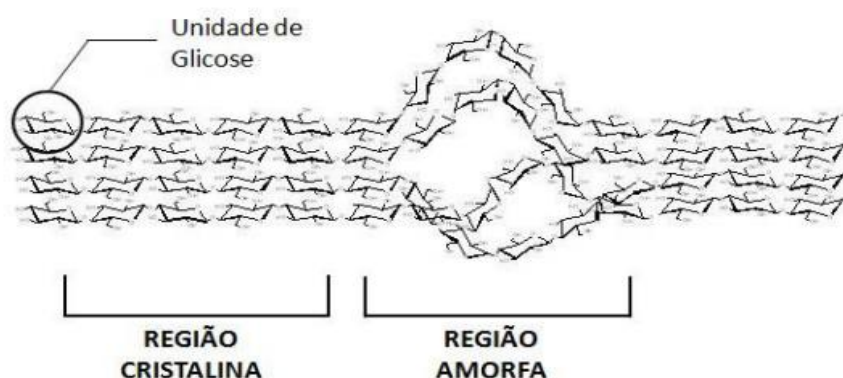
O arranjo da parede celular é de acordo com a composição química e orientação da celulose, lignina e hemicelulose que são os elementos estruturais majoritários, também da água que é disponível para planta.

A biomassa lignocelulósica necessita de pré-tratamento para ter um melhor rendimento de açúcares redutores no hidrolisado, pois tem estrutura complexa. A celulose e hemicelulose vão estar mais disponíveis para enzimas hidrolíticas se houver o pré-tratamento, então essas enzimas como celulasas e hemicelulasas, vão gerar os açúcares simples (ROBAK; BALCEREK, 2018).

Os objetivos do pré-tratamento são: produção de sólidos digestíveis aumentando os rendimentos de açúcar durante a hidrólise enzimática, evitar a perda de açúcar por degradação, reduzir formação de inibidores, recuperar a lignina para sua modificação em co-produtos e redução de custos. O pré-tratamento diminui a cristalinidade da celulose, remove ou degrada a lignina e faz a hidrólise da hemicelulose (MARINHO *et al*, 2019).

A celulose é um dos componentes mais importantes da parede celular vegetal, ela que determina a estrutura da parede. A celulose é um polímero natural de alto peso molecular, composto por resíduos de glicose, tendo a celobiose como unidade básica de acoplamento. É considerado o recurso renovável mais abundante na natureza. As cadeias de celulose possuem regiões cristalinas e amorfas, essas regiões ficam em intervalos irregulares (Figura 2).

Figura 2 – Representação da estrutura de uma fibrila elementar da celulose.



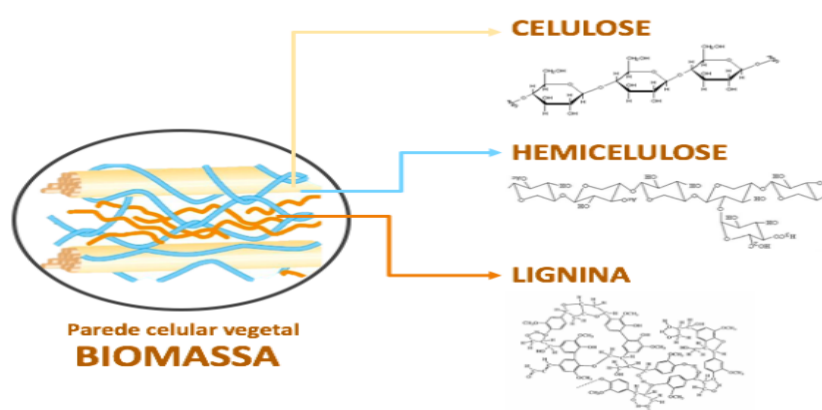
Fonte: Afonso (2012).

A hemicelulose é um heteropolímero com muitas ramificações, contém açúcares como pentoses (xilose, arabinose), hexoses (manose, glicose, galactose) e ácidos urônicos (ácidos D-glucurônico, D-galacturônico e metilglucurônico). Esse heteropolímero fica intercalado às

microfibrilas de celulose, proporciona elasticidade e impede que as microfibrilas se toquem (AFONSO, 2012; RODRIGUES *et al*, 2019).

A hemicelulose, na parede celular vegetal, se encontra associada com a celulose e lignina, e pode ser encontrada em todos os domínios da parede celular, porém é encontrada em maior concentração em camadas primárias e secundárias (CHEN, 2014; RODRIGUES *et al*, 2019). A Figura 3 mostra o modelo de estrutura dos constituintes da biomassa lignocelulósica.

Figura 3 – Representação da parede celular vegetal



Fonte: CUNHA (2020).

A lignina é outro componente importante na parede celular. Fica localizada principalmente na lamela média (onde é depositada), e é considerada um produto final da planta (RODRIGUES *et al*, 2019).

A lignina é um complexo amorfo e heterogêneo, tem alto peso molecular e é altamente insolúvel. Ela proporciona resistência mecânica ligada a celulose e a hemicelulose, é uma barreira ao ataque de microrganismos. A dificuldade da hidrólise da celulose é a recalcitrância da celulose cristalina e a alta proteção da lignina, que atua como uma barreira física ao ataque enzimático (AFONSO, 2012).

4.6 Algodão

O algodoeiro tem uma fibra natural que se destaca na indústria têxtil, e tem também subprodutos como a torta, fibrilha e óleo (do caroço do algodão). Essa cultura, no Brasil, é importante para a economia agrícola e contribui com o crescimento do agronegócio (SANTOS,

2019). Os maiores países produtores de algodão são a China e a Índia, seguidos pelos Estados Unidos da América e pelo Brasil (FAO, 2022).

O algodão *Gossypium hirsutum* espécie que pertence ao gênero *Gossypium* da família *Malvaceae* tem grande importância econômica no Brasil (NASCIMENTO, 2019). Após ser colhido, o algodão passa por processos onde ocorre a separação entre fibra e o caroço. A fibra é o principal produto do algodão, bastante utilizado na indústria têxtil, e o caroço (rico em óleo) é utilizado na indústria alimentícia (FERREIRA *et al*, 2019).

As previsões para a safra de 2022/23 de algodão, indicam uma colheita de cerca de 2,92 milhões de toneladas da pluma. As análises apontam um aumento na área de produtividade do algodão, esse avanço da cultura é devido ao elevado patamar no preço do produto, comercialização antecipada entre outros. Diante disso é esperado um volume exportado de 2 milhões de toneladas do produto final no fim de 2023 (CONAB, 2022).

A cultura de algodão gera subprodutos como torta, caroço e fibrilha de algodão. O caroço do algodão é colhido junto com a pluma, quando se faz a separação, sobra a semente de algodão (MOREIRA, 2008). No processo para se obter a fibra são gerados resíduos, e esses subprodutos podem ser destinados como material para outros produtos.

A extração do óleo do caroço do algodão gera um subproduto chamado de torta de algodão. A sua composição proteica tem um teor de proteína que oscila entre 25,9 a 47,6% (OLIVEIRA, 2018). Os processos que mais influenciam nas características da torta de algodão, são as condições de cultivo e processamento do algodão para a extração do óleo. A extração do óleo pode ser feita pelo uso de solventes ou prensagem mecânica, dessa forma é possível ter dois tipos de tortas: a torta gorda que tem 5% de óleo residual, que é obtida por prensagem mecânica; e a torta magra que tem um maior teor de proteínas e 2% de óleo residual, obtida da extração por solventes (BELTRÃO *et al*, 2000).

A fibrilha (línter) é um subproduto obtido durante a separação da pluma do caroço. É necessário um processo adicional para a retirada do línter, devido a esse fato, muitas das vezes esse resíduo não é retirado, ou é utilizado solventes químicos para dissolver (BEZERRA *et al*, 2017). Esses resíduos resultado do processamento de algodão tem potencial de serem aplicados na produção de celulases, sendo um substrato para os fungos celulolíticos.

4.7 Produção de celulases utilizando resíduos de algodão como substrato

Alguns estudos já foram realizados utilizando os resíduos de algodão como substrato. Em alguns trabalhos foram utilizados apenas os resíduos de algodão, ou a mistura desses com outros tipos de resíduos.

Bala *et al* (2017) fizeram um estudo utilizando como substrato palha de trigo e torta de algodão (proporção 1:1) com o microrganismo *Sporotrichum thermophile* BJAMDU5. Observou-se que foram secretado altas concentrações de enzimas xilanolíticas e celulolíticas na fermentação em estado sólido utilizando essa mistura como substrato. O estudo foi realizado com vários resíduos, mas a mistura palha de trigo e torta de algodão tiveram a maior produção enzimática (xilanase 795,12 U/g, CMCase 298,12 U/g, FPase 28,13 U/g e β -glicosidase 6,67 U/g).

Hu *et al* (2018) investigaram a viabilidade do uso de resíduos têxteis como matéria-prima para a produção de celulase através da fermentação em estado sólido. O fungo utilizado *Aspergillus niger* CKB teve uma maior atividade de celulase ($0,43 \pm 0,01$ FPU/g) após 7 dias de cultivo utilizando tecido puro de algodão. Foram feitos pré-tratamentos em seis tipos de têxteis com várias proporções de mistura de algodão/poliéster. O uso de uma mistura têxtil de algodão/poliéster de 80/20 teve maior atividade de celulase ($1,18 \pm 0,05$ FPU/g).

Marques *et al* (2018) observaram nos estudos que *Botryosphaeria sp* AM01 e *Saccharicola sp* se destacaram quanto às atividades de endoglucanase ($184,74 \pm 6,0$) e β -glicosidase ($92,28 \pm 9,57$ U/g) quando cultivadas na mistura de farelo de caroço de algodão e farelo de trigo.

Ravindran *et al* (2011) testaram fungo marinho *Chaetomium globosum* para produção de celulases utilizando como substrato semente de algodão e bagaço de cana-de-açúcar. Em ambos os resíduos utilizados, observou-se um aumento na produção de celulases com o aumento do pH.

Kulkarni *et al* (2018) fizeram um estudo utilizando folhas de bananeira e farelo de algodão como substrato e os resultados indicaram que esses resíduos podem ser usados eficientemente para produção de celulase por fermentação em estado sólido. Nesse estudo o farelo de caroço de algodão foi utilizado como fonte de N, e o fungo utilizado foi o *Aspergillus sp*.

5 METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no Laboratório 3 da Universidade Federal do Oeste da Bahia, Centro Multidisciplinar de Luís Eduardo Magalhães. Os resíduos de algodão (torta, fibrila e caroço) foram obtidos com os produtores da região. O caroço de algodão teve um tratamento mecânico no moinho de facas. Esse pré-tratamento foi feito para aumentar a superfície de contato e facilitar o acesso do microrganismo durante a fermentação.

5.1 Microrganismo

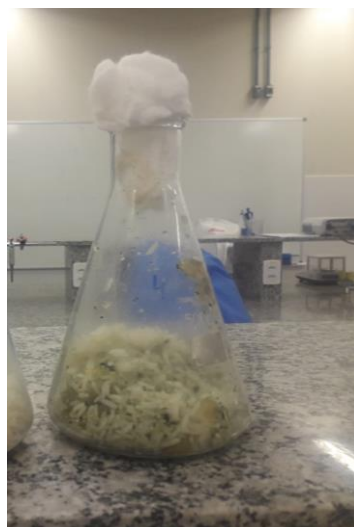
O fungo filamentosso *Penicillium janthinellum* 3921 foi doado pela Fundação Oswaldo Cruz. O fungo é preservado com meio de batata dextrose (PDA) a 4°C com repiques periódicos. Esse fungo foi escolhido, pois de acordo com estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa de Celulases Fúngicas, tem potencial de produzir celulases.

5.2 Inóculo

O microrganismo foi cultivado em placas de Petri com meio PDA e incubados a 30 °C por um período de 7 dias em incubadora orbital tipo shaker. Em seguida, foi realizado o repique em arroz. O arroz foi utilizado como substrato para que o fungo possa crescer, aumentando a esporulação, já que estará em um substrato mais biodisponível (MÉLO *et al*, 2016).

O meio de cultura à base de arroz foi feito de acordo com o protocolo da EMBRAPA/CPATSA. Aproximadamente 50g do arroz foi umidificado com água destilada, esse arroz ficou imerso em água por 30 minutos, e foi retirado o excesso de água com auxílio de uma peneira. Erlenmeyers de 500 mL, contendo 50 g de arroz que foi previamente umedecido, foram autoclavados por 15 minutos a 121 °C e, após o do resfriamento total do arroz, os microrganismos foram inoculados (Figura 4).

Figura 4 – Fermentação do fungo em arroz



Fonte: autoria própria

Em seguida os erlenmeyers foram incubados a 30°C por um período de 7 dias. O preparo do inóculo para as fermentações foi realizado adicionando-se aproximadamente 200 mL da solução de Mandels & Weber (Tabela 2) nos erlenmeyers contendo os esporos (MANDELS; WEBER,1969).

Tabela 2 – Composição da solução de Mandels & Weber

UNIDADE	COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO
g/L	Uréia	4,2
	(NH ₄) ₂ SO ₄	5,6
	KH ₂ PO ₄	4,0
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,8
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,6
	Peptona	1,8
	Extrato de levedura	0,5
mg/L	FeSO ₄ .7H ₂ O	10,0
	MnSO ₄ .4H ₂ O	3,2
	ZnSO ₂ .7H ₂ O	2,8
	CoCl ₂ .6H ₂ O	40,0

Após, foi realizada a agitação até obter a suspensão de esporos que depois foi filtrada com auxílio de gaze estéril. Em seguida, foi realizada a quantificação da suspensão de esporos

por meio da contagem em Câmara de Neubauer. Os esporos foram armazenados em freezer à 4°C.

Figura 5 - Solução de esporos do fungo



Fonte: autoria própria

5.3 Seleção do substrato

Para selecionar o melhor substrato a ser utilizado para produção de celulases, foi realizado um ensaio considerando a mistura de fibrilha e torta de algodão na concentração de 50% torta e 50% de fibrilha, totalizando 1 g de substrato. O caroço foi moído no moinho de facas e foi utilizado 1 g do material.

Os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando tubos de ensaio a 30° durante 6 dias. Depois disso, foi realizada a recuperação enzimática, quantificação de açúcares redutores e FPase.

5.4 Seleção de parâmetros

A fermentação em estado sólido foi realizada em 6 dias, utilizando o *P. janthinellum*. Os ensaios foram realizados em tubo de ensaio esterilizados por 15 minutos a 120°C. Foi utilizado o substrato que teve a maior produção enzimática. A análise do planejamento

experimental Plackett-Burman foi feito por meio do software Statistica® 10, onde foi levado em consideração as variáveis, pH, água, polisorbato 80, nitrogênio, inóculo e temperatura. Foi estabelecido faixas de variação (níveis -1 e +1) para as variáveis (Tabela 3).

Tabela 3 – Níveis dos parâmetros estabelecidos no planejamento experimental PB.

Parâmetro	Nível		
	-1	0	+1
pH	3,7	4,85	6,0
Água (mL)	1,5	3,0	4,5
Polisorbato 80 (%)	1,0	5,0	9,0
Nitrogênio (%)	1,0	5,0	9,0
Inóculo (esp/g)	1,0x10 ⁶	5,0x10 ⁷	1,0x10 ⁸
Temperatura (°C)	23	30	37

Fonte: autoria própria.

5.5 Otimização da fermentação

Foi utilizado o método de DCCR para três variáveis. Ele consiste em um planejamento fatorial 2³ com oito ensaios, mais seis pontos axiais e cinco pontos centrais (PC), totalizando dezenove experimentos, para avaliar a influência dos fatores, no qual as variáveis independentes foram: água, temperatura e polisorbato 80. A Tabela 6 mostra a matriz de planejamento.

Tabela 4 - Níveis dos parâmetros temperatura, concentração de polisorbato 80 e água usados no planejamento experimental da otimização (DCCR)

Parâmetro	Nível		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	24,0	28,0	32,0
Polisorbato 80 (%)	3,0	7,0	11,0
Água (mL)	4,0	6,25	8,5

Fonte: autoria própria.

5.6 Recuperação das enzimas

O extrato enzimático foi obtido utilizando a metodologia de Santos (2017). Após a realização da FES foi adicionado 10 mL de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L pH 4,8 no substrato fermentado. As amostras foram agitadas por 10 minutos no vórtex e após foram centrifugadas a 3500 rpm por 20 minutos. A solução foi filtrada a vácuo, obtendo assim o extrato enzimático, que foi armazenado em freezer à -18°C até a determinação da atividade enzimática.

5.7 Atividade de FPase

Para determinar a atividade de celulase foi utilizada a metodologia de Ghose (1987). O substrato utilizado foi o papel filtro (FP) cortado em tiras de 1x6 cm. As tiras de papel foram colocados em tubos de ensaio, e depois foi adicionado 1 mL de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, com pH de 4,8 e 0,5 mL do extrato enzimático. Esse experimento foi realizado em banho-maria a 50°C por 60 minutos.

Em seguida foi removido 0,625 mL da amostra e colocado em um tubo de ensaio, nesse mesmo tubo foi adicionado 0,625 mL de DNS. Os tubos foram colocados em banho-maria por 5 minutos a 100°C, após isso, foi resfriado em banho de gelo. Por fim foi adicionado 10 mL da solução de tartarato de sódio e foi realizado a quantificação no espectrofotômetro a 540 nm. A equação 1 foi utilizada para calcular a FPase.

$$FPase = \frac{(AR)(V_T)}{(0,18)(V_E)(T_H)} \quad (1)$$

No qual,

AR é a concentração de açúcares redutores;

V_T é o volume total;

0,18 é o fator de conversão de *mg* para μmol de glicose;

V_E é o volume de extrato;

T_H é o tempo de hidrólise.

5.8 Determinação de açúcares redutores por DNS

Para determinar os açúcares redutores foi utilizada a metodologia de Miller (1959). A marcha analítica foi realizada com 1 mL de amostra e 1 mL de DNS em tubos de ensaio que

foram colocados em banho-maria a 100°C por 5 minutos, e depois resfriado em banho de gelo. Após o resfriamento foi adicionado aos tubos de ensaio 16 mL de solução tartarato duplo de sódio e potássio e foi realizado então a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Foi preparado uma solução padrão de glicose contendo 2,0 g de glicose para 1 L de água destilada, para construir a curva padrão de glicose, e depois foi obtido a equação para calcular os açúcares redutores.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Seleção do substrato

Com o objetivo de obter o melhor substrato para a produção das celulases, foi realizada uma fermentação utilizando dois substratos diferentes. A Tabela 4 mostra a atividade de FPase obtida para os substratos utilizados.

Tabela 5 – Atividades enzimáticas obtidas para os diferentes substratos avaliados

Ensaio	Fibrilha	Torta de algodão	Caroço moído	FPase (U/g) *
1	50%	50%		0,778 ± 0,10 ^a
2			100%	1,03 ± 0,07 ^b

* Letras diferentes (a,b) na coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos tratamentos. Fonte: autoria própria

Conforme observado o substrato caroço moído obteve um melhor resultado de atividade de FPase, igual a 1,03 U/g. O caroço moído foi mais biodisponível para o fungo. Dessa forma, o caroço moído foi selecionado como substrato para a otimização.

6.2 Seleção dos parâmetros

Após a análise dos resultados obtidos dos diferentes substratos, foi realizado um planejamento experimental PB, visando analisar os parâmetros que influenciam na fermentação. Esse planejamento tem como objetivo selecionar os fatores mais significativos dentre os seis selecionados: pH, temperatura, água, polisorbato 80, nitrogênio e inóculo. Com esse procedimento de triagem é possível saber alguns fatores importantes que têm efeito na produção de celulases.

As respostas para a atividade enzimática estão na Tabela 5. As atividades enzimáticas obtidas no PB variam de 0,187 U/g até 2,162 U/g.

Tabela 6 - Atividade enzimática obtida no PB

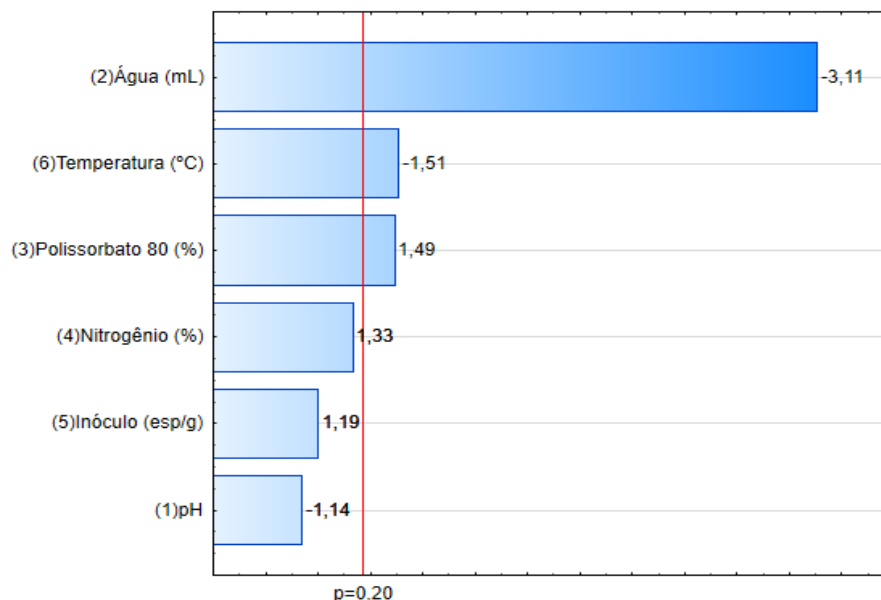
Ensaio	pH	Água (mL)	Polisorbato (%)	Nitrogênio (%)	Inóculo (esp/g)	Temperatura (°C)	FPase (U/g)
1	6,0	1,5	9,0	1,0	1E+06	23	0,84
2	6,0	4,5	1,0	9,0	1E+06	23	0,44
3	3,7	4,5	9,0	1,0	1E+08	23	0,25
4	6,0	1,5	9,0	9,0	1E+06	37	0,65
5	6,0	4,5	1,0	9,0	1E+08	23	0,31
6	6,0	4,5	9,0	1,0	1E+08	37	0,48
7	3,7	4,5	9,0	9,0	1E+06	37	0,45
8	3,7	1,5	9,0	9,0	1E+08	23	2,16
9	3,7	1,5	1,0	9,0	1E+08	37	0,71
10	6,0	1,5	1,0	1,0	1E+08	37	0,72
11	3,7	4,5	1,0	1,0	1E+06	37	0,18
12	3,7	1,5	1,0	1,0	1E+06	23	0,82
13 (PC)	4,85	3,0	5,0	5,0	5E+07	30	0,54
14 (PC)	4,85	3,0	5,0	5,0	5E+07	30	0,69
15 (PC)	4,85	3,0	5,0	5,0	5E+07	30	0,65
16 (PC)	4,85	3,0	5,0	5,0	5E+07	30	0,62
17 (PC)	4,85	3,0	5,0	5,0	5E+07	30	0,47

*(PC) ponto central. Fonte: autoria própria

As maiores atividades, 0,847 U/g e 2,162 U/g, foram obtidas nos ensaios 1 e 8, respectivamente. As condições desses ensaios foram 1,5 mL de água, 9% de Polisorbato 80 e temperatura 23°C, para ambos os ensaios, o pH foi 6 e 3,7 para os ensaios 1 e 8, respectivamente, o nitrogênio foi 1% para o ensaio 1 e 9% para o ensaio 8, e o inóculo foi $1,0 \times 10^6$ esp/g para o ensaio 1 e $1,0 \times 10^8$ esp/g para o ensaio 8.

A análise estatística dos efeitos das seis variáveis sobre a resposta FPase pode ser observada no Diagrama de Pareto (Figura 6) para o fungo *Penicillium janthinellum*. Avaliando o diagrama percebe-se que as variáveis independentes água, temperatura e polisorbato, foram significativas sobre a atividade de FPase.

Figura 6 - Diagrama de Pareto dos efeitos para o DCCR.



Fonte: autoria própria

Na FES a quantidade de água livre é um parâmetro importante, já que é utilizada para a difusão dos gases e solutos. Os microrganismos possuem uma quantidade de água livre ideal para o seu crescimento, se houver variações nesses teores de umidade pode-se ter problemas no metabolismo e crescimento dos microrganismos.

A temperatura é considerada uma das mais importantes variáveis físicas que afeta a FES, já que as enzimas são muito sensíveis a essa variável. Ela afeta a germinação dos esporos, o crescimento e a formação dos produtos dos fungos filamentosos. Dessa forma, é necessário ter um valor de temperatura ideal para os microrganismos, valores que aumentem a produção das celulasas.

O polisorbato 80 é um surfactante não-iônico, esse emulsificante é muito utilizado como agente dispersante na preparação das soluções. Esse emulsificante tem influência na produção de celulasas, porém seu mecanismo de ação ainda não é conhecido.

No início do planejamento foi especificado um ponto central que representa a melhor condição do processo. Após, foram estabelecidas faixas de variação (níveis -1 e +1) para as variáveis de modo a se ter a avaliação dos efeitos sobre o resultado. Assim, para o fungo *Penicillium janthinellum* utilizando o caroço de algodão moído como substrato o melhor resultado de FPase foi observado no ensaio 8.

6.3 Otimização da produção de celulases

Em função dos resultados obtidos no planejamento PB, as variáveis água, temperatura e polisorbato 80 foram selecionados para serem estudadas em um DCCR em que se diminuiu os valores de temperatura e o teor de água devido aos efeitos negativos observados na seleção de parâmetros, e aumentou-se a porcentagem do polisorbato 80, pois este apresentou efeito positivo significativo. Os parâmetros que não foram significativos foram fixados em valores baseados na literatura. O DCCR foi utilizado para investigar o efeito das variáveis independentes água, temperatura e polisorbato 80 sobre a produção de celulases pelo fungo *Penicillium janthinellum* (Tabela 7).

Tabela 7 - Matriz do DCCR com valores reais e a atividade enzimática máxima obtida em cada ensaio

Ensaio	Água (mL)	Temperatura (°C)	Polisorbato 80 (%)	FPase (U/g)
1	1,3	24,0	3,0	0,84
2	1,3	24,0	11,0	0,55
3	1,3	32,0	3,0	0,66
4	1,3	32,0	11,0	0,78
5	2,8	24,0	3,0	0,45
6	2,8	24,0	11,0	0,54
7	2,8	32,0	3,0	0,95
8	2,8	32,0	11,0	0,57
9	0,82	28,0	7,0	0,83
10	3,3	28,0	7,0	0,74
11	2,08	21,27	7,0	0,96
12	2,08	34,73	7,0	0,55
13	2,08	28,0	0,27	1,43
14	2,08	28,0	13,73	0,91
15 (PC)	2,08	28,0	7,0	1,25
16 (PC)	2,08	28,0	7,0	1,25
17 (PC)	2,08	28,0	7,0	1,29
18 (PC)	2,08	28,0	7,0	1,22
19 (PC)	2,08	28,0	7,0	1,25

Fonte: autoria própria

O maior valor obtido de FPase foi 1,43 U/g no ensaio 13. Comparando esse resultado do ensaio 13 com o maior resultado obtido no PB (FPase de 2,16 U/g) é possível observar que houve uma redução na produção de celulases. Isso ocorre devido a problemas que se tem na

FES, por ser um meio heterogêneo, se tem dificuldades em controlar o processo e recuperar as enzimas.

As equações 2, 3 e 4 representam os modelos gerados para a determinação da atividade enzimática FPase.

$$\begin{aligned} \text{FPase } (U/g) = & (-10 + 0,33(\text{água})) - (0,04(\text{água})^2) + (0,064(\text{polisorbato})) - \\ & (0,004(\text{polisorbato})^2) + (0,0068(28(\text{água}))) - (0,0018(\text{água})(\text{polisorbato})) - \\ & (0,0004(28\text{polisorbato})) + (9,6) \end{aligned} \quad (2)$$

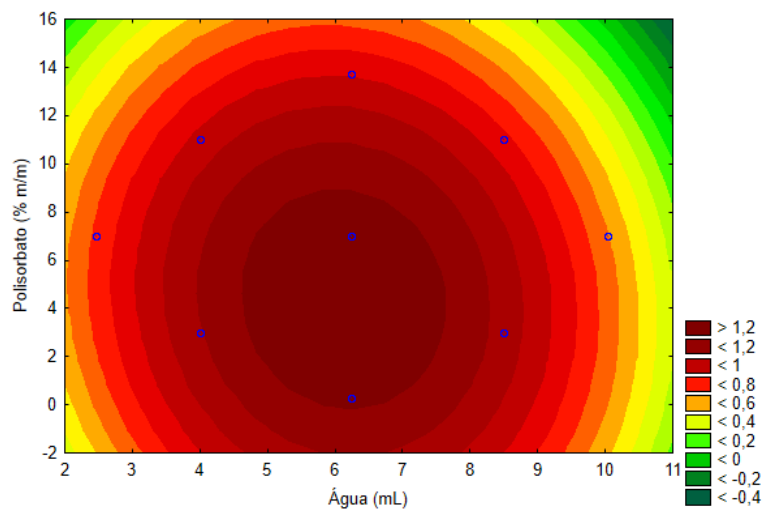
$$\begin{aligned} \text{FPase } (U/g) = & (-10) + (0,73(\text{temperatura})) - (0,013(\text{temperatura})^2) + \\ & (0,064(\text{polisorbato})) - (0,0046(\text{polisorbato})^2) + (0,0068(6,25(\text{temperatura}))) - \\ & (0,0018(6,25(\text{polisorbato}))) - (0,00045(\text{temperatura})y) + (0,42) \end{aligned} \quad (3)$$

$$\begin{aligned} \text{FPase } (U/g) = & (-10) + (0,32(\text{água})) - (0,041(\text{água})^2) + (0,73(\text{temperatura})) - \\ & (0,013(\text{temperatura})^2) + (0,006(\text{água})(\text{temperatura})) - (0,0018(7(\text{água}))) - \\ & (0,00045(7(\text{temperatura}))) + (0,22) \end{aligned} \quad (4)$$

Com os modelos quadráticos gerados para determinação da atividade de FPase, foram criadas as curvas de nível para facilitar a visualização do comportamento da equação.

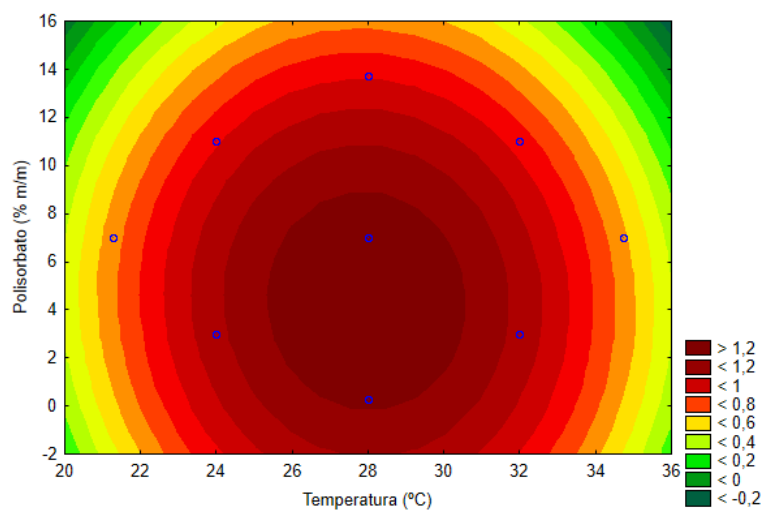
A Figura 7 representa o efeito da interação do polisorbato 80 com a água para a resposta FPase. É possível observar que com 6,1 mL de água e 4,3% de polisorbato houve um aumento na produção enzimática. A Figura 8 representa o efeito da interação do polisorbato com a temperatura para a produção enzimática. É possível observar que a maior produção enzimática foi com a temperatura de 27,9°C e polisorbato em 4,3%. Na Figura 9 é possível observar o efeito da interação da temperatura com a água para a produção enzimática. A maior produção foi com 6,1 mL de água e temperatura de 27,9°C.

Figura 7 - Curva de nível gerada para polisorbato x água



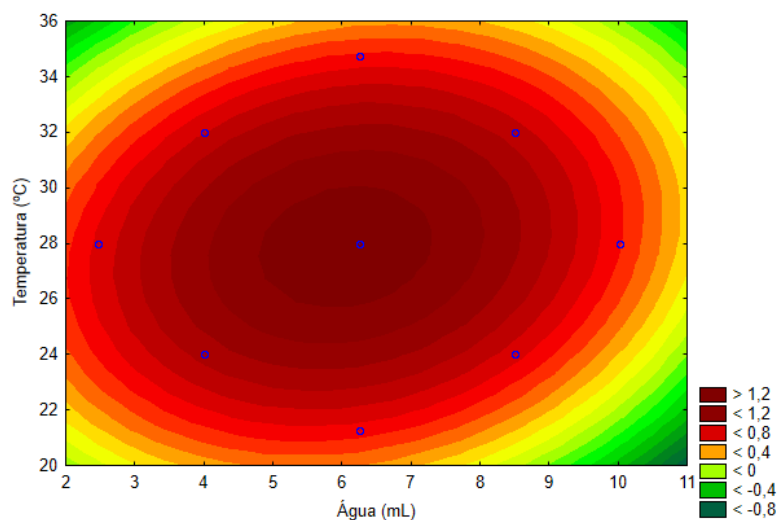
Fonte: autoria própria

Figura 8 – Curva de nível gerada para polisorbato x temperatura



Fonte: autoria própria

Figura 9 – Curva de nível gerada para temperatura x água



Fonte: autoria própria

Com objetivo de produzir celulases utilizando a casca de coco verde como substrato Andrade et al. (2017) observaram a maior atividade enzimática no segundo dia de fermentação (0,55 U/g). O fungo utilizado foi o fungo de podridão branca *Phanerochaete chrysosporium*. Brito (2021), utilizou o bagaço de cana *in natura* como substrato na fermentação em estado sólido e obteve maiores atividades enzimáticas de CMCase (2,91 U/g) e FPase (1,77U/g), após 7 dias de fermentação. Os resultados apresentados nesses estudos se mostram próximos aos resultados obtidos com o caroço de algodão moído.

Oliveira (2010) otimizou a produção de celulases utilizando casca de coco verde como substrato, os melhores resultados obtidos foram utilizando temperatura de 60°C e pH 5,5. A maior atividade enzimática obtida foi 1,2 U/g (valor próximo ao obtido com o caroço moído). Para aumentar a produção enzimática foi feita uma otimização com o substrato, foi utilizado a mistura do coco verde com farelo de trigo, e foi possível obter um maior valor de atividade enzimática (2,46 U/g). Esse maior valor de atividade enzimática foi obtido devido ao uso do farelo de trigo que apresenta uma boa capacidade de retenção de água, além disso esse resíduo promove um melhor desenvolvimento do fungo, pois aumenta os espaços entre as fibras da casca do coco, permitindo um crescimento homogêneo do fungo, e uma melhor utilização do substrato pelo microrganismo.

Bala *et al* (2017) fizeram um estudo utilizando como substrato palha de trigo e torta de algodão (proporção 1:1). E foi obtido altas concentrações de enzimas celulolíticas (FPase 28,13 U/g) na fermentação em estado sólido utilizando essa mistura como substrato. Uma atividade enzimática maior do que a obtida nesse trabalho utilizando apenas o caroço moído.

Dependendo da composição química do resíduo, pode ser necessário combinar diferentes tipos de resíduos para utilizar como substrato, garantindo assim nutrientes suficientes para o crescimento dos microrganismos. Para aumentar a produção enzimática, é interessante misturar o caroço de algodão com outro resíduo que seja mais biodisponível para o fungo. Pois, através das análises nesse trabalho, é possível observar que apenas o caroço de algodão como substrato não foi muito eficiente no aumento da atividade enzimática. É necessário novos estudos para se obter valores de produção de celulases que sejam competitivos do ponto de vista comercial.

7 CONCLUSÃO

Na avaliação dos diferentes substratos obteve-se um maior valor de produção de celulasas utilizando o caroço de algodão moído. No delineamento PB foi possível avaliar a influência das variáveis temperatura, pH, polisorbato 80, inóculo, água e nitrogênio. As variáveis mais significativas foram: temperatura, água e polisorbato 80.

A otimização da produção de celulasas foi realizada com as variáveis significativas do PB. E foi possível observar que valores de temperatura entre 25,9°C e 30°C, valores de polisorbato 80 entre 0 e 8,4% e valores de água entre 5,0 mL e 7,3 mL aumentaram a produção de celulasas.

8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante do trabalho desenvolvido sugere-se:

- Misturar outro resíduo mais biodisponível ao caroço moído;
- Observar a fermentação em diferentes tempos de cultivo para obter a atividade celulolítica máxima;
- Testar diferentes pré-tratamentos para diminuir a cristalinidade do substrato.

REFERÊNCIAS

- ABIT. Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção. 2022. Disponível em: <https://www.abit.org.br/cont/perfil-do-setor>. Acesso em: 13 de out. 2022.
- ABRAPA. Área, Produção e Produtividade Brasil. 2022. Disponível em: <https://www.abrapa.com.br/Paginas/dados/balanca-comercial-brasileira-de-algodao.aspx>. Acesso em: 10 de Out. de 2021.
- AFONSO, Larissa Cardillo. **Produção de celulases por cultivo em estado sólido e aplicação na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- ANTAR, Mohammed et al. Biomass for a sustainable bioeconomy: An overview of world biomass production and utilization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 139, p. 110691, 2021.
- ARRUDA, Adam Gonçalves et al. Produção de celulases em fermentação em estado sólido a partir de resíduos agroindustriais. 2019.
- BAJAR, Somvir; SINGH, Anita; BISHNOI, Narsi R. Exploration of low-cost agro-industrial waste substrate for cellulase and xylanase production using *Aspergillus heteromorphus*. **Applied Water Science**, v. 10, n. 6, p. 1-9, 2020.
- BALA, Anju; SINGH, Bijender. Concomitant production of cellulase and xylanase by thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in solid state fermentation and their applicability in bread making. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 6, p. 1-10, 2017.
- BATTISTI, R. N., A. M. ; Lima, J. S. ; Aguiar, C. R. L. ; Immich, A. P. S. . Uma visão geral dos processos especiais de acabamentos têxteis. *Química têxtil*, 126, p. 6-24, 2017.
- BEDFORD, Michael R. The evolution and application of enzymes in the animal feed industry: the role of data interpretation. *British poultry science*, v. 59, n. 5, p. 486-493, 2018.
- BELTRÃO, N.E.M. et al. Potencialidades de alguns subprodutos do algodoeiro. Fitomassa e seu subproduto principal, a celulose. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2000.
- BESEGATTO, S. V.; COSTA, F. N.; DAMAS, M. S. P.; COLOMBI, B. L. et al. Enzyme Treatment at Different Stages of Textile Processing: A Review. *Industrial Biotechnology*, 14, n. 6, p. 298-307, 2018.
- BEZERRA, Elieber Barros et al. Processing and properties of PCL/cotton linter compounds. *Materials Research*, v. 20, p. 317-325, 2017.

- BHATI, Nikita; SHARMA, Arun Kumar. Cost-effective cellulase production, improvement strategies, and future challenges. **Journal of Food Process Engineering**, v. 44, n. 2, p. e13623, 2021.
- BOHN, Letícia Renata. Produção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica de milho. 2018.
- BRITO, Pedro Henrique de Paula de. Produção de celulases por *Streptomyces* sp. AM4-6 utilizando sub-produtos da agroindústria. 2021
- CEN, Peilin; XIA, Liming. Production of cellulase by solid-state fermentation. **Recent progress in bioconversion of lignocellulosics**, p. 69-92, 1999.
- CHEN, H. Q.; GONG, Yunhuai; FANG, Z. The situation and aspect of application for macromolecule (I)–cellulose, lignin and starch. **Yunnan Chem Technol**, v. 11, n. 1, p. 41-6, 1996.
- CHEN, Hongzhang. Chemical composition and structure of natural lignocellulose. In: **Biotechnology of lignocellulose**. Springer, Dordrecht, 2014. p. 25-71, 2014.
- CHRISTOPHER, Meera et al. Whole Genome Sequence and CAZyme distribution of the cellulase hyper producing filamentous fungus *Penicillium janthinellum* NCIM 1366. **BioRxiv**, 2021.
- CONAB. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4731-safra-2022-23-producao-de-graos-pode-chegar-a-308-milhoes-de-toneladas-impulsionada-pela-boa-rentabilidade-de-milho-soja-e-algodao>. Acesso em: 08. Out. de 2022.
- COUTO, Susana Rodríguez; LOPEZ, Elena; SANROMÁN, M. Angeles. Utilisation of grape seeds for laccase production in solid-state fermentors. **Journal of Food Engineering**, v. 74, n. 2, p. 263-267, 2006.
- CUNHA, Izabel Figueiredo et al. Análise térmica e pirólise analítica de sabugo de milho. 2020.
- CASTRO Marina Coelho et al. Use of Agroindustrial Wastes for the Production of Cellulases by *Penicillium* sp. FSDE15. **Journal of King Saud University-Science**, v. 33, n. 6, p. 101553, 2021.
- FARINAS, Cristiane S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179-188, 2015.
- FERREIRA, Jaire Alves et al. Identificação e caracterização de genes e regiões genômicas de *Trichoderma harzianum* IOC3844 relacionados à degradação da biomassa vegetal: Identification and characterization of genes and genomic regions of *Trichoderma harzianum* IOC3844 related to plant biomass degradation. 2019.

- FERREIRA, Camilla Ruama Rosa. **Produção de enzimas celulolíticas e etanol celulósico a partir do resíduo de acerola**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, . 2020.
- FERREIRA, IL; FREIRE, EC In: FREIRE EC **industrialização da Pluma**. 1. ed. Brasília: ABRAPA, cap 25, p.871-887. 2007.
- FILIFE, Diogo et al. Improved lignocellulolytic enzyme production and antioxidant extraction using solid-state fermentation of olive pomace mixed with winery waste. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 14, n. 1, p. 78-91, 2020.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, v. 59, n. 2, 1987.
- HAFIZ Muhammad Nasir, Iqbal et al. Purification and characterization of the kinetic parameters of cellulase produced from wheat straw by *Trichoderma viride* under SSF and its detergent compatibility. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 2011, 2011.
- HU, Yunzi et al. Valorisation of textile waste by fungal solid state fermentation: An example of circular waste-based biorefinery. **Resources, conservation and recycling**, v. 129, p. 27-35, 2018.
- JAIN, Abhiney; MORLOK, Charles K.; HENSON, J. Michael. Comparison of solid-state and submerged-state fermentation for the bioprocessing of switchgrass to ethanol and acetate by *Clostridium phytofermentans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 2, p. 905-917, 2013.
- KULKARNI, Neelima; VAIDYA, Tejashri; RATHI, Gunjan. Optimization of cellulase production by *Aspergillus* species under solid state fermentation. **Pharm Inn J**, v. 7, n. 1, p. 193-196, 2018.
- LIMA, Janaina de Souza et al. **Imobilização de celulase em caulim e sua aplicação em processos de acabamento têxtil**. 2020.
- MACHADO, Ricardo Dinarti. Enzimas exógenas na alimentação de vacas leiteiras. 2019.
- MANDELS, Mary; WEBER, James. The production of celulasas, 1969.
- MARINHO, Cybelle Crystinne do Prado et al. Estudo das etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática de palha de cana-de-açúcar visando a produção de etanol de segunda geração. 2019.
- MARQUES, Natália Paganini et al. Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 66-75, 2018.
- MARQUES, Natália Paganini. Produção de celulasas por fungos endofíticos e aplicação das enzimas na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar. 2017.

- MARTINS, Igor Magno Nicurgo Borges Rosa et al. Produção e caracterização de celulases e hemicelulases obtidas por cultivo de fungos mesófilos em resíduos agroindustriais. 2019.
- MÉLO, Beatriz Cavalcanti Amorim de et al. Produção de celulases por fermentação em estado sólido em resíduo de acerola (*Malpighia* sp.) utilizando *Trichoderma reesei*. 2016.
- MILLER, Gail Lorenz. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MOREIRA, Fernanda Barros. Subprodutos do algodão na alimentação de ruminantes. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia. ISSN**, v. 1982, p. 1263, 2008.
- MORI, Toshio et al. Identification of novel glycosyl hydrolases with cellulolytic activity against crystalline cellulose from metagenomic libraries constructed from bacterial enrichment cultures. **Springerplus**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2014.
- NAMNUCH, Nattida; THAMMASITTIRONG, Anon; THAMMASITTIRONG, Sutticha Narang. Lignocellulose hydrolytic enzymes production by *Aspergillus flavus* KUB2 using submerged fermentation of sugarcane bagasse waste. **Mycology**, v. 12, n. 2, p. 119-127, 2021.
- NASCIMENTO, Athos Gabriel Gonçalves et al. Genótipos e terços de desenvolvimento de capulhos: Afetam a qualidade da fibra do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). 2019.
- NEAGU, Diana et al. Enzyme-assisted extraction of carotenoids and phenolic derivatives from tomatoes. **Bull UASVM Anim Sci Biotechnol**, v. 71, p. 20-26, 2014.
- OLIVEIRA FILHO, J. G. **Obtenção de peptídeos bioativos a partir de subprodutos de algodão para aplicação em filmes ativos e biodegradáveis**. 2018.
- OLIVEIRA, Manoel Fernando. **Variação da germinação da semente de algodão em função do período de colheita**. 2021.
- OLIVEIRA, Simone Lopes do Rêgo de. Aproveitamento da casca do coco verde (*Cocos Nucifera*, L.) para produção de celulases. 2010.
- OLIVEIRA, P. C. et al. Cocoa shell for the production of endoglucanase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in solid state fermentation and biochemical properties. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 18, n. 3, p. 777-787, 2019.
- OLIVERO, Guendalina et al. The 3Rs: Reduction and refinement through a multivariate statistical analysis approach in a behavioural study to unveil anxiolytic effects of natural extracts of *Tilia tomentosa*. **Biomedical Science and Engineering**, v. 3, n. s3, 2019.
- PARIZA, Michael W.; COOK, Mark. Determining the safety of enzymes used in animal feed. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 56, n. 3, p. 332-342, 2010

- PEIXOTO, Jéssica de Sá Guimarães. Bioprospecção de fungos produtores de enzimas lignocelulolíticas e identificação de novas proteínas auxiliares para aplicação na conversão de biomassa lignocelulósica. 2019.
- PINELA, José et al. Biotransformation of rice and sunflower side-streams by dikaryotic and monokaryotic strains of *Pleurotus sapidus*: Impact on phenolic profiles and bioactive properties. **Food Research International**, v. 132, p. 109094, 2020.
- PINHEIRO, I. R. et al. Estudo das Condições de Fermentação em Estado Sólido para Produção de Celulases Utilizando Biomassa de Cacau. 2019.
- PIROTA, Rosangela Donizete Perpetua Buzon et al. Enhancing xylanases production by a new Amazon Forest strain of *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation under controlled operation conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 465-471, 2013.
- PRASANNA, H. N.; RAMANJANEYULU, G.; RAJASEKHAR REDDY, B. Optimization of cellulase production by *Penicillium* sp. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1-11, 2016.
- RASTOGI, Gurdeep et al. Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. **Bioresource technology**, v. 101, n. 22, p. 8798-8806, 2010.
- RAVINDRAN, Chinnarajan; VARATHARAJAN, Govindaswamy R.; KARTHIKEYAN, Azagesan. Role of alkaline-tolerant fungal cellulases in release of total antioxidants from agro-wastes under solid state fermentation. 2011.
- ROBAK, Katarzyna; BALCEREK, Maria. Review of second generation bioethanol production from residual biomass. **Food technology and biotechnology**, v. 56, n. 2, p. 174-187, 2018.
- RODRIGUES, Johnata Henrique et al. Degradação de madeira de pinus sp. por contato com metabólitos extracelulares de fungos filamentosos. 2019.
- RODRÍGUEZ Couto, Susana. Exploitation of biological wastes for the production of value-added products under solid-state fermentation conditions. **Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology**, v. 3, n. 7, p. 859-870, 2008.
- ROMERA, C. d. O.; DE OLIVEIRA, D.; DE ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Biobased Ester 2-(10-Undecenoyloxy) ethyl Methacrylate as an Asymmetrical Diene Monomer in Thiol–Ene Polymerization. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 58, n. 46, p. 21044-21055, 2019.
- SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ, Sara et al. Biotransformation of lignocellulosic biomass into industrially relevant products with the aid of fungi-derived lignocellulolytic enzymes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 1099-1116, 2020.
- SANTOS, Davi Alves dos. **Produção de celulases e xilanases por fermentação em estado sólido usando palha de carnaúba pré-tratada e avaliação da reutilização do resíduo**. 2017.

- SANTOS, Felipe Augusto et al. Evaluation of the production of cellulases by *Penicillium* sp. FSDE15 using corncob and wheat bran as substrates. **Bioresource Technology Reports**, v. 14, p. 100648, 2021.
- SANTOS, Felipe Augusto et al. Produção de celulases por *Penicillium* sp. FSDE15 e hidrólise enzimática do sabugo de milho. 2021.
- SANTOS, Patrícia de Jesus dos. Época de plantio do algodoeiro e sua relação com a intensidade de ataque do bicudo-do-algodoeiro. 2019.
- ŠELO, Gordana et al. A comprehensive review on valorization of agro-food industrial residues by solid-state fermentation. **Foods**, v. 10, n. 5, p. 927, 2021.
- SETHUPATHY, Sivasamy et al. Harnessing microbial wealth for lignocellulose biomass valorization through secretomics: a review. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, n. 1, p. 1-31, 2021.
- SILVA, Alexandre Alves da. Otimização do pré-tratamento ácido de torta de caroço de algodão e bagaço de malte com farinha de pupunha para produção de bioetanol de segunda geração. 2012.
- SINGH, Anusuiya et al. Improved cellulase production by *Penicillium janthinellum* mutant. 2017.
- SINGHANIA, Reeta Rani et al. An integrative process for bio-ethanol production employing SSF produced cellulase without extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 102, p. 45-48, 2015.
- SINGHANIA, Reeta Rani et al. Bioethanol production from wheat straw via enzymatic route employing *Penicillium janthinellum* cellulases. **Bioresource technology**, v. 169, p. 490-495, 2014.
- SINGHANIA, Reeta Rani et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.
- SOCCOL, Carlos Ricardo et al. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 52-71, 2017.
- SPERANDIO, Guilherme Bento et al. An overview of *Trichoderma reesei* co-cultures for the production of lignocellulolytic enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 8, p. 3019-3025, 2021.
- STEUDLER, Susanne; WERNER, Anett; WALTHER, Thomas. It is the mix that matters: Substrate-specific enzyme production from filamentous fungi and bacteria through solid-state fermentation. **Solid state fermentation**, p. 51-81, 2019.

THAPA, Santosh et al. Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives. *Molecular biotechnology*, v. 61, n. 8, p. 579-601, 2019.

TIŠMA, Marina et al. *Trametes versicolor* in lignocellulose-based bioeconomy: State of the art, challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 330, p. 124997, 2021.

VALLE-PÉREZ, A. U.; FLORES-COSÍO, G.; AMAYA-DELGADO, L. Bioconversion of agave bagasse to produce cellulases and xylanases by *Penicillium citrinum* and *Aspergillus fumigatus* in solid-state fermentation. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, n. 11, p. 5885-5897, 2021.

VIEIRA, Matheus Maitan. **Produção e caracterização de enzimas celulolíticas a partir de resíduos agroindustriais pelo *Aureobasidium pullulans* LB 83 e sua respectiva análise proteômica**. 2020.

WRIGHT, J. D.; WYMAN, C. E.; GROCHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose: Process evaluation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 17, p. 75-90, 1988.

XU, Zi-Han et al. Optimization of solid state fermentation of mixed-culture of *Penicillium* consortium for cellulase and lytic polysaccharide monoxygenases production. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 15, n. 2, p. 180-187, 2021.