

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

ADRIANA OLIVEIRA DOS SANTOS SAMPAIO

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE CELULASES PRODUZIDAS POR  
*Penicillium janthinellum* 3921 EM CAROÇO MOÍDO DE ALGODÃO**

LUÍS EDUARDO MAGALHÃES

2024

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

ADRIANA OLIVEIRA DOS SANTOS SAMPAIO

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE CELULASES PRODUZIDAS POR  
*Penicillium janthinellum* 3921 EM CAROÇO MOÍDO DE ALGODÃO**

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

LUÍS EDUARDO MAGALHÃES

2024

## FICHA CATALOGRÁFICA

---

S192 Sampaio, Adriana Oliveira dos Santos.

Avaliação da estabilidade de celulasas produzidas por *penicillium janthinellum* 3921 em caroço moído de algodão. / Adriana Oliveira dos Santos Sampaio, 2024.

39 f.; il.

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, 2024.

1. Enzimas – Aplicações biotecnológicas. 2. Sementes de algodão - Substrato. 3. Celulasas.

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

**ADRIANA OLIVEIRA DOS SANTOS SAMPAIO**

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE CELULASES PRODUZIDAS POR  
Penicillium janthinellum 3921 EM CAROÇO MOÍDO DE ALGODÃO**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dr. Kaio Cesar da Silva Rodrigues  
Universidade Federal do Oeste da Bahia

---

Prof.a Dr.a Elida Simone Guido

(A versão assinada deste documento encontra-se na Coordenação do Curso)

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha filha (Bianca Oliveira Sampaio) que foi minha maior motivação .

## AGRADECIMENTOS

Uma jornada se finda, e sinto muita gratidão por todo este processo.

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais (Bete e Ateilson) pelo incentivo e confiança que me fizeram mais forte.

Ao Robson, meu amado esposo, e à minha querida filha Bianca, agradeço por todo apoio e incentivo dado ao meu sonho.

Aos meus irmão, especialmente a Aline que sempre me incentivou.

Agradeço aos colegas do grupo de pesquisa, Stefania e Mateus, pela amizade, pelas risadas, pela ajuda e pelo conhecimento compartilhado comigo.

Ao meu orientador Dr.Felipe da Silva Figueira, pela oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa, pela paciência, dedicação e conhecimento compartilhado.

A Francyslayne e Edielma, pela amizade,companheirismo, pela compreensão nos dias de dificuldade, vocês trouxeram leveza durante a jornada.

A todos os bons professores, Por estimular a busca das explicações/respostas. Por toda confiança, muito obrigada!

A todos os amigos que fiz ao longo desses anos.

A todos os colaboradores responsáveis pelo funcionamento e manutenção da Universidade Federal do Oeste da Bahia.

Muito obrigada!

## RESUMO

As celulasas são enzimas responsáveis pela degradação da celulose, sua produção em escala industrial iniciou-se por volta da década de 80 para diversas finalidades, incluindo, aditivo de ração animal, clarificação de sucos e vinhos, dentre outros. Uma das aplicações mais recentes das celulasas é na hidrólise de materiais lignocelulósicos. O algodão é uma das principais commodities da agroindústria no Brasil, e seu processamento resulta em diversos coprodutos como caroço, casca e torta. Estes coprodutos possuem uma característica promissora que é o alto conteúdo de celulose que representa uma valiosa fonte de açúcares fermentescíveis. A obtenção de extratos enzimáticos na forma comercial envolve etapas dispendiosas, financeira e energética, apresentando como consequência o alto custo na produção de enzimas. Torna-se, portanto, necessário a busca por formas de produção economicamente viável. No entanto, somente obter as enzimas não é o suficiente, é necessário conhecer o comportamento dessas enzimas e garantir que elas possuam características adequadas para uma aplicação eficiente. O presente trabalho teve por objetivo analisar a estabilidade enzimática de celulasas produzidas por fermentação em estado sólido (FES) com *Penicillium janthinellum* 3921, utilizando como substrato o caroço moído de algodão. O extrato celulolítico foi obtido utilizando condições otimizadas, sendo elas: concentração de inóculo de  $5,05 \times 10^7$  (esporos/mL), temperatura de 29°C, concentração de nitrogênio e polissorbato de 5% e pH 4,8. O efeito da temperatura sobre as enzimas foi avaliado em pH fixo de 4,8 utilizando diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60 e 70 °C) ao longo de 24 horas. Durante esse período, alíquotas foram retiradas nos tempos de 0, 2, 4, 6, 9, 12 e 24 horas de incubação para a determinação das atividades enzimáticas. A influência do pH foi analisada sob temperatura constante de 25 °C, utilizando os pHs de 3, 4, 5, 6, 7 e 8. Ambos os experimentos foram conduzidos em banho-maria para a incubação. Os resultados demonstraram que as celulasas são mais estáveis e ativas nas temperaturas de 30 e 40°C. Em relação ao pH, as enzimas mostraram um desempenho melhor em pH 6 e 7 com queda significativa da atividade em valores de pH mais elevados, como 8.

**Palavras-chave:** Celulasas, coprodutos lignocelulósico, fermentação em estado sólido, fungos filamentosos, algodão, estabilidade enzimática.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da estrutura de uma fibrila elementar da celulose	16
Figura 2 – Representação da parede celular vegetal	17
Figura 3 – Ação da celulase sobre a molécula de celulose	18
Figura 4 – Efeitos da alta temperatura sobre a estrutura da proteína	21
Figura 5 – Ativação do fungo <i>Penicillium Janthinellum</i> em placa de Petri	24
Figura 6 – Fungo <i>Penicillium Janthinellum</i> inoculado no arroz	25
Figura 7 – Solução de esporos do fungo <i>Penicillium Janthinellum</i>	25
Figura 8 – Ensaio de estabilidade com relação ao pH	25
Figura 8 – Fermentação em estado sólido	27
Figura 9 – Ensaio de estabilidade com relação ao pH.	30

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Composição da solução de salina de Mendel e Weber	26
Tabela 2 – Composição da solução de DNS	29
Tabela 3 – Atividade residual das enzimas celulolíticas sob diferentes pH	34
Tabela 4 – Atividade residual das enzimas celulolíticas sob diferentes temperaturas	35

## 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 Algodão.....	15
4.3 Biomassa lignocelulósica.....	16
4.4 Enzimas celulolíticas.....	17
4.5 Microrganismos produtores de celulasas.....	19
4.6 Fermentação em estado sólido.....	19
4.7 Obtenção de celulasas utilizando coprodutos do algodão.....	20
4.8 Fatores que interferem na estabilidade enzimática.....	20
5 METODOLOGIA.....	23
5.1 Tratamento mecânico e químico do caroço do algodão moído.....	23
5.2 Microrganismo.....	23
5.3 Preparo do inóculo.....	24
5.4 Fermentação em estado sólido.....	26
5.5 Recuperação das enzimas.....	27
5.6 Atividade FPase.....	27
5.8 Avaliação do efeito da temperatura sobre a estabilidade enzimática.....	29
5.9 Avaliação do efeito do pH sobre a estabilidade enzimática.....	29
5.10 Análise estatística.....	30
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
7 CONCLUSÃO.....	36
8 REFERÊNCIAS.....	37

## 1 INTRODUÇÃO

As crescentes preocupações ambientais, o aumento da demanda global de energia e o esgotamento das reservas fósseis estão impulsionando a exploração de fontes de energia renováveis e mais ecologicamente sustentáveis. A biomassa lignocelulósica por ser uma fonte renovável e de baixo custo se mostra uma alternativa viável para produção de bioenergia e biocombustíveis.

O algodão é um produto rico em celulose lignocelulósico muito utilizado na agroindústria, sendo um insumo com diversas aplicações industriais. A safra 2023/2024 de algodão, teve uma colheita de mais de 3,7 milhões de toneladas, elevou o Brasil ao posto de maior produtor do mundo. O país também se tornou, oficialmente, e pela primeira vez na história, o maior exportador de algodão do mundo, superando os Estados Unidos. (Agência Brasil, 2024). No Brasil, a produção de algodão se concentra no Mato Grosso e no Oeste da Bahia (Oliveira, 2021), conseqüentemente, muitos coprodutos são produzidos durante o seu refino. O aproveitamento de coprodutos agroindustriais, além de ser viável economicamente, contribui de forma sustentável para o meio ambiente.

A utilização de coprodutos lignocelulósicos tem como principal desafio a conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis, sendo necessário a utilização de enzimas para hidrólise da estrutura lignocelulósica (Vieira, 2020). As celulasas são um complexo enzimático formado por três grupos principais de enzimas que agem sinergicamente sobre a celulose, sendo elas: endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glicosidase. A endoglucanase inicia a quebra do polímero na região interna resultando na solubilização mais rápida do material, as exoglucanases agem em terminais redutores e não redutores que são formados pelas endoglucanases e a  $\beta$ -glicosidase hidrolisa os celo-oligossacarídeos e celobiose para liberação de glicose (Afonso, 2012). Os extratos enzimáticos na forma comercial envolvem etapas dispendiosas, financeira e energética, apresentando como consequência o alto custo na produção de enzimas (Pinheiro, 2019).

O que permite que as enzimas desempenhem as suas funções é a estrutura tridimensional que define o seu centro ativo, que é o local de ligação aos substratos (Rocha, 2017). As enzimas possuem uma faixa de temperatura ótima na qual são mais ativas. Acima dessa faixa, as altas temperaturas podem causar desnaturação das enzimas, onde as estruturas tridimensionais se desfazem irreversivelmente. Isso resulta na perda permanente da atividade enzimática (Gomes, 2007). Assim como a temperatura, há

também faixa de pH ótimo, mudanças significativas no pH podem quebrar ligações iônicas e pontes de hidrogênio que mantêm a estrutura da enzima (Rocha, 2017).

Neste contexto, considerando que a atividade das enzimas pode ser afetada por variáveis como a temperatura e o pH, é fundamental compreender em que faixas de pH e temperatura a atividade enzimática continua a ser observada. Dentre os diversos fatores que influenciam a estabilidade e a cinética das enzimas, como pH, detergentes e agentes caotrópicos, é a temperatura que provoca modificações mais significativas (Gomes 2007). Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo analisar a estabilidade enzimática de celulases produzidas por *Penicillium janthinellum* 3921 utilizando o caroço moído de algodão.

## 2 JUSTIFICATIVA

As celulasas desempenham uma função crucial na degradação da biomassa lignocelulósica, pois é responsável por quebrar as ligações da celulose, um polímero encontrado na parede celular vegetal. Essa quebra permite a liberação de glicose, que pode ser fermentada para produzir biocombustíveis ou outros produtos úteis. Essas enzimas são fundamentais em diversos processos industriais que envolvem a utilização de biomassa lignocelulósica, produção de ração animal, indústria têxtil, dentre outras (Arruda et al, 2019). No contexto brasileiro, o algodão é uma commodity que gera abundantes coprodutos lignocelulósicos que podem ser utilizados como substrato na produção de enzimas por microrganismos.

A utilização de enzimas celulolíticas consolidadas comercialmente torna o processo de hidrólise. A produção de enzimas por meio de microrganismos utilizando coprodutos do algodão têm surgido como uma opção promissora para viabilizar tais processos, visto que utilizar coprodutos como substrato para produção enzimática torna o processo de produção economicamente viável (Miranda, 2023). No entanto, somente obter as enzimas não é o suficiente, é necessário conhecer o comportamento dessas enzimas e garantir que elas possuam características adequadas para uma utilização eficiente.

Identificar as condições ótimas de estabilidade de uma enzima torna-se essencial para avaliar sua eficiência real em um contexto industrial. A caracterização enzimática é relevante para garantir a eficácia e a viabilidade econômica dos processos que envolvem a degradação da biomassa lignocelulósica.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

- Analisar a estabilidade enzimática de celulases produzidas por fermentação em estado sólido (FES) por *Penicillium janthinellum* 3921 utilizando o caroço moído de algodão.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a estabilidade do complexo celulolítico sob diferentes temperaturas;
- Avaliar a estabilidade do complexo celulolítico sob diferentes valores de pH.

## **4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1 Algodão**

O Brasil se destaca por ser um dos maiores produtores e exportadores mundiais de algodão, com produção estimada de 2,73 milhões de toneladas em 2022/2023, um aumento de 180,7 mil toneladas em relação à safra 2021/2022. Os principais produtores no Brasil, conforme o primeiro levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) para o período 2022/2023, incluem Mato Grosso, Bahia e Mato Grosso do Sul (Coelho, 2023).

O algodão (*Gossypium hirsutum* L) pertence à família Malvaceae, e é botanicamente classificado como planta de crescimento indeterminado. A sua exportação tem crescido significativamente devido ao uso da fibra de algodão como matéria-prima para a indústria têxtil, e suas sementes para obtenção de ração animal e extração de óleo vegetal (Andrade, 2020).

O processamento do algodão é capaz de gerar uma variedade de produtos, que vão desde os itens diretos, como a pluma e o óleo, até os subprodutos, tais como o caroço, casca, torta e farelo de algodão (Moreira, 2008). Estes subprodutos possuem uma característica promissora que é o alto conteúdo de polissacarídeos (cerca de 75%) que representa uma valiosa fonte de açúcares fermentescíveis (Pandyan, 2019).

### **4.2 Pré tratamento no caroço de algodão**

O pré-tratamento do substrato celulolítico é realizado para aumentar a área de superfície e melhorar a acessibilidade das enzimas, por meio de alterações na porosidade e na cristalinidade da celulose. As tecnologias de pré-tratamento incluem uma variedade de processos, sendo essencial avaliar o produto final desejado para escolher o método mais adequado, que pode ser físico, químico ou biológico, para materiais lignocelulósicos. Após o pré-tratamento, enzimas específicas são utilizadas para degradar a celulose e liberar os açúcares fermentáveis (Nilkolic,2017; Houfani,2020).

### 4.3 Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é uma alternativa de substrato econômico. Diversas indústrias estão reavaliando processos para utilizar compostos derivados desses materiais (Saldarriaga-Hernandez et al, 2020). Os subprodutos agroindustriais são considerados benéficos, uma vez que representam uma fonte de energia renovável, favorável ao meio ambiente, não competem com a produção agrícola destinada à alimentação e são especialmente abundantes e de baixo custo (Santiago, 2017). A biomassa lignocelulósica é predominantemente composta por estruturas aromáticas conhecidas como lignina, além de polímeros de carboidratos, como celulose e hemicelulose (Santos, 2021).

A celulose é definida como um homopolissacarídeo composto por moléculas de D-glicose unidas entre si por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas, sendo o polímero mais abundante da parede vegetal. As cadeias de celulose são constituídas por fibras que, por sua vez, são compostas por microfibrilas organizadas de maneira paralela, sendo unidas por ligações de hidrogênio que conferem rigidez à estrutura (Santiago, 2017). As cadeias de celulose possuem regiões cristalinas e amorfas as quais ficam em intervalos irregulares. A Figura 1, Representa a estrutura de uma fibrila elementar da celulose.

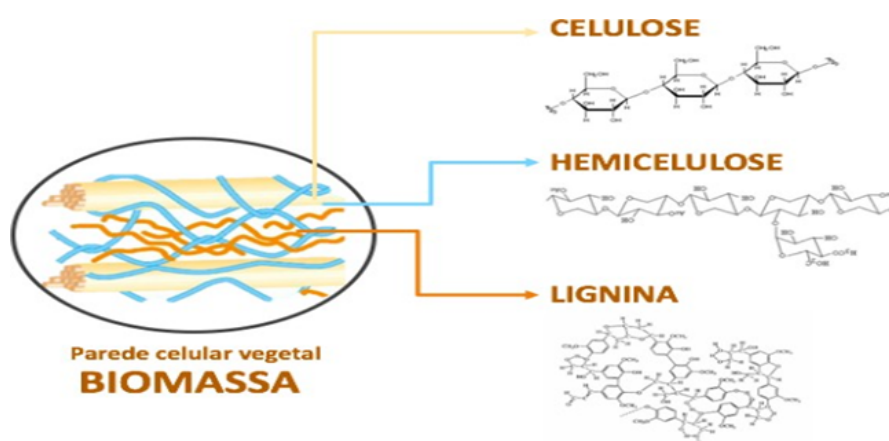
Figura 1 – Representação da estrutura de uma fibrila elementar da celulose.



Fonte: Afonso (2012).

A hemicelulose se encontra na parede vegetal associada à celulose e é constituída de cadeias amorfas e ramificadas de açúcares, como xilose, arabinose, glicose, manose, galactose e outros compostos. Já a lignina é responsável por conferir rigidez à parede celular das plantas e é composta por cadeias amorfas e complexas que proporcionam suporte mecânico, resistência a patógenos e transporte eficiente de água ao longo da estrutura vegetal (Santos, 2021). A Figura 2, demonstra a estrutura da parede celular vegetal.

Figura 2 – Representação da parede celular vegetal



Fonte: Cunha (2020).

#### 4.4 Enzimas celulolíticas

As enzimas são moléculas especializadas que atuam como catalisadores biológicos, sua importância na indústria reside na capacidade de aumentar a velocidade das reações químicas, reduzindo a energia de ativação necessária sem afetar o equilíbrio químico. O complexo enzima-substrato, responsável pela diminuição da energia de ativação, é formado pela ligação da enzima ao substrato. O sítio ativo presente na enzima é responsável pela conversão do substrato em produto (Pinheiro, 2019).

De acordo com o tipo de reação que catalisam, as enzimas são comumente agrupadas em seis categorias distintas como oxirredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (Lima, 2023).

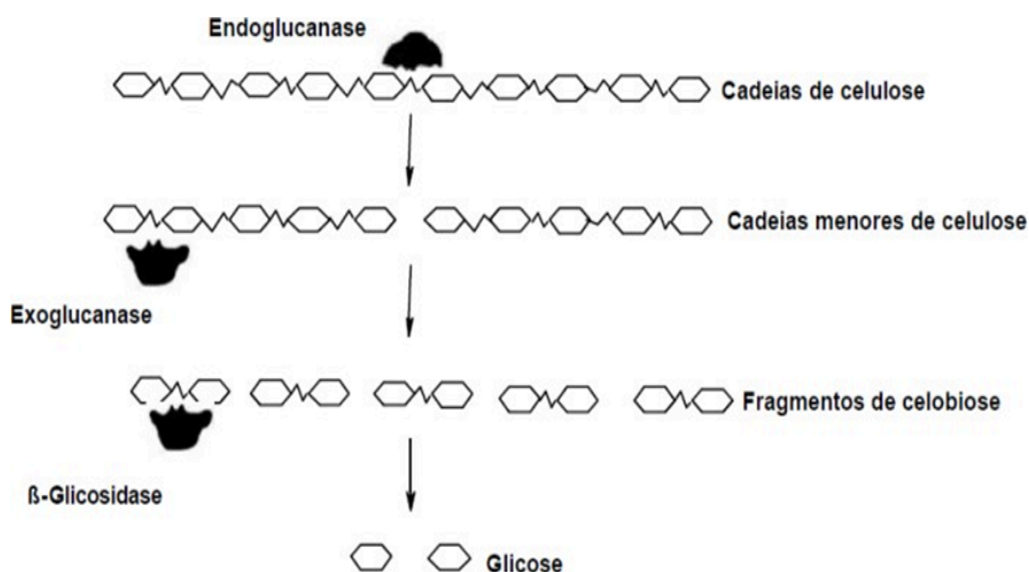
As enzimas celulolíticas, ou celulases, estão incluídas na categoria de hidrolases e

são responsáveis pela degradação da celulose. Sua produção em escala industrial iniciou-se por volta da década de 80 para diversas finalidades, incluindo aditivo de ração animal, clarificação de sucos e vinhos, etc. Uma de suas aplicações mais recente é na hidrólise de materiais lignocelulósicos, possibilitando a liberação de açúcares que são posteriormente utilizados na produção de biocombustíveis, como o etanol (Florêncio et al, 2017; Inforsato et al, 2016).

As celulases são um complexo enzimático formado por três grupos principais de enzimas que agem sinergicamente, sendo esse complexo constituído pelas enzimas: endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases, que apresentam distintas funções na hidrólise da celulose (Santos, 2021).

As endoglucanases desempenham o papel inicial na hidrólise, clivando as ligações glicosídicas nas regiões amorfas da fibra celulósica e gerando oligossacarídeos de cadeia longa com terminais redutor e não redutor. Estes oligômeros ficam disponíveis ao ataque das exoglucanases. As exoglucanases, por sua vez, se ligam às extremidades redutoras e não redutoras das cadeias de celulose, clivando os oligômeros gerados pela ação das endoglucanases, liberando unidades dissacarídicas conhecidas como celobiose. A celobiose, juntamente com outros oligossacarídeos curtos são hidrolisados em monômeros de glicose por meio da ação das  $\beta$ -glicosidases (Santos, 2021; Lima, 2023). A Figura 3, demonstra a ação das celulases sobre a molécula de celulose.

Figura 3 - Ação das celulases sobre a molécula de celulose.



Fonte: modificado de WRIGHT et al (1988)

#### 4.5 Microrganismos produtores de celulases

As celulases são produzidas por uma ampla variedade de microrganismos, abrangendo desde bactérias anaeróbias, como *Clostridium* e *Ruminococcus*, até bactérias aeróbicas, como *Cellulomonas* e *Thermobifida*. Além disso, incluem actinomicetos, como *Streptomyces*, e fungos filamentosos, tais como *Trichoderma*, *Bulgaria*, *Helotium*, *Poria*, *Aspergillus*, entre outros (Florencio, 2011).

Os fungos filamentosos obtêm sua energia, principalmente, por meio da degradação de carboidratos, incluindo materiais lignocelulósicos. Ao longo da evolução, adaptaram-se para metabolizar a celulose e a hemicelulose, tornando-se excelentes produtores de enzimas que degradam a parede celular das plantas, especialmente celulases e hemicelulases (Pinheiro, 2019). Os fungos filamentosos degradam a biomassa lignocelulósica liberando as enzimas necessárias diretamente no meio de crescimento. Esta característica intrínseca é de grande interesse industrial (Pinheiro, 2019).

#### 4.6 Fermentação em estado sólido

A fermentação em Estado Sólido (FES), refere-se ao crescimento de microrganismos em materiais sólidos sem a presença de água livre. No entanto, é essencial que o substrato contenha uma umidade adequada para sustentar o crescimento microbiano (Pinheiro, 2019).

A utilização da FES tem revelado vantagens quando se trata do cultivo de fungos filamentosos, pois mimetiza o ambiente natural desses microrganismos. Essa vantagem se estende à produção de enzimas, resultando em maior produtividade em comparação com a fermentação submersa (Farinas, 2014). Do ponto de vista ambiental, a FES oferece vantagens significativas, como a redução do volume de efluente gerado e a capacidade de operar em condições estéreis. Além disso, é um método adequado para utilizar coprodutos agroindustriais, como bagaço de cana e farelo de trigo, como substratos próprios, aproveitando-os como fontes de carbono e energia (Farinas, 2014).

#### 4.7 Obtenção de celulases utilizando coprodutos do algodão

Alguns trabalhos relatam pesquisas já conduzidas utilizando os subprodutos do algodão como substrato. O potencial do caroço de algodão na produção de celulases fúngicas foi comprovado, observando-se a eficiência no caroço moído sem nenhum pré-tratamento químico, durante análises com microrganismos como o *Trichoderma harzanium* 4127 e o *Penicillium janthinellum* 3921 (Neto, 2022).

Pinheiro (2019) analisou a utilização da torta de algodão para a produção de celulase. O estudo empregou *Aspergillus tubingensis* AN1257 com uma concentração de inóculo de  $1 \times 10^5$  esporos/mL para induzir a produção no subproduto. A fermentação submersa foi empregada para obter o extrato enzimático, e as avaliações da atividade enzimática foram realizadas a cada 24 horas durante a fermentação. As atividades máximas de FPases e CMCases foram observadas em meio contendo 1,65% e 2,05% de biomassa, resultando em 0,13 U/mL e 0,092 U/mL, respectivamente.

Em um estudo de otimização na produção de celulases conduzido por Miranda (2023), verificou-se que, ao analisar diversos substratos como fibrila, caroço e torta do algodão, a maior produção de celulases foi alcançada ao empregar o caroço de algodão moído.

#### 4.8 Fatores que interferem na estabilidade enzimática

As enzimas exibem uma estabilidade condicionada ao ambiente em que se encontram. Suas estruturas, organizadas em vários níveis hierárquicos, são sustentadas por interações dentro da cadeia polipeptídica. Qualquer alteração no entorno da proteína pode resultar na perda de sua atividade, devido à modificação das interações intra e intermoleculares, um fenômeno conhecido como desnaturação. Esse processo pode ser compreendido como a redução da atividade biológica que a proteína normalmente desempenha, resultante da desorganização estrutural (Silva, 2018).

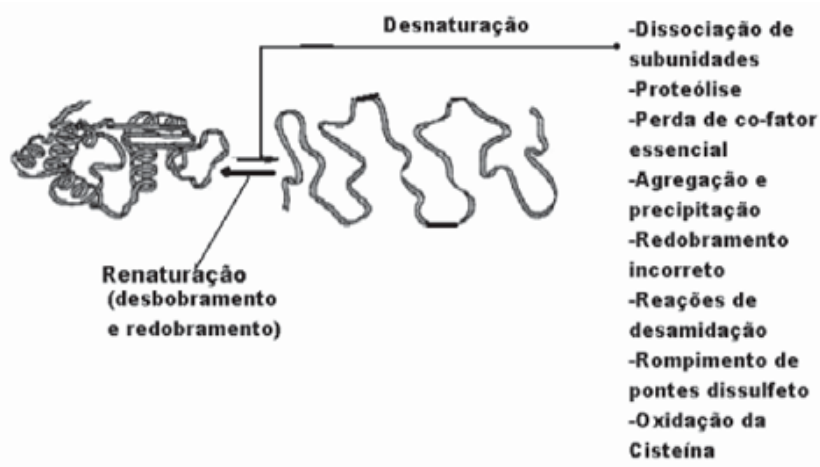
O pH e a temperatura são parâmetros de grande influência na atividade enzimática. A termoestabilidade de uma enzima envolve tanto sua estabilidade térmica dinâmica quanto sua estabilidade cinética. A estabilidade térmica dinâmica ( $T_m$ ) corresponde ao ponto em que 50% da enzima se desdobra, enquanto a estabilidade térmica cinética reflete

a meia-vida ( $T_{1/2}$ ) da enzima a uma temperatura específica. A enzima é mantida por um delicado balanço de forças não covalentes, como pontes de hidrogênio, pareamento de íons, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals. Com o aumento da temperatura, essas interações são rompidas e a proteína se desdobra. Após o resfriamento algumas enzimas recuperam sua conformação ativa, entretanto, para a maioria, a desnaturação é irreversível (Gomes, 2007).

O pH, por sua vez, pode influenciar a estrutura das proteínas de forma significativa. As enzimas podem suportar pequenas variações de pH, mas quando as mudanças são substanciais, os aminoácidos terminais que as constituem reagem com o meio. Os aminoácidos com grupos ionizáveis desempenham funções cruciais na interação das proteínas com outras moléculas, nos processos enzimáticos e têm um impacto significativo na estrutura, estabilidade e solubilidade das proteínas (ROCHA, 2017).

As enzimas desnoveladas assumem configurações dispersas que têm a capacidade de se agrupar. Esse processo de agregação ocorre quando resíduos hidrofóbicos, que geralmente permanecem no interior da molécula nativa, são expostos ao solvente devido ao desenovelamento, resultando na interação com resíduos hidrofóbicos de outras cadeias também desenoveladas. Esses agrupamentos resultam em precipitação, caracterizando assim a desnaturação da enzima (GOMES, 2007). A figura 4, ilustra o mecanismo de desnaturação proteica.

Figura 4 - Efeitos da alta temperatura sobre a estrutura da proteína.



Fonte: Gomes, (2007)

Nos últimos 20 anos, o ascomiceto *Penicillium* surgiu como um bom produtor de celulases. Diversas espécies desse gênero demonstram uma ampla variedade de celulases, destacando-se pela boa estabilidade a 50°C, característica importante para aplicações industriais (CHRISTOPHER *et al*, 2021).

Pinheiro (2019) verificou por meio de seus estudos com desenvolvimento de bioprocesso para a produção de enzimas holocelulolíticas por *Aspergillus tubingensis* AN1257 utilizando torta de caroço de algodão como fonte de carbono, que as condições ótimas avaliadas para a aplicação do extrato enzimático bruto são em temperaturas de 40 a 50°C e valor de pH 4,0.

Subissay (2022) demonstrou em seus estudos que as enzimas celulases produzidas pelo fungo *Penicillium* sp. FSDE 15 apresentam boa tolerância à temperatura e valores baixos de pH. As enzimas CMCases e FPases apresentaram atividade ótima em 50°C. Além disso, as enzimas ainda apresentaram atividade, embora com valor mais reduzido, na temperatura de 90°C. O ensaio de determinação do pH ótimo demonstrou que as enzimas têm melhor atuação em pH ácido. Foi encontrado o valor de 3,84 como pH ótimo das atividades de CMCases e AVICELases e 2,88 para as FPases. As celulases presentes no extrato bruto do fungo *Penicillium* sp. FSDE 15 demonstraram características adequadas de pH e temperatura ótima para aplicação em processos de hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos.

Alves (2020) constatou por meio da produção de celulases por *Aspergillus japonicus* URM5620 e *Aspergillus niger* URM5741 através de diferentes processos fermentativos utilizando bagaço de cana de açúcar como substrato, que a celulase apresenta atividade ótima na faixa de 30 a 50°C e pH 4,0, mostrando-se estável numa faixa de temperatura de 50 a 70°C.

## 5 METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no Laboratório 3 da Universidade Federal do Oeste da Bahia, Centro Multidisciplinar de Luís Eduardo Magalhães – CMLEM. O caroço do algodão foi obtido de produtores da região. A escolha desse substrato ocorre devido ao caroço moído ser mais biodisponível para o fungo, quando comparado à fibrila e a torta de algodão (Miranda, 2023). Antes de ser submetido à FES para produção das enzimas celulolíticas, o caroço moído passou por tratamento mecânico e químico.

O fungo filamentosso utilizado no experimento foi o *Penicillium janthinellum* 3921 cedido pela Fundação Oswaldo Cruz. Para conservação do microrganismo foram realizados repiques periódicos em tubos de ensaio inclinado contendo meio ágar batata dextrose (PDA) e mantidos a 4°C.

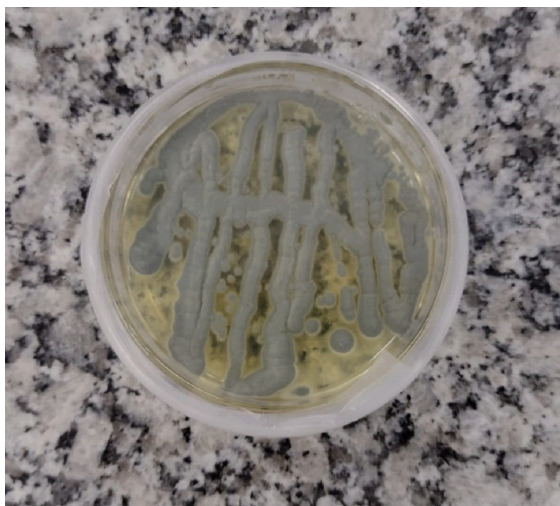
### 5.1 Tratamento mecânico e químico do caroço do algodão moído

O caroço do algodão (200 g) foi submetido a um tratamento físico em moinho de facas, sem granulometria padronizada. O tratamento químico do caroço de algodão foi realizado seguindo o método descrito por Fockink (2018). Para tal, 20 g do coproduto moído, sem granulometria padronizada, foram tratados em solução de hidróxido de sódio (NaOH) 6% a 120°C por 1 hora. Após o tratamento, o material foi lavado com água destilada até atingir pH neutro e seco em estufa a 60°C por 12 horas até alcançar massa constante.

### 5.2 Microrganismo

A reativação do microrganismo foi realizada em placa de Petri contendo meio ágar batata dextrose (PDA), e incubado durante 7 dias à 28°C em incubadora orbital tipo Shaker. Após a reativação da cepa, foi obtida a solução de esporos (inóculo).

Figura 5 - Ativação do fungo *Penicillium janthinellum* em placa de Petri.



Fonte: autoral.

### 5.3 Preparo do inóculo

O fungo reativado foi inoculado no arroz, seguindo o protocolo utilizado por (Miranda, 2023). Foi colocado 50 g de arroz submerso em água destilada por 30 minutos, em seguida com o auxílio de uma peneira foi retirado o excesso de água presente no arroz. Posteriormente, o arroz umidificado foi transferido para um Erlenmeyer de 250 mL e levado para autoclavar a 120°C durante 15 minutos. Após o resfriamento, o fungo ativado foi removido da placa de Petri e inoculado no arroz estéril em uma capela de fluxo laminar. O frasco contendo o fungo foi incubado a 28°C por 7 dias..

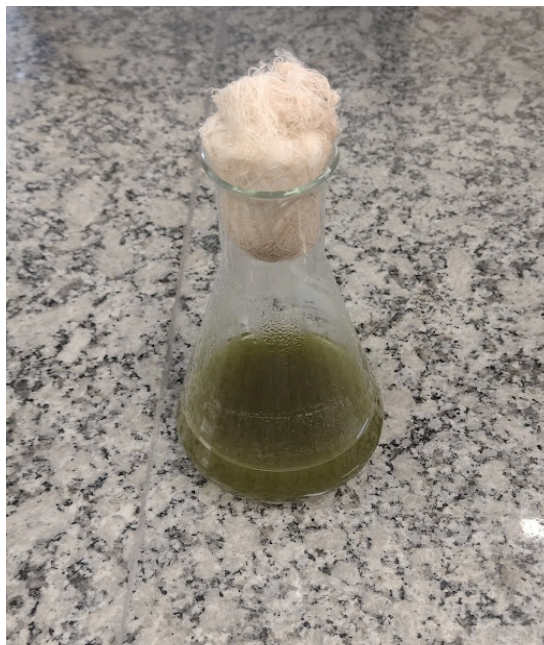
A solução de esporos foi obtida com adição de 200 mL da solução salina de Mandels & Weber (preparada conforme a composição descrita na Tabela 1) ao Erlenmeyer contendo o arroz inoculado. Em seguida, o Erlenmeyer foi agitado para obter uma suspensão homogênea de esporos. Em seguida, o conteúdo foi filtrado através de compressas de gaze estéril e transferido para uma câmara de Neubauer para a quantificação dos esporos, permitindo a determinação da concentração da solução. Por fim, a solução resultante foi armazenada em uma geladeira a 4°C.

Figura 6 - Fungo *Penicillium janthinellum* inoculado no arroz.



Fonte: autoral.

Figura 7 - Solução de esporos do fungo *Penicillium janthinellum*.



Fonte: autoral

Tabela 1: Composição da solução salina de Mendel &amp; Weber.

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

#### 5.4 Fermentação em estado sólido

Estudos preliminares realizados por Miranda (2023) determinaram as condições otimizadas para a fermentação, sendo elas: concentração de inóculo de  $5,05 \times 10^7$  (esp/mL) para cada grama de substrato, temperatura de 29°C, concentração de nitrogênio e polissorbato de 5% e pH 4,8. As condições otimizadas citadas acima foram utilizadas para realizar a fermentação utilizando a solução de esporos dos fungos *P. janthinellum* 3921.

A FES para obtenção das enzimas celulolíticas foi realizada em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL durante 7 dias. A escolha do tempo de fermentação ocorreu devido a esse período já ter sido utilizado por grupo de pesquisa de Engenharia de Biotecnologia do Campus Multidisciplinar de Luís Eduardo Magalhães (CMCLEM) da Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB), em estudos anteriores não publicados.

Figura 8 - Fermentação em estado sólido.



Fonte: autoral

### 5.5 Recuperação das enzimas

O extrato enzimático foi obtido seguindo o procedimento descrito por Santos (2017). Após o término da FES, foram adicionados 10 mL de tampão citrato de sódio (0,05 mol/L e pH 4,8) ao substrato fermentado. As amostras foram vigorosamente agitadas em um agitador vórtex e, em seguida, submetidas à centrifugação a 3500 rpm por 20 minutos. A solução resultante foi filtrada a vácuo, resultando na obtenção do extrato celulolítico bruto, o qual foi submetido à avaliação de sua estabilidade.

### 5.6 Atividade FPase

Para determinar a atividade enzimática foi utilizada a metodologia descrita por Ghose (1987) utilizando como substrato o papel de filtro (FP), previamente recortado em tiras de 1x6 cm. As tiras de papel foram colocadas em tubos de ensaio, aos quais foram acrescentados 1 mL de uma solução tampão de citrato de sódio (0,05 mol/L e pH 4,8) e 0,5 mL do extrato enzimático. O experimento ocorreu em um banho-maria, com temperatura de 50°C, por um período de 60 minutos.

Após, foi coletada da amostra uma alíquota de 0,625 mL e transferida para outro tubo de ensaio. Nesse mesmo tubo, foi adicionado 0,625 mL de solução de DNS. Os tubos foram submetidos a banho-maria por 5 minutos a 100°C, e em seguida foram resfriados em banho de gelo. Para concluir, foram adicionados 10 mL de solução de tartarato duplo de sódio e potássio. A leitura da amostra foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. A atividade de FPase foi calculada utilizando a Equação 1.

$$FPase = \frac{(AR)*(VT)}{0,18*(VE)*(TH)} \quad (1)$$

Em que,

AR = concentração de açúcares redutores (umol/mL) ;

VT = volume total (mL);

0,18 = fator de conversão de *mg* para  $\mu\text{mol}$  de glicose;

VE = volume de extrato (mL);

TH = tempo de hidrólise (min).

## 5.7 determinação dos açúcares redutores

Para quantificar os açúcares redutores foi utilizado o protocolo desenvolvido por Miller (1959). Em tubos de ensaio foram adicionados 0,625 mL da amostra e 0,625 mL de uma solução de DNS, com reagentes descritos na tabela 2. Estes tubos foram submetidos a um banho-maria a 100°C por 5 minutos e, em seguida, resfriados rapidamente em um banho de gelo. Após o resfriamento, foram acrescentados 10 mL de uma solução de tartarato duplo de sódio e potássio aos tubos de ensaio. Posteriormente, a leitura da absorbância foi realizada em triplicata para cada amostra coletada, utilizando um espectrofotômetro UV-Vis em comprimento de onda de 540 nm. Foi construída nas mesmas condições da amostra uma curva padrão de glicose, na faixa de 0,1 a 1,0 g.L<sup>-1</sup>, sendo obtida a partir desta curva a equação para calcular a concentração de açúcares redutores.

Tabela 2 - Composição da solução de DNS.

Componentes	Concentração
Ácido Dinitrosalicílico (DNS)	7,48 g/L
Hidróxido de sódio	13,98 g/L
Fenol	5,36 mL/L
Metabissulfito de sódio	5,89 g/L

### 5.8 Avaliação do efeito da temperatura sobre a estabilidade enzimática

O efeito da temperatura sobre a estabilidade enzimática foi avaliado utilizando metodologia modificada descrita por McIlvaine (1921). O extrato celulolítico bruto com pH 4,8, recuperado após a fermentação, foi incubado em banho-maria sob diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60 e 70°C) durante 24 horas. Neste período, foram retiradas alíquotas em 0, 2, 4, 6, 9, 12 e 24 horas de incubação para determinação das atividades enzimáticas, conforme metodologia descrita anteriormente (Item 5.6). As análises foram realizadas em triplicata.

### 5.9 Avaliação do efeito do pH sobre a estabilidade enzimática

O efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas FPases foi avaliado seguindo a metodologia de McIlvaine (1921), conforme descrito a seguir. O extrato celulolítico bruto com pH 4,8 foi fracionado em amostras que tiveram seu pH ajustado nos valores de 3, 4, 5, 6, 7 e 8. Os ajustes de pH foram realizados utilizando soluções de (NaOH) 1% e (HCl) 1%. Em seguida, as amostras foram submetidas à incubação em banho-maria a 25°C durante 24 horas. Neste período, foram retiradas alíquotas em 0, 2, 4, 6, 9, 12 e 24 horas de incubação para determinação das atividades enzimáticas conforme metodologia descrita anteriormente (Item 5.6). As análises foram realizadas em triplicata.

Figura 9 - Ensaio de estabilidade com relação ao pH.



Fonte: autoral

### 5.10 Análise estatística

Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e teste Tukey a um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da termoestabilidade enzimática demonstrou que as enzimas FPases mantiveram-se estáveis sob temperatura de até 40°C durante 12 horas de incubação. De acordo com a avaliação pode-se constatar que as enzimas apresentam maiores níveis de atividade enzimática quando incubada em temperatura de 30°C. Para a temperatura de 50°C, as enzimas mantiveram uma atividade residual de 60% durante 4 horas de incubação. No entanto, os níveis de atividade enzimática foram irrelevantes, já que as enzimas preservaram 60% de sua atividade por apenas 4 horas. Dessa forma, pode-se inferir que a temperatura de 50°C não se mostrou estável quando comparada aos resultados obtidos em temperaturas mais baixas, como 30°C e 40°C. Ademais, quando incubadas sob temperatura igual ou superior a 60°C, as enzimas tiveram sua atividade toda perdida após duas horas de incubação. A figura 8, demonstra a termoestabilidade das enzimas celulolíticas.

As enzimas apresentam estabilidade dependente do ambiente em que estão inseridas, sendo que o aumento da temperatura pode causar o rompimento de sua estrutura, ocasionando a perda de sua estabilidade (Gomes, 2007; Silva, 2018).

As implicações do aumento da temperatura também são evidenciadas no trabalho de Pereira (2022), que avaliou a atividade enzimática de enzimas glicosídicas ( $\beta$ -glucanases), produzidas pela levedura *Rhodotorula oryzae*, em temperaturas de 50 a 70°C e intervalos variando de 0 a 50 min. As condições ótimas de atividade enzimática foram obtidas na temperatura de 50°C e pH 8,0 com atividade de 0,9601  $\mu\text{mol}/\text{min}$ . Após 30 minutos de incubação em 50, 60 e 70°C a atividade enzimática manteve-se em 100%, 94,6% e 62,39%, respectivamente.

Em estudo realizado por Pinheiro (2019) obteve-se enzimas FPases produzidas por *Aspergillus tubingensis* AN1257 em fermentação submersa utilizando torta de caroço de algodão, com maior estabilidade em temperaturas abaixo de 40°C durante 24 horas de incubação em pH 5,0. Neste mesmo estudo pode-se constatar que enzimas  $\beta$ -glucosidases tiveram sua atividade totalmente perdida quando incubadas em temperaturas superiores a 60°C.

Os ensaios realizados para avaliar a influência do pH sobre a estabilidade enzimática revelaram que as FPases tiveram boa atividade residual em todas as faixas de pH ao longo das 24 horas de análise, sendo interessante o aumento do tempo de análise

para melhor verificação de qual pH a enzima demonstra ser menos estável. Contudo, durante o período de incubação pode-se observar que as enzimas apresentaram um aumento da atividade com a elevação do pH, atingindo seu pico em pH 6,0, seguido por uma queda acentuada da atividade em pH 8. A figura 11 ilustra a estabilidade das enzimas celulolíticas com relação ao pH.

A boa estabilidade enzimática obtida com o pH 6 está alinhada com as condições ideais para a produção de  $\beta$ -glicosidases, conforme descrito por Martins (2019), que também utilizou o pH 6 em seus estudos.

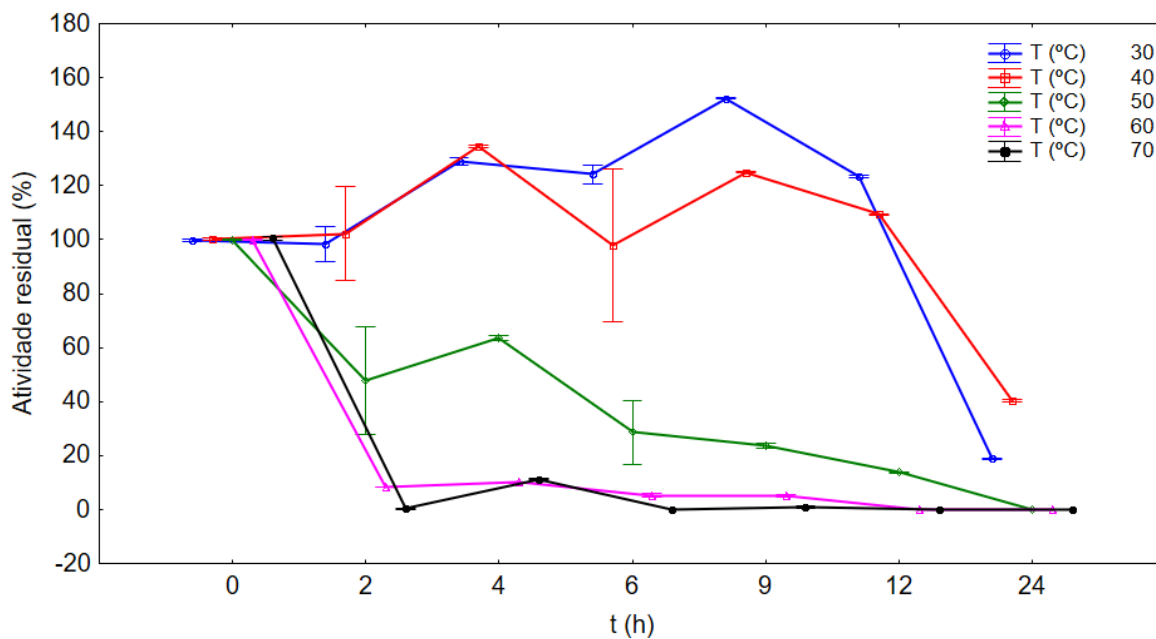
A temperatura e o pH influenciam de forma significativa a eficiência enzimática, mudanças substanciais no pH do meio em que as enzimas estão inseridas fazem com que os aminoácidos terminais que as constituem reajam com o meio provocando sua desestabilização (Rocha, 2017).

Observa-se nas figuras 10 e 11 que a atividade enzimática aumenta em determinados intervalos de tempo, isso pode ter ocorrido porque as enzimas podem passar por mudanças conformacionais que aumentam sua estabilidade quando expostas a certas condições, como temperaturas moderadas ou presença de estabilizadores.

Ao analisar as Tabelas 3 e 4 observa-se uma diferença estatisticamente significativa entre os valores de atividade enzimática obtidos. Isso indica que as variações nas atividades enzimáticas em cada experimento não são fruto do acaso, mas sim consequência das temperaturas e pHs aplicados.

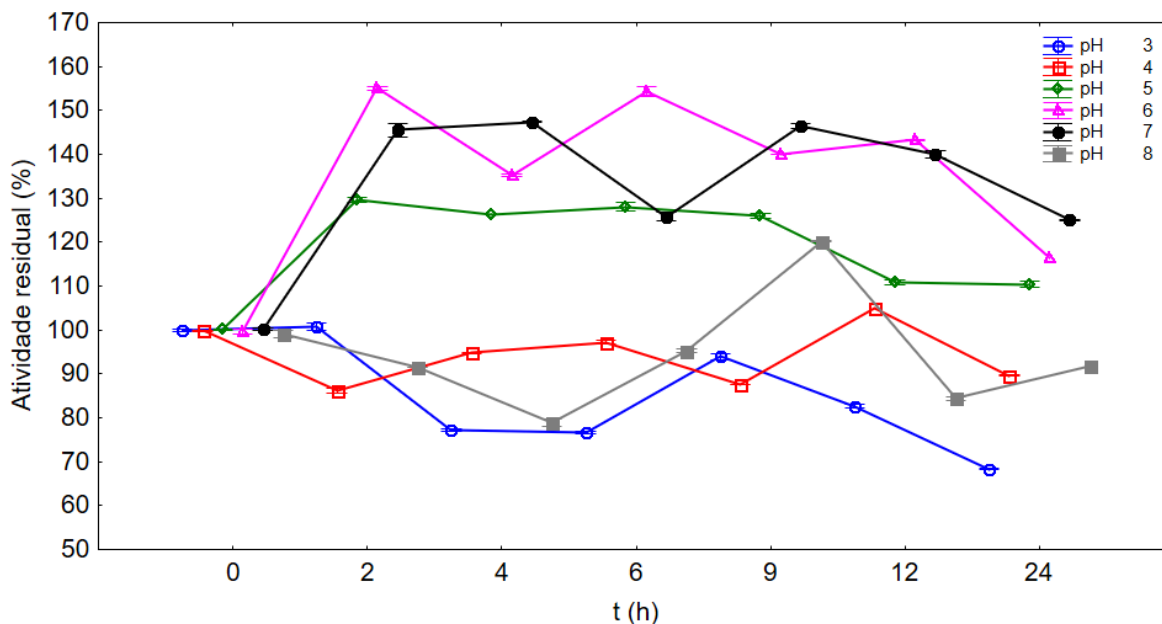
Os dados obtidos demonstram semelhança com os resultados obtidos por Martins (2019), isso sugere que o extrato celulolítico produzido por *Penicillium janthunellum* 3921 em caroço moído de algodão pode também ser aplicado em processos de sacarificação enzimática.

Figura 10 - Termoestabilidade de enzimas celulolíticas produzidas por *Penicillium janthinellum* em fermentação semi-sólida



Fonte: autoral.

Figura 11 - Estabilidade de enzimas celulolíticas sob diferentes valores de pH produzidas por *Penicillium Janthinellum* em fermentação semi-sólida.



Fonte: autoral

Tabela 3: Atividade residual das enzimas celulíticas produzidas por *Penicillium Janthinellum* em fermentação semi-sólida nos diferentes tempos de avaliação sob diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	t (h)	Atividade residual (%)	Desvio (±)	Temperatura (°C)	t (h)	Atividade residual (%)	Desvio (±)
30	0	99,80 <sup>ef</sup>	0,47	50	9	23,66 <sup>abc</sup>	0,84
30	2	98,37 <sup>ef</sup>	6,65	50	12	13,76 <sup>abc</sup>	0,27
30	4	128,94 <sup>fg</sup>	1,46	50	24	0,00 <sup>a</sup>	0,00
30	6	124,15 <sup>fg</sup>	3,33	60	0	99,94 <sup>ef</sup>	0,12
30	9	152,41 <sup>fg</sup>	0,39	60	2	8,39 <sup>abc</sup>	0,14
30	12	123,29 <sup>fg</sup>	0,47	60	4	10,03 <sup>abc</sup>	0,14
30	24	18,88 <sup>bc</sup>	0,21	60	6	5,25 <sup>ab</sup>	0,55
40	0	100,22 <sup>ef</sup>	0,28	60	9	4,97 <sup>ab</sup>	0,48
40	2	102,22 <sup>ef</sup>	17,35	60	12	0,00 <sup>a</sup>	0,00
40	4	134,52 <sup>fg</sup>	0,33	60	24	0,00 <sup>a</sup>	0,00
40	6	97,76 <sup>ef</sup>	28,30	70	0	100,46 <sup>ef</sup>	0,52
40	9	125,03 <sup>g</sup>	0,16	70	2	0,28 <sup>a</sup>	0,14
40	12	109,27 <sup>f</sup>	0,05	70	4	11,21 <sup>abc</sup>	0,28
40	24	40,40 <sup>bcd</sup>	0,33	70	6	0,00 <sup>a</sup>	0,00
50	0	99,91 <sup>ef</sup>	0,16	70	9	1,00 <sup>a</sup>	0,51
50	2	47,66 <sup>cd</sup>	19,85	70	12	0,00 <sup>a</sup>	0,00
50	4	63,53 <sup>de</sup>	0,82	70	24	0,00 <sup>a</sup>	0,00
50	6	28,66 <sup>abcd</sup>	11,73				

\*letras diferentes significam diferença significativa ao nível de 95% de significância

Tabela 4: Atividade residual das enzimas celulolíticas produzidas por *Penicillium Janthinellum* em fermentação semi-sólida nos diferentes tempos de avaliação sob diferentes pHs.

pH	t (h)	Atividade residual (%)	Desvio ( $\pm$ )	pH	t (h)	Atividade residual (%)	Desvio ( $\pm$ )
3	0	99,82 <sup>kl</sup>	0,27	6	0	99,70 <sup>kl</sup>	0,50
3	2	100,74 <sup>l</sup>	0,81	6	2	155,06 <sup>w</sup>	0,47
3	4	77,17 <sup>b</sup>	0,30	6	4	135,25 <sup>s</sup>	0,31
3	6	76,70 <sup>b</sup>	0,18	6	6	154,34 <sup>w</sup>	1,13
3	9	93,92 <sup>ghi</sup>	0,67	6	9	140,04 <sup>t</sup>	0,11
3	12	82,58 <sup>c</sup>	0,43	6	12	143,28 <sup>u</sup>	0,06
3	24	68,30 <sup>a</sup>	0,10	6	24	116,56 <sup>o</sup>	0,00
4	0	99,83 <sup>kl</sup>	0,22	7	0	100,32 <sup>kl</sup>	0,32
4	2	86,18 <sup>d</sup>	0,64	7	2	145,48 <sup>uv</sup>	1,50
4	4	94,75 <sup>hi</sup>	0,11	7	4	147,38 <sup>v</sup>	0,18
4	6	97,21 <sup>jk</sup>	0,49	7	6	125,85 <sup>q</sup>	1,08
4	9	87,52 <sup>de</sup>	0,06	7	9	146,49 <sup>v</sup>	0,51
4	12	104,98 <sup>m</sup>	0,00	7	12	139,99 <sup>t</sup>	0,77
4	24	89,62 <sup>ef</sup>	0,10	7	24	125,07 <sup>q</sup>	0,07
5	0	100,08 <sup>kl</sup>	0,08	8	0	99,16 <sup>kl</sup>	0,85
5	2	129,6 <sup>f</sup>	0,50	8	2	91,49 <sup>fg</sup>	0,01
5	4	126,31 <sup>q</sup>	0,00	8	4	78,89 <sup>b</sup>	0,87
5	6	128,02 <sup>qr</sup>	1,04	8	6	95,27 <sup>ij</sup>	0,39
5	9	126,03 <sup>q</sup>	0,65	8	9	120,23 <sup>p</sup>	0,19
5	12	110,83 <sup>n</sup>	0,59	8	12	84,39 <sup>cd</sup>	0,33
5	24	110,43 <sup>n</sup>	0,66	8	24	91,83 <sup>fgh</sup>	0,00

\*letras diferentes significam diferença significativa ao nível de 95% de significância

## 7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que as enzimas FPases apresentam boa estabilidade térmica em temperaturas de até 40°C, com maior atividade enzimática observada a 30°C. A 50°C, no entanto, embora tenham demonstrado alguma atividade residual, essa estabilidade foi limitada a poucas horas, o que demonstra que a temperatura não é ideal para a manutenção da atividade enzimática. Além disso, temperaturas iguais ou superiores a 60°C resultaram na perda completa da atividade enzimática em um curto período, indicando que essas condições não são adequadas para a preservação das FPases.

Em relação ao pH, as enzimas mostraram um desempenho melhor em pH 6 e 7, com queda significativa da atividade em valores de pH mais elevados, como 8. Embora os ensaios tenham demonstrado uma resposta positiva ao longo das 24 horas em diferentes faixas de pH, é recomendável a extensão do tempo de análise para identificar melhor os limites de estabilidade. Esses dados sugerem que as enzimas estudadas são mais estáveis e ativas em condições de temperatura moderada e pH neutro.

## 8 REFERÊNCIAS

- ABRAPA. Disponível em < <https://soudealgodao.com.br/abrapa/>>. Acesso em 29/10/2023.
- ALBUQUERQUE, Fabiana Sarmento de et al. Produção e purificação da (s) celulase (s) produzida (s) pelo fungo *Coleosporium plumeriae* em diferentes meios de cultura. 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.
- ANDRADE, Brunna Laleska Caetano de. Influência da densidade do solo e profundidade de plantio na emergência do algodoeiro. 2020.
- ARRUDA, Adam Gonçalves et al. Produção de celulases em fermentação em estado sólido a partir de resíduos agroindustriais. 2019.
- AZMI, Muhammad Atif Azhari Mohd; JALIL, Rafidah; KALIL, Mohd Sahaid. Production of Cellulase from *Pycnoporus sanguineus*. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 9, p. 21, 2016.
- BRAGA, Anna Rafaela Cavalcante. **Obtenção e caracterização da enzima  $\beta$ -galactosidase submetida a diferentes processos: purificação, imobilização e altas pressões**. 2012. Tese de Doutorado. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil.
- BRASIL. Brasil ultrapassa EUA e já é maior exportador de algodão do mundo. Disponível em: <<https://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2024-07/brasil-ultrapassa-eua-e-ja-e-maior-exportador-de-algodao-do-mundo#:~:text=O%20desempenho%20da%20safra%202023>>.
- COÊLHO, Jackson Dantas. Agropecuária: Algodão. 2023.
- CUNHA, Izabel Figueiredo et al. Análise térmica e pirólise analítica de sabugo de milho. 2020.
- DUTTA, S.; WU, K. C. W. Enzymatic breakdown of biomass: enzyme active sites, immobilization, and biofuel production. *Green chemistry*, v. 16, n. 11, p. 4615-4626, 2014.
- EMBRAPA. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/80631760/pesquisas-da-embrapa-com-algodao-tem-dois-focos-prioritarios-fibras-de-alta-qualidade-e-baixo-impacto-ambiental>>. Acesso em 29/10/2023.
- FARINAS, Cristiane Sanchez et al. Desenvolvimentos em fermentação em estado sólido para produção de enzimas de interesse agroindustrial. 2014.
- FLORENCIO, Camila. Microrganismos produtores de celulases: seleção de isolados de *Trichoderma* spp. 2011.

FLORENCIO, C; BADINO, A C.; FARINAS, C. S. Current challenges on the production and use of cellulolytic enzymes in the hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Química Nova*, v. 1, p. 1, 2017.

FREITAS, Ynaê Rossetti de. O futuro sustentável da matriz energética brasileira: a importância e viabilidade do etanol de segunda geração no período de transição com ênfase no setor de transportes. 2022.

GOMES, Eleni et al. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química nova**, v. 30, p. 136-145, 2007.

HOUFANI, Aicha Asma et al. Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars—a review. *Biomass and Bioenergy*, v. 134, p. 105481, 2020.

INFORSATO, Fábio José; PORTO, André Luiz Meleiro. Atividade enzimática de celulases pelo método DNS de fungos isolados de sementes em germinação. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 5, n. 4, p. 444-465, 2016.

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

MARTINS, Eduardo Henrique et al. POTENCIAL DE OBTENÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS A PARTIR DO FARELO DE CANOLA EMPREGANDO-SE AS  $\beta$ -GLICOSIDASES PRODUZIDAS POR *Penicillium glabrum*. 2019.

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.

McIlvaine, T.C. 1921. A buffer solution for colorimetric comparison. *Journal of Biological Chemistry*, 49: 185-186.

MIRANDA, R.P. Otimização da produção de celulases utilizando subproduto de algodão como substrato. Luís Eduardo Magalhães, BA, 2023.

MOREIRA, Fernanda Barros. Subprodutos do algodão na alimentação de ruminantes. *Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia*. ISSN, v. 1982, p. 1263, 2008.

NETO, P.F.M. Otimização de celulases por fungos filamentosos utilizando subprodutos de algodão como substrato. Luís Eduardo Magalhães, BA, 2022.

NIKOLIĆ, Svetlana et al. Production of bioethanol from pre-treated cotton fabrics and waste cotton materials. *Carbohydrate polymers*, v. 164, p. 136-144, 2017.

OLIVEIRA, Manoel Fernando. Variação da germinação da semente de algodão em função do período de colheita. 2021.

PANDIYAN, K. et al. Technological interventions for utilization of crop residues and weedy biomass for second generation bio-ethanol production. *Renewable Energy*, v. 132, p. 723-741, 2019.

PEREIRA, Manuela Oliveira et al. Produção de  $\beta$ -1, 3-glucanase por *Rhodotorula oryzae* isolada do semiárido baiano. 2022.

PINHEIRO, Thais Santos. Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus tubingensis* AN1257 em torta de caroço de algodão em biorreator instrumentado. 2019.

Rocha, Filipa Raquel Assunção Poças de. *Estabilidade térmica de proteínas na presença de líquidos iônicos*. MS thesis. 2017.

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, Hévila Brognaro dos. Estudo do potencial enzimático hidrolítico e oxidativo do microorganismo *Myceliophthora thermophila* M. 7.7. 2014.

SANTOS, Felipe Augusto et al. Produção de celulases por *Penicillium* sp. FSDE15 e hidrólise enzimática do sabugo de milho. 2021.

SANTIAGO, Bárbara Luiza Silva; RODRIGUES, Fábio de Ávila. Processamento de biomassa lignocelulósica para produção de etanol: Uma revisão. 2017.

SILVA, V; CONSTESINI, F; CARVALHO, P. Characterization and Catalytic Activity of Free and Immobilized Lipase from *Aspergillus niger*: a Comparative Study. *Sociedade Brasileira de Química*, v. 19, nº 8, 1468-1474, 2008.

SILVA, Sérgio Ruschi Bergamachi. Avaliação da termoestabilidade, atividade e resistência a ambientes ácidos de uma enzima de interesse biotecnológico via dinâmica molecular. 2018.

SIQUEIRA, A. J. S. et al. Determinação do  $K_m$  e  $V_{Max}$ : revisão e uma nova proposta. *Ciência em Movimento*, v. 13, n. 27, p. 47-52, 2011.

SUBISSAY, Heritier Kabamba. DETERMINAÇÃO DE TEMPERATURA ÓTIMA E pH ÓTIMO DAS CELULASES PRODUZIDAS POR *PENICILLIUM* SP. FSDE 15. 2022.

TORRES, G. A., et al. *Aproveitamento de Resíduos Agrícolas*. 2012. Disponível em <<https://www.sbvt.ibict.br/dossie-tecnico/downloadsDT/NTcwMQ==>>. Acesso em 29/10/2023.

VIEIRA, Matheus Maitan. **Produção e caracterização de enzimas celolíticas a partir de resíduos agroindustriais pelo *Aureobasidium pullulans* LB 83 e sua respectiva análise proteômica**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 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.