

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

PEDRO FERREIRA DE MEDEIROS NETO

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR FUNGOS FILAMENTOSOS UTILIZANDO
RESÍDUOS DE ALGODÃO COMO SUBSTRATO**

LUÍS EDUARDO MAGALHÃES

2022

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

PEDRO FERREIRA DE MEDEIROS NETO

PRODUÇÃO DE CELULASES POR FUNGOS FILAMENTOSOS UTILIZANDO
RESÍDUOS 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

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

M448 Medeiros Neto, Pedro Ferreira de.

Produção de celulases por fungos filamentosos utilizando resíduos de algodão como substrato / Pedro Ferreira de Medeiros Neto. – 2022.

66 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, 2022.

1. Celulases. 2. Fungos filamentosos – Aplicações Biotecnológicas. 3. Agricultura de algodão. Bahia, região oeste da.

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

PEDRO FERREIRA DE MEDEIROS NETO

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR FUNGOS FILAMENTOSOS UTILIZANDO
RESÍDUOS DE ALGODÃO COMO SUBSTRATO**

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

Luís Eduardo Magalhães – BA, 19 de Agosto de 2022.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof.^a Dr.^a. Elida Simone Guido
Instituto Federal da Bahia

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

RESUMO

O uso da celulase em larga escala ainda é limitado devido ao seu custo elevado de produção, assim, os processos industriais seguem utilizando métodos químicos tradicionais. A procura por um modo de produção mais viável, para obter grandes quantidades de celulase, tem expectativas no uso da biomassa lignocelulósica de resíduos agroindustriais, principalmente pelo seu baixo custo comercial e grande disponibilidade. Através do uso dos resíduos do algodão, uma das principais culturas na agricultura do país e na região oeste da Bahia, realizou-se o estudo da produção de celulases fúngicas. Utilizando os fungos filamentosos *Trichoderma harzanium* 4127 e *Penicillium janthinellum* 3921 avaliou-se o potencial de produção de cada substrato, os resíduos na forma de fibrilha, caroço moído e torta do algodão, através da fermentação em estado sólido (FES). Realizou-se, através do planejamento de Plackett-Burman, a FES com o fungo *Penicillium janthinellum* 3921 e o caroço de algodão moído, com a finalidade de conseguir melhores resultados, onde foi possível obter com os parâmetros controlados de pH, temperatura, umidade, Tween-80 e nitrogênio, uma atividade de FPase de 0,8216 U/g.

Palavras-chave: Celulase, biomassa lignocelulósica, resíduos agroindustriais, algodão, caroço de algodão, fermentação em estado sólido, fungos filamentosos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas das classes enzimáticas durante a hidrólise da celulose em glicose.	18
Figura 2 – Rede de ligações de hidrogênio entre as cadeias da celulose.....	24
Figura 3 - Caroço de algodão moído (CM) no moinho de facas.	32
Figura 4 - Fluxograma de ordem de processos para a caracterização físico-química.	33
Figura 5 - Fermentação dos fungos, <i>T. harzanium</i> 4127 e <i>P. janthinellum</i> 3921, em arroz. ...	40
Figura 6 - Solução de esporos dos fungos <i>T. harzanium</i> 4127 e <i>P. janthinellum</i> 3921.	41
Figura 7 - Caroço de algodão moído (CM) após o pré-tratamento alcalino com NaOH	43
Figura 8 - Diagrama de Pareto mostrando as variáveis significativas com $p \leq 0,05$	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das enzimas seguindo as normas NC-IUBMB.....	15
Tabela 2 – Atividade de FPase obtida com diferentes fungos e substratos.	31
Tabela 3 - Composição salina do meio de Mandels & Weber.	40
Tabela 4 - Parâmetros estabelecidos pelo planejamento de Plackett-Burman.	43
Tabela 5 - Caracterização físico-química dos substratos.....	47
Tabela 6 – FPase obtida no ensaio de concentração com <i>Penicillium janthinellum</i> 3921.	48
Tabela 7 – FPase obtida no ensaio de concentração com <i>Trichoderma harzanium</i> 4127.....	49
Tabela 8 - FPase obtida no pré-tratamento químico para <i>Penicillium janthinellum</i> 3921 (P) e <i>Trichoderma harzanium</i> 4127 (T).	50
Tabela 9 - FPase obtida pela FES seguindo o planejamento de Plackett-Burman com <i>Penicillium janthinellum</i> 3921.	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	JUSTIFICATIVA	12
3	OBJETIVOS	14
3.1	Objetivo geral.....	14
3.2	Objetivos específicos	14
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
4.1	Enzimas.....	15
4.1.1	Enzimas celulolíticas	16
4.1.2	Aplicação das enzimas celulolíticas.....	18
4.2	Fungos filamentosos.....	21
4.2.1	<i>Trichoderma harzanium</i>.....	22
4.2.2	<i>Penicillium janthinellum</i>.....	23
4.3	Substratos para produção de celulase.....	23
4.3.1	Resíduo do Algodão	25
4.3.2	Produção de celulase utilizando o resíduo do algodão	26
4.4	Pré-tratamento	27
4.5	Fermentação em estado-sólido (FES).....	28
4.5.1	Fatores que influenciam na fermentação em estado sólido	29
4.5.2	Produção de celulase por meio de fungos filamentosos em FES	30
5	METODOLOGIA.....	32
5.1	Caracterização físico-química do resíduo.....	33
5.1.1	Determinação do teor de umidade	33
5.1.2	Determinação do teor de cinzas.....	34
5.1.3	Determinação do teor de extrativos	35
5.1.4	Determinação do teor de lignina	36
5.1.5	Determinação do teor de holocelulose	37
5.1.6	Determinação do teor de celulose.....	38
5.1.7	Determinação do teor de hemicelulose	38
5.2	Obtenção das linhagens de fungos.....	39
5.3	Preparo do inóculo.....	39
5.4	Ensaio de concentração de substrato.....	41
5.5	Pré-tratamento do resíduo do algodão.....	42

5.6	Planejamento experimental	43
5.7	Fermentação em estado sólido para obtenção das enzimas	44
5.8	Extração das enzimas	45
5.8.1	Determinação de açúcares redutores por DNS	45
5.8.2	Atividade de FPase	45
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
6.1	Caracterização físico-química	47
6.2	Fermentação em estado sólido	48
6.2.1	Ensaio de concentração de substrato	48
6.2.2	Pré-tratamento do substrato.....	49
6.2.3	Planejamento estatístico de Plackett-Burman	51
7	CONCLUSÃO.....	54
8	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	55
9	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

Grandes quantidades de resíduos são geradas diariamente a partir de processos industriais, principalmente da agroindústria. Para melhor utilização desses resíduos tem-se desenvolvido diversos estudos, visando ampliar o seu aproveitamento, principalmente devido a sua viabilidade econômica e alta disponibilidade, promovendo seu uso sustentável¹.

O algodão é um dos produtos da agroindústria de maior aplicabilidade, sendo um material bastante utilizado como matéria-prima em diversos setores industriais. A utilização do algodão como matéria-prima, principalmente na forma de fibras de algodão refinadas, faz com que sejam geradas toneladas de resíduo anualmente. Cerca de 25 milhões de toneladas de algodão são produzidas mundialmente por ano, sendo uma grande parcela utilizada para o refinamento das fibras e, desse modo, o que acaba não sendo utilizado durante o processo torna-se resíduo^{2,3}.

Os resíduos do algodão podem ser classificados de acordo com como ele é gerado ou obtido. De acordo com a Portaria nº 630, de 30 de março de 2004, define-se como resíduos de algodão os produtos, ou partes deles, que foram separados no beneficiamento das fibras, fazendo parte desses resíduos a fibrilha e o caroço do algodão. A fibrilha geralmente é o resíduo produzido em maior quantidade, devido a sua constituição ser em grande parte por fibras e fragmentos de fibras. O caroço do algodão trata-se de um material que é separado da fibra durante o processo de beneficiamento, porém o mesmo pode ser utilizado na produção de subprodutos como a torta de algodão, material rico em celulose⁴.

O material lignocelulósico presente na parede celular dos resíduos do algodão, como a hemicelulose, celulose e lignina, atuam como ótimos indutores para que possa ocorrer a produção de celulasas e, assim, a obtenção dos extratos enzimáticos. A necessidade de um pré-tratamento do resíduo ocorre devido ao interesse em tornar acessível aos microrganismos esses constituintes, bem como retirar a camada de lignina presente no material que pode inibir a produção enzimática, visando assim, aumentar a conversão dos polissacarídeos, durante a hidrólise enzimática, em açúcares solúveis livres^{5,6}. Dependendo da forma como ocorre o pré-tratamento do material pode ocorrer a produção de inibidores que atuam na fermentação e na hidrólise enzimática, além da degradação do material celulolítico de interesse, sendo necessário obter um método de pré-tratamento que não degrade o material de interesse e que seja possível obter o máximo de material capaz de produzir celulasas⁵.

A celulase é definida como um conjunto de enzimas que atuam de forma que cada uma é responsável por uma atividade durante a hidrólise enzimática, sendo essas enzimas a celobiohidrolase (CBH; EC 3.2.1.91), endoglucanase (EG; EC 3.2.1.4) e β -glicosidase (BGL; EC 3.2.1.21). Essas enzimas quando combinadas em proporções adequadas são capazes de aumentar a taxa de conversão de celulose em açúcares livres^{6,7}.

Os fungos filamentosos são responsáveis pelos grandes volumes de produção de celulase, sendo assim os mais utilizados para realizar a degradação enzimática da celulose. Estudos mostram que os fungos além de produzirem uma maior quantidade de celulases do que as bactérias possuem um custo-benefício melhor, sendo que isso ocorre devido ao acúmulo de micélio, fazendo-se do material acessível para ser separado e, portanto, ajuda a reduzir o custo do processo de separação do meio de fermentação. Esses fungos apresentam uma ampla faixa de estabilidade de temperatura e pH que os tornam superiores para a produção dessas enzimas para hidrolisar a biomassa lignocelulolítica⁸.

A Biotecnologia surge com a possibilidade de aprimorar essas técnicas visando o lado sustentável e de melhor custo-benefício, favorecendo assim a ampliação da produção em larga escala. Sendo assim, a realização da análise físico-química da fibrilha, do caroço e da torta de algodão, para quantificar a quantidade de celulose, lignina e hemicelulose presente no material, a fermentação em estado-sólido utilizando fungos filamentosos, *Trichoderma harzanium* 4127 e *Penicillium janthinellum* 3921, para obtenção dos extratos enzimáticos, e a realização de um planejamento estatístico, para analisar os resultados das celulases obtidas, são formas de identificar como a obtenção dessas enzimas pode ser ainda maior.

2 JUSTIFICATIVA

Os processos industriais são caracterizados por diversas etapas, onde comumente são gerados materiais remanescentes que não entram na composição do produto final, sendo esse resíduo passível de reutilização quando tratado de forma correta. Os resíduos agroindustriais são gerados em milhares de toneladas anualmente, principalmente ao considerar-se os milhares de hectares onde são produzidos os diversos produtos como soja, milho e algodão. O descarte dos resíduos produzidos do agronegócio, por serem gerados em milhares de toneladas, geralmente não possuem o tratamento correto, sendo comumente descartado através de queimadas.

O Brasil é um dos principais produtores no agronegócio, sendo o algodão um dos seus principais produtos. A safra de 2020/21, segundo dados da Associação Brasileira dos Produtores de Algodão⁹, obteve cerca de 2.678 milhares de toneladas de pluma produzida onde ocupando uma área de 1.510 mil hectares em toda a extensão do país. A produção em grande escala está diretamente ligada também a grande produção de resíduos, principalmente ao realizar-se o refinamento da fibra do algodão, um dos processos em que mais gera-se material remanescente.

Os estudos referentes ao aproveitamento dos resíduos vêm se intensificando, onde a biotecnologia atua veemente com o aperfeiçoamento de técnicas e metodologias em que se visa a sustentabilidade e o menor impacto ambiental. O reaproveitamento dos resíduos do algodão, como a casca do caroço na compostagem¹⁰ e a fibrilha na produção de etanol celulósico¹¹, tornam o material bastante atrativo por possuir finalidades que diminuem o impacto ambiental. A celulose presente nos resíduos é responsável pelo grande valor atrativo no material, isso ocorre devido a obtenção de açúcares solúveis a partir da hidrólise enzimática da celulose para a produção de etanol celulósico.

A celulase, enzima responsável pela hidrólise da celulose, pode ser produzida em larga escala utilizando-se de fungos e bactérias, sendo a obtenção através dos fungos filamentosos a melhor alternativa em custo-benefício. A biomassa residual do algodão torna-se um meio interessante para a atuação dos fungos filamentosos, pela alta taxa de celulose presente e pela capacidade de realizar a obtenção de celulase através da fermentação em estado sólido.

A grande produção de algodão no Brasil, em destaque na região oeste do estado da Bahia, faz com que o estudo da obtenção de celulasas a partir da biomassa dos resíduos do material

seja bastante viável. As condições abordadas associadas com a biotecnologia, para obter uma finalidade aos resíduos, tornam o processo ainda mais rentável. Desse modo, a produção de celulasas com o uso de fungos filamentosos mostra-se como uma das formas de se aproveitar do material que seria facilmente descartado. O estudo da produção de celulasas e a avaliação do substrato, a fibrilha, o caroço e a torta do algodão, desempenham um papel essencial para compreender a eficiência em obter enzimas com esses materiais.

Desse modo, a avaliação da atividade enzimática obtida desse substrato com a atuação dos fungos filamentosos, no presente trabalho realizado com o *Trichoderma harzanium* 4127 e o *Penicillium janthinellum* 3921, possui grande importância para a compreender a capacidade de produção de celulasas e como pode-se obter o aumento avaliando diferentes parâmetros.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Produzir celulases por fungos filamentosos por meio de fermentação em estado sólido utilizando a fibrilha, torta de algodão e o caroço do algodão como substrato.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a caracterização físico-química dos resíduos do algodão – fibrilha, caroço e torta de algodão;
- Avaliar diferentes proporções de fibrilha e torta de algodão para a produção da celulase;
- Realizar o pré-tratamento químico do material para avaliar a produção de celulase;
- Promover a fermentação em estado sólido dos resíduos do algodão, não-tratado e pré-tratado, para avaliar a produção de celulases com *Trichoderma harzanium* 4127 e *Penicillium janthinellum* 3921;
- Realizar a extração enzimática para avaliar a produção e a atividade enzimática de celulase fúngicas;
- Realizar um planejamento experimental de Plackett-Burman para avaliar a produção de celulases fúngicas em diferentes condições de cultivo com o *Penicillium janthinellum* 3921 e o caroço de algodão moído.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Enzimas

As enzimas são macromoléculas biocatalizadoras que desempenham um papel importante em diversas reações bioquímicas. As enzimas, em sua maioria, são proteínas envolvidas nos processos metabólicos, catalisando as reações, e são de grande interesse devido as suas características físico-químicas¹². O uso de enzimas nos processos industriais, principalmente os biotecnológicos, vem crescendo cada vez mais por estarem diretamente ligadas à sua alta eficiência, baixo custo energético no processo e por ser economicamente viável¹³. Essas propriedades das enzimas levaram ao seu uso e produção em grandes escalas onde, conseqüentemente, o seu uso em novos bioprocessos industriais vem ganhando cada vez mais destaque.

As enzimas são classificadas de acordo com o processo que a mesma é capaz de catalisar. Essas macromoléculas podem catalisar diferentes transformações quando disponibilizado os reagentes e as condições necessárias, sendo assim, podem ser utilizadas em vários substratos, catalisando reações que naturalmente não seriam possíveis¹⁴. A classificação das enzimas é realizada de acordo com o tipo de reação ao qual está envolvida, sendo as classes definidas pelo Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)¹⁵, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação das enzimas seguindo as normas NC-IUBMB¹⁵.

CLASSE	REAÇÃO	ENZIMAS
Oxirredutases	Catalisa as reações de oxidação e redução entre as moléculas.	Oxigenase, peroxidase, catalase
Transferases	Envolvida na transferência de grupos químicos entre as moléculas.	Transaminases, glicosiltransferase
Hidrolases	Catalisa a hidrolise do substrato.	Celulases, proteases, amilases, lipases
Liases	Envolvida na formação ou quebra de ligações duplas em grupos funcionais.	Dehidratases, descarboxilases

Isomerases	Catalisa o rearrançamento geométrico cis-trans das moléculas.	Epimerases, mutases, topoisomerases
Ligases	Catalisa a formação de ligações químicas, consumindo ATP.	Sintetases, carboxilase,
Translocases	Catalisa o movimento dos íons e moléculas entre membranas.	ATP translocase, ADP translocase

Compreender a classificação e a forma de atuação das enzimas torna possível aplicar essas macromoléculas específicas em processos biotecnológicos que possuem reações particulares. O mercado global de enzimas cresce constantemente e estima-se que em 2021 o faturamento tenha sido de R\$ 34,51 bilhões^{16*}. Dentre os diversos grupos de enzimas, a versatilidade das hidrolases faz com que estas sejam as mais utilizadas industrialmente, com aplicação na biodegradação de polímeros naturais como amido, celulose, proteínas, além de outros produtos.

4.1.1 Enzimas celulolíticas

As enzimas celulolíticas são as responsáveis pela hidrólise da celulose, tendo assim, grande importância em uma ampla gama de processos industriais, incluindo a produção de biocombustíveis, bebidas, alimentos, rações, polímeros e tecidos¹³. A celulose é um polímero natural formado por β -1,4-glicose, desse modo, podendo ser hidrolisado por uma variedade de glicosídeos hidrolases, como a celulase. As celulases apresentam diferentes modos de ação, sendo de forma interna (endo- β 1,4-glucanase) ou externa (celobiohidrolases), diferindo assim como a mesma irá atuar no substrato¹⁷.

O mercado das enzimas é um dos mais amplos, principalmente das hidrolases, sendo a maioria das celulases enzimas mesófilas, produzidas pelos fungos filamentosos *Trichoderma* spp. e *Aspergillus* spp. As enzimas são produzidas por diversos microrganismos, especialmente pelos fungos e bactérias; entretanto, os fungos têm se destacado pela capacidade de produzir grandes quantidades de celulases e hemicelulases, que são secretadas para o meio de cultura, facilitando as etapas de extração e purificação¹⁸. Dentre os diversos microrganismos produtores

* Conversão de dólares americanos (USD) para reais (BRL) realizada dia 13/07/2022. Cotação de 1 USD = BRL 5,3932

de celulase as produzidas por *Trichoderma* spp. demonstraram ser as mais eficientes em realizar a hidrólise completa de substratos lignocelulósicos em glicose¹⁹. A alta produtividade enzimática reflete bem ao fato de que os fungos filamentosos são capazes de produzir proteínas em grandes quantidades, sendo assim, são completamente viáveis em produzir essas enzimas em escala industrial^{18,19}.

As celulasas e hemicelulasas (xilanasas), além das demais enzimas envolvidas na hidrólise do material celulolítico, são enzimas que juntas formam um grupo capaz de agir sobre os materiais de origem lignocelulósica, promovendo sua hidrólise. Essas enzimas agem sinergicamente para despolimerizar os polissacarídeos vegetais transformando-os em glicose e outros monossacarídeos, sendo tal processo o ideal para a produção em escala industrial do bioetanol de segunda geração, além de outros produtos²⁰. Os microrganismos são uma fonte rica para a produção de sistemas hidrolíticos envolvidos na quebra de polissacarídeos presentes na parede celular vegetal. A eficiência da bioconversão desses polímeros em açúcares depende diretamente do sistema enzimático disposto para o processo, que certamente irá incluir um amplo grupo de hidrolases²¹.

O termo holocelulose se refere ao conjunto de celulose e hemicelulose presente na biomassa celulósica. As enzimas capazes de hidrolisar o conjunto de holocelulose, como as celulasas, hemicelulasas e pectinases, pertencem a um grupo de enzimas chamadas holocelulasas que apresentam, por sua vez, mecanismos de hidrólise ácida/básica onde se tem a retenção ou inversão da configuração anomérica no ponto de clivagem²¹. A celulase pode ser dividida em três classes: a endoglucanase (EG - EC 3.2.1.4) capaz de iniciar a hidrólise a partir da quebrar as ligações glicosídicas das cadeias de celulose, a celobiohidrolase (CBH - EC 3.2.1.91) responsável por agir nos terminais que levam à celobiose e a β -glicosidase (EC 3.2.1.21), responsável por hidrolisar a celobiose em glicose²². As estruturas das classes enzimáticas citadas, e as diferenças entre elas, pode ser observada na Figura 1.

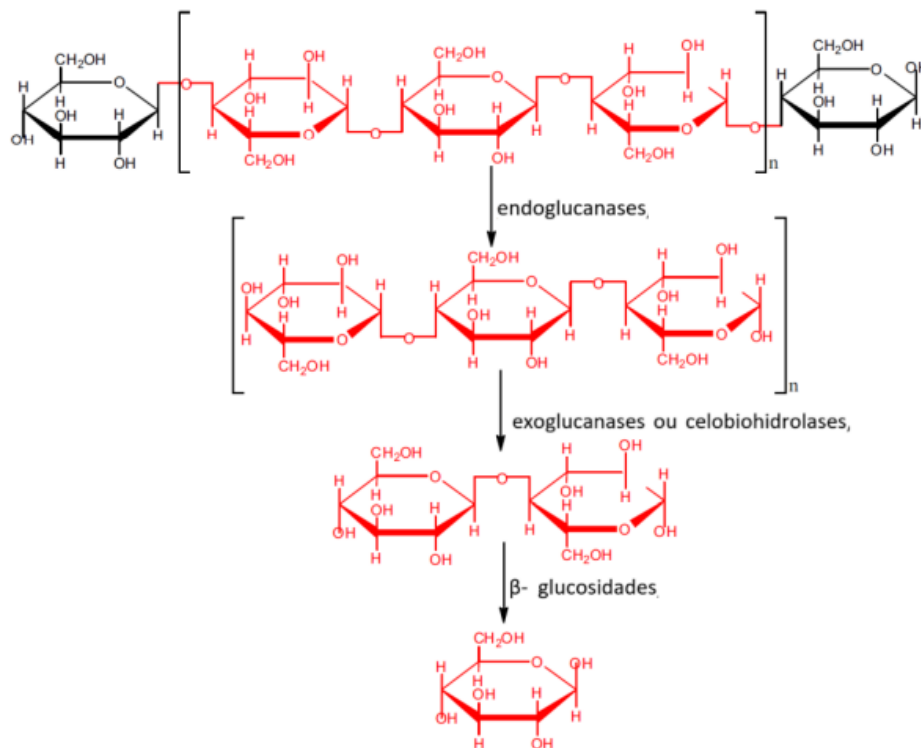


Figura 1 - Estruturas das classes enzimáticas durante a hidrólise da celulose em glicose²².

A degradação da hemicelulose impõe vários desafios intrínsecos ao microrganismo e as enzimas. As hemicelulases são essenciais para realizar a degradação da biomassa vegetal, e dentre as classes dessas enzimas se destacam as endo-1,4- β -xilanases (EC 3.2.1.8), β -D-xilosidases (EC 3.2.1.37), α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), α -glucuronidases (EC 3.2.1.139), acetil-xilan-esterases (EC 3.1.1.72)²³. Os substratos dessas enzimas, as hemiceluloses, são um grupo heterogêneo de polissacarídeos ramificados e lineares unidos por interações intermoleculares às microfibrilas de celulose presentes na parede celular vegetal, formando uma rede robusta a ser degradada^{24, 25}.

4.1.2 Aplicação das enzimas celulolíticas

Um estudo referente a demanda industrial por enzimas realizado pela BBC Research, em agosto de 2021, revela que a demanda global por enzimas industriais deve crescer 6,3% durante o período de 2021-2026, atingindo a marca de R\$ 42,92 bilhões[†] em 2026¹⁶. O estudo

[†] Conversão de dólares americanos (USD) para reais (BRL) realizada dia 13/07/2022. Cotação de 1 USD = BRL 5,3932

também enfatiza os ganhos econômicos nos países em desenvolvimento onde se tem essa produção, além de realizar uma análise de mercado nos diversos segmentos industriais onde utiliza-se as enzimas. O desenvolvimento de estudos, relatórios e pesquisas científicas sobre enzimas, em suas diversas classes, decorre principalmente das áreas da biotecnologia, genética e biologia molecular, onde aliadas dispõem diversas análises quanto ao seu uso, sua estrutura e o potencial de mercado²⁶.

A utilização de enzimas celulolíticas em processos industriais vem ganhando cada vez mais relevância, com aplicações no beneficiamento de produtos na indústria farmacêutica, têxtil, alimentícia, na produção de etanol, ração animal, dentre outras¹. As aplicações das celulases têm se expandido nos últimos anos devido aos esforços feitos no estudo de sua função, na otimização de sua produção e no seu aprimoramento por meio da biotecnologia, visando sempre o desenvolvimento sustentável com o uso de estratégias contra o desperdício⁶.

A hidrolase e a oxidorreductase são as duas classes de enzimas mais utilizadas nas indústrias têxteis¹². As celulases, da classe de hidrolase, são eficazes na remoção da pilosidade dos fios de celulose que são usados na produção têxtil, auxiliando assim na aparência do tecido e conferindo brilho à cor²².

Obter tecidos tratados de alta resistibilidade é essencial para garantir a qualidade a longo prazo desses materiais. Sankarraaj e Nallathambi (2018)²⁷ verificaram, após testes com celulase livre e imobilizada, que o biopolimento do tecido de algodão terá uma melhor resposta com o tratamento utilizando a celulase imobilizada, principalmente pela sua forma de ação na superfície do tecido sem afetar a resistência do material. O uso abundante de produtos químicos na indústria têxtil ocorre nas diversas etapas de processamento. O descarte inadequado desses resíduos químicos afeta diretamente o meio ambiente, desse modo, as alternativas para diminuir o uso de produtos químicos surgem com o uso de produtos biológicos. Chatha, Asgher e Iqbal (2017)²⁸ realizaram um estudo comparativo no qual o biotratamento com enzimas demonstra ser um ótimo substituto do tratamento químico, obtendo assim processos menos poluentes com estratégias sustentáveis.

As celulases em combinação com outras enzimas, como as xilanases e pectinases, têm sido utilizadas na produção de sucos, para aumentar seus rendimentos, além do uso na clarificação dos mesmos. Essas enzimas são capazes de reduzir a viscosidade, melhorarem a estabilidade dos componentes e manter as propriedades aromáticas dos sucos e das polpas de frutas durante o processamento²². Sharma et al. (2014)²⁹, demonstram que o uso de celulase e

pectinase, em conjunto, aumentam a obtenção do suco, a clarificação e diminui a viscosidade e a turbidez do produto final.

A produção de enzimas a partir de resíduos também pode ocorrer na indústria de alimentos, Ogrizek (2021)³⁰ verificou a possibilidade de utilizar os resíduos obtidos durante a produção de vinho, como os bagaços das uvas, para obter bactérias celulolíticas para produzir celulase. Wojdyło et al. (2020)³¹ realizaram um estudo comparativo entre as técnicas de micro-ondas, termomaceração e tratamento enzimático para o pré-tratamento do conteúdo fenólico e para o aprimoramento da cor do vinho do tipo Dornfelder e obtiveram resultados positivos quanto ao uso do tratamento enzimático.

O interesse na conversão de biomassa celulósica em biocombustível desencadeou-se da demanda por fontes sustentáveis de energia. A aplicação das enzimas na indústria da biorrefinaria, principalmente nos processos biotecnológicos, para a obtenção de produtos de alto valor agregado a partir da biomassa vegetal, é um dos desafios científicos mais importante atualmente³².

O uso das enzimas na indústria de biorrefinaria envolve vários processos no qual a primeira etapa, após a seleção do substrato para obtenção do produto, envolve o pré-tratamento da biomassa. Após essa etapa, os componentes da biomassa são submetidos a uma combinação de processos biológicos e/ou químicos onde a compreensão do sinergismo enzimático é crucial para aumentar a velocidade de conversão de biomassa e reduzir o tempo de hidrólise, fatores importantes que determinam como melhorar a capacidade de hidrólise de substratos celulósicos³³.

Pesquisas demonstram que misturas com celulase se mostram eficientes devido a capacidade de ação de diferentes enzimas celulolíticas na hidrólise. Champreda et al (2019)³⁴ realizaram estudos do uso de misturas enzimáticas para hidrolisar a biomassa celulósica e comprovaram que a utilização de diferentes enzimas obtidas de diferentes microrganismos possui uma maior eficácia. As misturas enzimáticas podem ser obtidas por várias estratégias, incluindo a criação de um microbioma ou derivadas de uma preparação enzimática de multiespécies.

4.2 Fungos filamentosos

A produção industrial de celulases é destinada a diversas aplicações, onde em todas as suas vertentes o uso dessas enzimas ocorre em grande quantidade para conseguir hidrolisar toda a biomassa celulósica. Os fungos e as bactérias são considerados os maiores e mais eficientes produtores da enzima celulase no ambiente natural. Esses microrganismos são capazes de secretar as celulases que se encontram livres ou ligadas à superfície celular^{26, 35}.

A produção de enzimas industriais pode ser realizada através de diversos microrganismos, isolados ou em conjunto com outros. Industrialmente, no entanto, apesar de diversos microrganismos serem capazes de produzir celulase, utilizando uma grande variedade de substratos, a maioria é produzida a partir de fungos filamentosos devido às suas características extracelulares. Mandels & Weber³⁶ foram responsáveis, na década de 70, por consolidarem a produção de enzimas celulolíticas pelo desenvolvimento de fungos e por realizarem o aprimoramento de um meio de cultura adaptado ao crescimento de *Trichoderma viride*, que ainda é utilizado para a produção de celulase.

Uma característica dos fungos filamentosos é sua capacidade de produzir enzimas hidrolíticas extracelulares que, por sua vez, lhes fornecem a capacidade de usar polissacarídeos vegetais complexos para o crescimento^{37, 38}. Os organismos celulolíticos são capazes de controlar a produção enzimática de acordo com a disponibilidade de substratos, podendo assim produzir um conjunto de enzimas que hidrolisam sinergicamente a celulose cristalina em oligossacarídeos menores e, finalmente, em glicose³⁷.

O uso de substratos lignocelulósicos para a produção de celulase e outras enzimas, principalmente quando se trata de resíduos agroindustriais, torna-se uma abordagem economicamente e sustentavelmente viável para redução de custos de materiais durante os processos³⁵. A produção de celulase por fungos filamentosos utiliza-se de biomassa celulósica, podendo ser obtida através de resíduos agroindustriais ou de outros processos. A produção utilizando biomassa necessita de um pré-tratamento desse substrato, podendo ser físico, químico ou biológico. Considerando que o rendimento das enzimas produzidas por fungos pode ser baixo, o uso de técnicas como DNA recombinante torna possível um aumento no rendimento final. Outro ponto a ser considerado trata-se da manutenção e da conservação dos fungos, sendo necessário realizar repicagens periódicas para manter a viabilidade e realizar a conservação, podendo ser feito em glicerol, liofilização ou crioconservação³⁹.

4.2.1 *Trichoderma harzianum*

Os fungos filamentosos do gênero *Trichoderma* spp. demonstraram ser bastante eficientes na produção de enzimas extracelulares, como as celulases. Sua alta capacidade de produção enzimática se mostrou interessante, principalmente ao descobrir-se que esses fungos produziam uma ampla gama de outras enzimas extracelulares e, algumas delas, estavam envolvidas no controle biológico de doenças de plantas⁴⁰.

As espécies do gênero *Trichoderma* spp. são altamente colonizadoras, sendo capazes de lidar com ambientes completamente diferentes como, por exemplo, um habitat rico e diversificado, onde se tem bastante substrato para produzir seus metabólitos, mas também é capaz de produzir em ambientes fechados e estéreis, como nos fermentadores biotecnológicos. Sob todas essas condições eles demonstram ser aptos a responder ao ambiente inserido, ajustando-se às condições atuais para sobreviverem e produzirem, podendo ser explorados para o uso na indústria^{41, 42}.

A partir da coleta de algumas amostras no Tibete, Li et al. (2019)⁴³ conseguiram isolar o *Trichoderma harzianum* LZ117 que se mostrou um ótimo produtor de enzimas celulolítica. O fungo isolado, *T. harzianum* LZ117, demonstrou uma indução enzimática mais rápida, ocorrendo nas primeiras 48 horas, além de um tempo de fermentação mais curto, de 5 dias, durante a produção de celulase em comparação com o *T. reesei* QM9414, que geralmente dura 7 dias. Ao final do período de 5 dias o *T. harzianum* LZ117 obteve 0,64 U/mL de atividade de FPase, o *T. reesei* QM9414, por sua vez, obteve 0,55 U/mL no período de 7 dias.

Comparado com as preparações enzimáticas comerciais, o fungo filamentoso *T. harzianum* EM0925 apresentou atividade enzimática lignocelulolítica significativamente maior. O estudo realizado por Zhang et al. (2020)⁴⁴ verificou, com a finalidade de preparar coquetéis de enzimas lignocelulolíticas de baixo custo, diferentes tipos de substratos lignocelulósicos como fonte de carbono. A maior atividade do papel de filtro (FPase), 1,54 U/mL, referente a celulase foi induzida pela palha de milho após sete dias de cultivo.

4.2.2 *Penicillium janthinellum*

Diversos estudos indicam que as espécies de *Penicillium* spp. possuem uma gama de aplicação impressionante ao serem utilizadas em processos biotecnológicos. A capacidade de atuarem de diferentes formas faz com que o mesmo possa ser utilizado como indutor na produção de enzimas, agente de biocontrole, agente promotor de crescimento de plantas, na biorremediação, biodegradação e biossíntese de nutrientes. A capacidade degradativa do *Penicillium* é devido à produção de enzimas hidrolíticas^{45, 46}.

As cepas de *Penicillium* possuem uma capacidade de produção semelhante ao *Trichoderma*, principalmente ao tratar-se da celulase, sendo considerado uma alternativa ao *Trichoderma*⁴⁵. Singh et al (2017)⁴⁶ realizou um estudo no qual verificou a alta capacidade de produção de celulase utilizando o *Penicillium janthinellum* modificado, obtendo FPase de 3,02 U/ml, chegando a produzir até mais que o *Trichoderma reesei*.

Uma análise comparativa realizada por Sreeja-Raju et al. (2020)⁴⁷ indicou a alta produtividade de celulase com o *Penicillium janthinellum* NCIM 1366, sendo uma alternativa ao uso do *T. reesei* RUT-C30 que é amplamente conhecido e utilizado. A hidrólise da palha de arroz pré-tratada usando preparações enzimáticas de celulase de *P. janthinellum* e *T. reesei* mostrou que a preparação enzimática de *P. janthinellum* apresentou uma atividade de celulase 28% maior, obtendo uma FPase de 0,83 U/ml, enquanto o *T. reesei* obteve 0,65 U/ml.

Mutantes de *Penicillium janthinellum* NCIM 1171, EU2D-21 e EMS-UV-8, foram avaliados quanto à produção de celulase usando fermentação submersa e fermentação em estado sólido. O estudo de Singhvi; Adsul e Gokhale (2011)⁴⁸ avaliou os experimentos em diferentes proporções de substratos, Avicel®, pó de celulose, Solka-Floc® e papel de seda. O mutante EU2D-21 obteve como resultado uma FPase de 3,49 IU/mL em fermentação submersa e 67,8 IU/g em fermentação em estado sólido. O mutante ESM-UV-8 obteve como resultado 3,24 IU/mL em fermentação submersa e 59,9 IU/g para fermentação em estado sólido.

4.3 Substratos para produção de celulase

A produção de celulase ocorre através de fermentações, podendo ser em estado sólido ou submersa, e o principal substrato é a biomassa celulósica. Os materiais lignocelulósicos

presentes na biomassa vegetal representam a maior fração do conteúdo total. Sua composição se dá por polissacarídeos, compostos poliaromáticos, compostos inorgânicos, proteínas e outros materiais de baixa massa molecular⁴⁹. A celulose é o principal componente e o mais abundante, sendo formado por ligações β -D-glucose de forma linear, formando uma rede de ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares que ligam as cadeias da celulose (Figura 2).

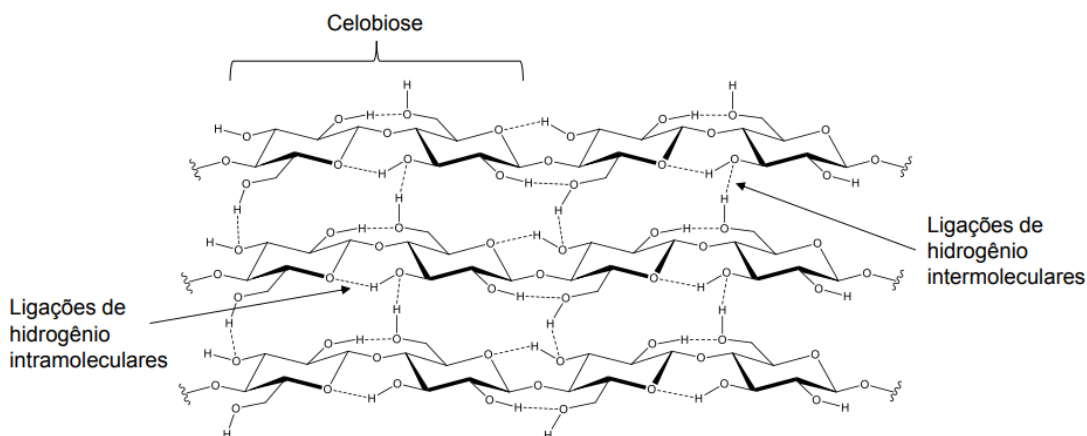


Figura 2 – Rede de ligações de hidrogênio entre as cadeias da celulose⁵.

A utilização da celulose na forma nativa em processos industriais, como na produção de bioetanol, além de consumir grande quantidade de enzimas para hidrolisar esse polissacarídeo, resulta em uma baixa rentabilidade⁵⁰. Para obter um maior rendimento torna-se necessário realizar alguma modificação do material lignocelulósico, sendo os pré-tratamentos uma forma viável de realizar essas modificações estruturais para facilitar o acesso microbiano a celulose, sua fonte principal de carbono. Para selecionar uma tecnologia de pré-tratamento adequada, o reconhecimento dos principais fatores limitantes estruturais é uma etapa crítica^{51, 52}.

O uso desses sólidos heterogêneos para realizar a fermentação, como resíduos agroindustriais e matérias-primas de baixo valor, em muitos casos, permite que o substrato sólido atue tanto como fonte de carbono quanto como indutor para a produção de enzimas, principalmente ao se considerar o microrganismo produtor de celulase.

4.3.1 Resíduo do Algodão

A produção de celulases com resíduos é uma forma de reduzir os custos da produção de enzimas. A utilização desse material de origem agroindustrial é uma estratégia interessante para a redução de custos associados à formulação de meios de cultura para produção de celulase. A utilização desses resíduos vem se mostrando eficiente e crescendo cada vez mais na produção de celulase, principalmente por meio de fermentação submersa e em estado sólido, onde se tem estudos com o uso de palha de trigo⁵³, bagaço de cana-de-açúcar⁵⁴, sabugo de milho⁵⁵, farelo de sorgo⁵⁶, palha de arroz⁵⁷ e resíduo de algodão⁵⁸.

O algodão, após ser colhido do campo, passa por processos para ser separada a sua fibra do caroço de algodão, sendo obtido a partir disso cerca de 37-43% de fibra e 57-63% de caroço. A fibra é o principal produto do algodão sendo bastante utilizado na indústria têxtil, por sua vez, o caroço/semente de algodão é rico em óleo, sendo importante para o uso na indústria alimentícia⁵⁹.

A safra de algodão referente à 2020/21, segundo dados da Associação Brasileira dos Produtores de Algodão⁹, obteve cerca de 2.678 milhares de toneladas de pluma produzida onde ocupou-se 1.510 mil hectares em toda a extensão do país. Em escala global a produção de fibra de algodão é estimada em 24,65 milhões de toneladas, sendo o continente asiático o maior produtor, seguido do continente americano⁶⁰. A produção em grande escala está diretamente ligada também a grande produção de resíduos, principalmente ao realizar-se o refinamento da fibra do algodão, um dos processos em que mais gera-se material remanescente, que podem ser aproveitados para destinar o material como substrato de outros produtos.

A torta de algodão é um subproduto do algodão constituído de materiais remanescentes. As condições de cultivo, as formas de armazenamento e, principalmente, a forma de processamento do algodão para extração do óleo são os processos que mais influenciam nas características da torta de algodão, interferindo diretamente o seu teor proteico, energético e fibroso. A extração do óleo pode ocorrer por prensagem mecânica ou pelo uso de solventes, desse modo, podem-se produzir dois tipos de tortas: a torta gorda, proveniente da prensagem mecânica, contendo cerca de 5% de óleo residual, com um teor menor de proteína, e a torta magra ou farelo, proveniente da extração por solventes, com menos de 2% de óleo residual, obtendo um teor maior de proteína⁶¹.

A fibrilha, por sua vez, é um resíduo obtido durante a separação da pluma do caroço. A semente precisa ser submetida a um processo adicional para retirar o línter, por isso, em muitos casos esse resíduo não é retirado ou utiliza-se de solventes químicos para sua dissolução⁶². Esse material pode ser reaproveitado para ser utilizado na indústria têxtil, mas comumente é descartado. O uso desses resíduos para a obtenção da celulase traz a possibilidade de novas aplicações dos mesmos considerando a sustentabilidade.

O caroço é um subproduto do algodão, ao qual é destinado principalmente para extração de óleo. O caroço de algodão contém 17-22% de óleo e, após a extração do óleo, a farinha da semente é obtida como coproduto, podendo ser utilizada na produção da torta de algodão⁶³. Seu uso na produção de combustíveis vem crescendo cada vez mais, atualmente, mais de 95% do biodiesel comercial é produzido a partir de óleos obtidos a partir do caroço de algodão, palma, semente de girassol e soja⁶⁴. Na produção de celulase o material, ao ser comparado com outros substratos, mostra uma melhor atividade celulolítica, sendo um grande potencial na produção de celulase em larga escala⁶⁵.

4.3.2 Produção de celulase utilizando o resíduo do algodão

A produção de celulase foi avaliada por Jabasingh e Vallinachiyar (2011)⁶⁶ utilizando as fibras de algodão. No estudo utilizou-se o fungo *Aspergillus nidulans* para induzir a produção de celulase e aplicou-se a metodologia de Plackett-Burman (PB) para obter uma melhor forma de avaliar os pontos críticos. Toda a otimização no processo foi responsável pelos ajustes na produção de celulase, aumentando assim a atividade da celulase de 4,91 para 60,54 U/ml.

O uso da torta de algodão para produção de celulase foi estudado por Pinheiro (2019)⁶⁷, onde utilizou-se *Aspergillus tubingensis* AN1257, na concentração de 1×10^5 conídios mL⁻¹ para induzir a produção no resíduo. Nesse estudo utilizou-se da fermentação submersa para obter o extrato enzimático e as avaliações da atividade enzimática foram determinadas durante a fermentação, a cada 24 horas. As atividades máximas de FPases e CMCases foram observadas em meio contendo 1,65% e 2,05% de biomassa, apresentando 0,13 U/mL e 0,092 U/mL, respectivamente.

A celulase do processo de biopolimento do algodão também foi estudada para que pudesse ser reciclada e utilizada em outros processos na indústria têxtil. Wang et al. (2018)⁶⁸

investigaram o potencial de aplicação do óxido de grafeno como um adsorvente para capturar a celulase residual, presente no efluente do biopolimento, para reciclá-la e utiliza-la como meio de tingimento do algodão usando diferentes corantes reativos. Verificou-se que a eficiência de remoção exibiu forte dependência do pH, sendo obtido os valores máximos de adsorção em pH entre 4-5.

A otimização na produção de celulases fúngicas a partir de resíduos da indústria têxtil, como o algodão e poliéster residual dos processos, foi estudada por Hu et al. (2018)⁶⁹. Os pesquisadores otimizaram parâmetros como pH, umidade, concentração de inóculo e de nitrogênio através da metodologia de superfície de resposta. Utilizando o fungo *Aspergillus niger* CKB em fermentação em estado sólido foi possível obter 1,56 U/g de atividade enzimática celulolítica.

A avaliação da produção de celulases a partir da mistura de resíduos lignocelulósicos foi realizada por Ramamoorthy, Sambavi e Renganathan (2019)⁷⁰. No estudo utilizou-se como substrato uma mistura de resíduos de algodão cirúrgico e papelão de embalagens, realizando dois tipos de fermentação com o fungo *Trichoderma harzanium* ATCC® 20846™, em estado sólido e submersa. Para a fermentação em estado sólido obteve-se uma atividade de FPase de 2,405 IU/mL, 3,145 IU/mL, 3,230 IU/mL como o substrato não-tratado, pré-tratado com ácido sulfúrico e pré-tratado com amônia, respectivamente.

A produção de celulase com a finalidade de realizar a hidrólise de resíduos têxteis foi estudada por Wang et al. (2018)⁷¹. Realizando uma fermentação submersa com o *Trichoderma reesei* ATCC 24449, utilizando como substrato a mistura de algodão com poliéster na proporção de 40% e 60%, respectivamente, os pesquisadores conseguiram obter ao final do processo uma atividade celulolítica de 18,75 U/g de FPase. As enzimas obtidas foram posteriormente utilizadas para realizar a hidrólise de resíduos têxteis para produzir glicose, um produto de alto valor agregado.

4.4 Pré-tratamento

O pré-tratamento do substrato celulolítico é realizado para aumentar a área de superfície e a acessibilidade enzimática por meio de mudanças na porosidade e na cristalinidade da celulose. As tecnologias de pré-tratamento incluem diversos processos, onde torna-se

necessário avaliar qual o produto a ser obtido para definir qual o pré-tratamento a ser utilizando, podendo ser por meio de processos físicos, químicos ou biológicos para materiais lignocelulósicos. Posteriormente ao pré-tratamento, as enzimas que degradam a celulose são usadas para liberar os açúcares fermentáveis^{8, 72}.

O pré-tratamento é realizado com a intenção de melhorar a formação de açúcares e de formar açúcares por hidrólise enzimática, evitar a degradação ou perda de carboidratos e evitar a formação de subprodutos inibidores dos processos subsequentes de hidrólise e fermentação⁷³. O pré-tratamento físico inclui cominuição mecânica e pirólise. A cominuição mecânica combina lascamento, trituração e moagem para quebrar os materiais lignocelulósicos em até 0,2-2 mm com a finalidade de reduzir a cristalinidade dos materiais. Na pirólise, os materiais lignocelulósicos são expostos a uma alta temperatura, acima de 250°C podendo chegar até 300°C. A essa temperatura a estrutura rígida das lignoceluloses são quebradas, porém ocorre a perda de material devido a degradação^{73, 74}.

As tecnologias de pré-tratamento químico comumente usadas incluem a hidrólise ácida e alcalina. O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído é realizado com uma mistura do material com o ácido em alta temperatura, entre 140-190°C. O ácido é responsável por decompor as hemiceluloses a essa temperatura, resultando na quebra da estrutura lignocelulósica^{73, 74}. Os processos de pré-tratamento biológico usam microrganismos, principalmente os fungos, para degradar a lignina e a hemicelulose em materiais lignocelulósicos. As principais vantagens do pré-tratamento biológico são o baixo custo energético do processo e baixo uso de produtos químicos^{74, 75}.

4.5 Fermentação em estado-sólido (FES)

A fermentação em estado sólido (FES) trata-se de um processo fermentativo ao qual ocorre com a ausência ou quase ausência de água. Nesse sistema o substrato deve possuir umidade suficiente para garantir que a fermentação ocorra e os microrganismos envolvidos possam desenvolver suas atividades metabólicas. O substrato será responsável pelo suporte do crescimento microbiano e como fonte nutritiva, sendo assim, a escolha do substrato deve ser realizada analisando sua capacidade de prover os nutrientes para gerar os produtos^{76, 77}.

Esses resíduos são subprodutos provindos da atividade agrícola, gerados em grandes quantidades e apresentam baixo valor comercial, utiliza-lo para tal finalidade é uma das formas de reaproveitar esse material⁷⁶. O processo de obtenção, ao ser realizado através da FES, é menos suscetível a inibição pelo substrato e as enzimas produzidas apresentam maior estabilidade em relação à temperatura e ao pH quando comparado à outros tipos de fermentações⁷⁷.

A alta umidade resulta na diminuição da porosidade do substrato, o que, por sua vez, impede a penetração de oxigênio, podendo ocasionar na contaminação bacteriana. Por outro lado, o baixo teor de umidade pode afetar a disponibilidade dos nutrientes aos microrganismos, resultando em um crescimento deficiente ou até nulo. A necessidade de controlar a umidade torna-se um ponto crítico nesse processo para obter uma FES produtiva^{78, 79}.

4.5.1 Fatores que influenciam na fermentação em estado sólido

A produção de celulase por FES é influenciada por diversos fatores, assim, a otimização dessas variáveis permite obter resultados melhores e um produto de maior qualidade. Os principais fatores que afetam a produção são os característicos de uma fermentação por microrganismos, como pH, temperatura, umidade, tempo de fermentação, concentração de substrato e inóculo⁸⁰. O método estatístico de Plackett-Burman é uma das diversas metodologias que podem ser aplicadas para realizar a triagem estatística de diferentes variáveis. As variáveis que influenciam a fermentação em estado sólido podem ser selecionadas para investigar o nível de influência durante o processo de produção de celulase⁸¹.

O pH possui grande influência durante o processo de FES uma vez que variações muito grandes, fora da faixa ótima de crescimento dos fungos filamentosos – entre 3,8 – 6,0 –, podem ocasionar desnaturação das enzimas. Mesmo sendo um parâmetro difícil de controlar durante toda fermentação, atingindo a capacidade de sintetizar as enzimas pelos fungos, o uso de soluções tamponantes torna-se uma das formas de solucionar esse problema^{82, 83}.

Outro parâmetro a ser analisado é a temperatura, uma vez que está diretamente ligada ao crescimento dos fungos filamentosos na FES. Assim como o pH, variações além do intervalo considerado ótimo para o crescimento podem ocasionar a desnaturação das proteínas e perda

do mosto. A faixa de temperatura considerada ótima para produção proteica encontra-se entre 30°C – 35°C^{83, 84}.

O alto teor de umidade é capaz de inibir a produção proteica durante a FES. Na produção de celulase por fungos filamentosos o intervalo ideal encontra-se entre 35% - 55%⁸³. A atividade da água deve ser avaliada pois fornece uma estimativa da quantidade de água disponível para o crescimento do microrganismo e para os processos bioquímico⁷⁹.

O microrganismo torna-se um fator limitante na FES ao produzir inibidores devido as condições fermentativas dispostas a ele. Dependendo do produto a ser obtido, as condições de fermentação irão mudar, e por isso, prover os nutrientes e as condições favoráveis para uma taxa crescente de atividade metabólica mostra-se um fator importante para o desenvolvimento do microrganismo. Altas temperaturas, além de um pH desregulado, são capazes de produzir inibidores, afetando diretamente na capacidade produtiva do microrganismo⁸³.

O substrato da fermentação deve prover ao meio uma estrutura de suporte, ser uma fonte de carbono e dispor de nutrientes para o crescimento microbiano, como a glicose. Desse modo, a disponibilidade do substrato para o microrganismo é um dos pontos críticos para que se tenha a ação do fungo e a aeração do meio^{79, 83}.

A suplementação do meio com nitrogênio é uma das formas de aumentar o rendimento da produção. Alguns estudos mostram a efetividade em utilizar o nitrogênio para um maior crescimento microbiano e, por consequência, uma maior obtenção de enzimas^{85, 86}. Além de todos esses fatores, que influenciam diretamente no crescimento e produção enzimática, o tempo de fermentação deve ser um ponto a ser considerado. Estudos mostram que a produção atinge seu ponto máximo entre as 72-96 horas de fermentação, sendo um tempo viável principalmente na indústria, uma vez que fermentações mais longas demandam um maior investimento no geral⁸⁷.

4.5.2 Produção de celulase por meio de fungos filamentosos em FES

A produção de celulases fúngicas, por meio da fermentação em estado sólido, vem sendo realizado com o uso de diferentes fungos e substratos, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 – Atividade de FPase obtida com diferentes fungos e substratos.

Fungo	Substrato	FPase	Referência
<i>Trichoderma reesei</i> NCIM 992	Farelo de trigo	2,63 U.mL ⁻¹	Maurya et al. (2012) ⁸²
<i>Penicillium echinulatum</i> S1M29	Capim elefante e farelo de trigo	32,93 IU.g ⁻¹	Scholl et al. (2015) ⁸⁸
<i>Trichoderma reesei</i> BTF 0948	Casca de café	4,05 U.g ⁻¹	Carvalho et al. (2018) ⁸⁹
<i>Trichoderma koningii</i>	Casca de café	4,49 U.g ⁻¹	Carvalho et al. (2018) ⁸⁹
<i>Myceliophthora thermophila</i> M77	Farelo de soja e bagaço de cana- de-açúcar	10,6 U.g ⁻¹	Kilikian et al. (2014) ⁹⁰
<i>Trichoderma koningii</i> INCQS 40331	Bagaço de cana- de-açúcar	8,2 IU.g ⁻¹	Salomão et al. (2019) ⁹¹

A partir dos estudos realizados, onde aplica-se resíduos agroindustriais para produção de celulase em FES, observa-se que a obtenção de enzimas desse modo é bastante promissora. O uso de resíduos não-tratados e pré-tratados dependem bastante do substrato e da forma de pré-tratamento a ser utilizada, porém sempre visa-se conseguir uma atividade enzimática maior para tornar o processo ainda mais promitente. O tratamento dos dados com o uso da metodologia de Plackett-Burman busca facilitar a compreensão dos resultados obtidos através dos parâmetros analisados, sendo possível através do uso do diagrama de Pareto verificar a significância ou não que as variáveis tiveram influenciando a produção de celulases.

5 METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no Laboratório 3 da Universidade Federal do Oeste da Bahia, Centro Multidisciplinar de Luís Eduardo Magalhães – CMLEM, em conjunto com o grupo de pesquisa de Celulases Fúngicas. Os resíduos, fibrilha, caroço e torta de algodão, foram obtidos de produtores da região, lavados em água corrente e secos em estufa à 105°C por 30 minutos. Após realizado o procedimento, iniciou-se a caracterização físico-química do resíduo em forma de fibrilha e torta de algodão.

Realizou-se no caroço do algodão um tratamento mecânico. Utilizou-se 200 g de caroço de algodão que foi moído em moinho de facas, sem granulometria padronizada, como mostrado na Figura 3.



Figura 3 - Caroço de algodão moído (CM) no moinho de facas.

O pré-tratamento foi realizado devido a impossibilidade de utilizar o resíduo na sua forma natural. A quebra do material lignocelulósico foi realizada para facilitar o acesso do microrganismo durante a fermentação, por aumentar a superfície de contato.

5.1 Caracterização físico-química do resíduo

A caracterização físico-química foi realizada de acordo com o fluxograma da Figura 4, como uma forma de realizar os processos de caracterização em sequência, sendo a mesma aplicada na fibrilha, na torta de algodão e no caroço moído. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

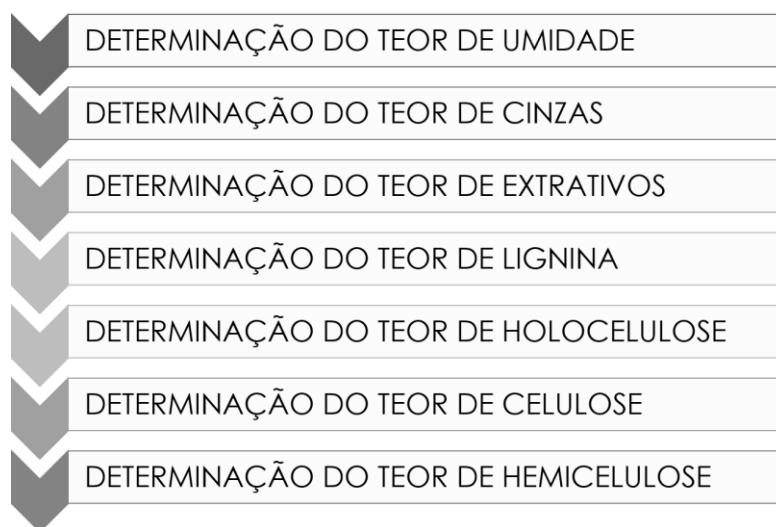


Figura 4 - Fluxograma de ordem de processos para a caracterização físico-química.

5.1.1 Determinação do teor de umidade

Para determinar a umidade presente nos resíduos utilizou-se o procedimento de Moraes et al.⁹². Utilizou-se placas de petri, esterilizadas, e depositou-se 2,0 g do material em cada uma. O conjunto placa/amostra foi então levado à estufa por 3 horas a 105°C, sendo posteriormente resfriado por 30 min até a temperatura ambiente. Após o tempo determinado, realizou-se a pesagem do conjunto e então submeteu-se novamente à estufa, à 105 °C, por mais 30 minutos, sendo o processo realizado por mais três vezes, até que obteve massa constante.

Ao ser verificada a ausência de variação foi possível obter o teor de umidade, como demonstrado na Equação 01.

$$TU_{\%} = \frac{MPAU - MPAS}{MAU} \times 100\% \quad (01)$$

Onde,

$TU_{\%}$ – Teor de umidade;

MAU – Massa da amostra úmida;

$MPAU$ – Massa do conjunto placa/amostra úmida;

$MPAS$ – Massa do conjunto placa/amostra seca.

5.1.2 Determinação do teor de cinzas

A determinação do teor de cinzas foi realizada seguindo o procedimento descrito por Morais et al.⁹². Após obter o material livre de umidade realizou-se a secagem do resíduo. Utilizou-se 1,5 g do material em um cadinho de porcelana – previamente pesado, onde o material permaneceu em uma mufla por 600°C durante 3 horas, após a mufla decair a temperatura para 200°C retirou-se o material calcinado. A amostra foi levada a uma estufa de secagem por 30 minutos e, então, realizou-se a pesagem do conjunto cadinho/amostra. Para quantificar o teor de cinzas obtido utilizou-se a Equação 02.

$$TC_{\%} = \frac{MCAC - MC}{MA} \times 100\% \quad (02)$$

Onde,

$TC_{\%}$ – Teor de cinzas;

$MCAC$ – Massa do cadinho/amostra calcinada;

MC – Massa inicial do cadinho;

MA – Massa inicial da amostra

5.1.3 Determinação do teor de extrativos

O procedimento foi realizado seguindo a norma técnica TAPPI T204 cm-97⁹³, no qual utilizou-se como solvente de extração a acetona. Para realizar a extração do material de interesse utilizou-se o extrator Soxhlet. Pesou-se uma massa inicial de 3 g do resíduo, e essa amostra foi colocada dentro de um cartucho, feito de papel filtro, que foi colocada dentro do extrator. Utilizou-se um balão de vidro contendo o solvente – 150 mL de acetona, para realizar a extração, que foi acoplado ao extrator. Para o funcionamento do sistema Soxhlet o mesmo foi acoplado em um condensador e em uma manta aquecedora para promover a condensação do solvente, para que então possa ser quantificada a massa final presente no balão. A extração ocorreu por 5 horas.

O material foi retirado do cartucho e colocado em um béquer com 150mL de água destilada, onde permaneceu em banho Maria por 1 hora a 100°C. A amostra retirada do cartucho foi filtrada à vácuo, com funil de vidro, utilizando-se 1 L de água. Antes da filtração, o funil foi seco em estufa por 2 horas a 105 °C e pesado. Visando obter um valor mais próximo do teor de extrativos, a amostra presente no funil foi pesada para quantificar o resíduo da acetona. A equação utilizada para determinar o teor de extrativos foi dada pela Equação 03:

$$TE = \frac{M_F - R}{M_i} \times 100 \quad (03)$$

Onde,

TE – Teor de extrativos;

M_i – Massa inicial;

M_F – Massa final;

R – Resíduo da acetona.

5.1.4 Determinação do teor de lignina

O procedimento para obter o teor de lignina foi realizado conforme a norma TAPPI T222 om-11⁹⁴. Para determinar a lignina presente no material, sem os extrativos, utilizou-se ácido sulfúrico para dissolver os carboidratos para que se obtenha a lignina, insolúvel.

O experimento foi realizado com 0,5 g do resíduo, que foi colocado em um béquer ao qual transferiu-se 15mL de solução de ácido sulfúrico diluído 72% (v/v). O material ficou em uma capela de exaustão por 2 horas, sob agitação, sendo posteriormente transferido para um balão de fundo redondo com 560 mL de água destilada. O balão contendo o material foi colocado em uma manta aquecedora, sendo conectado à um sistema de refluxo, onde permaneceu por um período de 4 horas.

Após o período de 4 horas realizou-se a filtração do resíduo, com um funil de vidro e um papel filtro, em um sistema a vácuo. A lavagem do material foi realizada com água até atingir o pH neutro. Após a filtração o material foi seco em estufa a 105°C até obter massa constante.

O teor de lignina foi calculado através da Equação 04, utilizando-se da massa final, descontando a massa presente no funil, a massa inicial da amostra e os teores de umidade, extrativos e cinzas. Os teores de umidade e extrativos foram utilizados no cálculo para que o teor de lignina não seja expresso em função da amostra seca e sem extrativos.

$$TL_{\%} = \frac{M_F}{M_A} \times 100 - TC_{\%} \times \frac{100 - [T(U)_{\%} + T(E)_{\%}]}{100} \quad (04)$$

Onde,

$TL_{\%}$ – Teor de lignina;

M_F – Massa final;

M_A – Massa da amostra;

$TC_{\%}$ – Teor de cinzas;

$TU_{\%}$ – Teor de umidade;

$TE_{\%}$ – Teor de extrativos.

5.1.5 Determinação do teor de holocelulose

Para determinar o teor de holocelulose o procedimento seguido foi o proposto por Araújo et al.⁹⁵. Para quantificar o teor de celulose presente no material será utilizada a amostra de holocelulose e, realizando a diferença, será possível obter o teor de hemicelulose. A holocelulose consiste nos carboidratos totais, sendo assim, para a determinação da celulose e da hemicelulose de interesse foi-se necessário obter o teor de holocelulose.

Para obter o teor de holocelulose pesou-se uma amostra de 1 g do resíduo, sem extrativos, e transferiu-se para um béquer. A preparação da solução para extração da holocelulose foi realizada utilizando ácido acético glacial, hipoclorito de sódio e água destilada em um balão de 1 L.

Após realizar a pesagem do material nos três béqueres transferiu-se 68 mL da solução preparada em cada um. Os béqueres permaneceram em banho maria por 30 minutos a 75 °C, sendo a solução agitada periodicamente. O material passou por filtragem à vácuo utilizando funil de porcelana e papel filtro. Realizou-se a transferência da solução e a filtragem por seis vezes, até que a amostra apresentasse cor esbranquiçada. A amostra branca foi lavada em água destilada e filtrada até pH neutro, sendo levada para secagem por 2 horas a 105 °C até peso constante, onde a massa final foi obtida descontando o valor do filtro da massa seca. O teor de holocelulose foi calculado utilizando a Equação 05:

$$T_{Holocelulose}\% = \frac{M_F}{M_i} \times 100 \times \frac{100 - [T(U)\% + T(E)\%]}{100} \quad (05)$$

Onde,

$T_{Holocelulose}\%$ – Teor de holocelulose;

M_F – Massa final;

M_i – Massa inicial;

$TU\%$ – Teor de umidade;

$TE\%$ – Teor de extrativos.

5.1.6 Determinação do teor de celulose

Para obter o teor de celulose seguiu-se o procedimento proposto por Araújo et al.⁹⁵. Para realização do experimento pesou-se em cada béquer aproximadamente 0,84g da holocelulose após a secagem, obtida anteriormente, sendo essa a massa inicial.

Aqueceu-se 50 mL de água em balão de fundo redondo, e foi preparada uma solução com 50 mL de água e 30 g de hidróxido de potássio. Posteriormente misturou-se a água aquecida com a solução de hidróxido de potássio 15% (m/v), tendo como solução final 100 mL. Transferiu-se para os béqueres 30 mL da solução e a mesma permaneceu em uma capela de exaustão por 30 minutos. Após o tempo determinado o material foi filtrado em papel filtro e lavado até chegar no pH neutro.

O material obtido foi levado à estufa por 2 horas a 105 °C até peso constante. O valor da massa final foi obtido descontando o peso do filtro da massa seca, sendo o teor de celulose obtido pela Equação 06:

$$T_{Celulose} \% = \frac{M_F}{M_i} \times T_{Holocelulose} \% \quad (06)$$

Onde,

$T_{Celulose} \%$ – Teor de celulose;

M_F – Massa final;

M_i – Massa inicial;

$T_{Holocelulose} \%$ – Teor de holocelulose.

5.1.7 Determinação do teor de hemicelulose

Seguindo o procedimento de Araújo et al.⁹⁵ o teor de hemicelulose foi obtido através da diferença do teor de holocelulose e o teor de celulose, conforme a Equação 07.

$$T_{Hemicelulose} \% = T_{Celulose} \% - T_{Holocelulose} \% \quad (07)$$

5.2 Obtenção das linhagens de fungos

Os fungos filamentosos a serem utilizados nos experimentos foram as linhagens *Trichoderma harzanium* 4127 e *Penicillium janthinellum* 3921, obtidas através da Fundação Oswaldo Cruz. A escolha desses microrganismos foi realizada após estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa de Celulases Fúngicas, comprovando o potencial em promover a produção de celulases.

5.3 Preparo do inóculo

A cultura mãe das linhagens utilizadas, *T. harzanium* 4127 e *P. janthinellum* 3921, foram preservadas em tubo inclinado a 4°C. O cultivo desses microrganismos foi realizado com o uso de placas de petri contendo meio ágar batata dextrose (PDA) à 30°C durante 7 dias. As placas de petri foram colocadas em uma incubadora com agitação orbital, onde ao passar o período determinado, realizou-se o repique em arroz.

Visando uma forma de aumentar a esporulação, como em estudos de Mélo¹ e Aguilera et al.⁹⁶, seguiu-se o protocolo da EMBRAPA/CPATSA⁹⁷, utilizando o arroz como substrato. O arroz quando umedecido, segundo os estudos, proporciona um meio capaz de obter uma maior quantidade de esporos.

Para a obtenção do meio utilizou-se 100 g de arroz e 300mL de água destilada, sendo o arroz imerso na água durante 30 minutos. Após ser realizada a umidificação do arroz o mesmo passou por uma peneira para retirar o excesso de água e, em seguida, como o experimento foi realizado com dois fungos diferentes, depositou-se em cada erlenmeyer 50 g do arroz umedecido para ser levado na autoclave por 15 min a 121°C. Após o resfriamento, o microrganismo foi inoculado.

Para realizar a inoculação dos fungos no arroz realizou-se primeiramente o uso de um espessante (Tween-80 à 0,3%) nas placas de petri contendo os microrganismos, onde utilizou-se 10mL do mesmo para realizar a retirada dos esporos das placas. Utilizando-se de um pipetador retirou-se 1mL da suspensão obtida na placa de petri e, então, transferiu-se para o erlenmeyer contendo o arroz esterilizado, que foi fechado com gaze e algodão onde realizou-se a incubação a 28°C por 7 dias, conforme a Figura 5.



Figura 5 - Fermentação dos fungos, *T. harzanium* 4127 e *P. janthinellum* 3921, em arroz.

A obtenção dos esporos foi realizada após a incubação, onde adicionou-se aos erlenmeyers, contendo o arroz com esporos, 200mL da solução salina de Mandels & Weber³⁶, preparada conforme a composição descrita na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição salina do meio de Mandels & Weber³⁶.

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO (g/L)
NaNO ₃	3,0
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄	0,5
KCl	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 mg.L ⁻¹
Ágar	20,0

Realizou-se a agitação até a suspensão dos esporos, sendo filtrada com gaze estéril, armazenada em erlenmeyers, conforme a Figura 6, e posteriormente quantificada. A quantificação foi realizada por meio da contagem em Câmara de Neubauer. A concentração dos esporos foi calculada levando em consideração a quantificação obtida da câmara de Neubauer.



Figura 6 - Solução de esporos dos fungos *T. harzanium* 4127 e *P. janthinellum* 3921.

Após a obtenção dos esporos os mesmos foram armazenados em freezer à 4°C, sendo utilizados nas metodologias de ensaio de concentração, pré-tratamento e no ensaio final de Plackett-Burman.

5.4 Ensaios de concentração de substrato

Com o objetivo de obter a melhor concentração de substrato realizou-se um ensaio de concentrações, onde levou-se em consideração a mistura da fibrilha e da torta de algodão em diferentes proporções, com os dois microrganismos, *Trichoderma harzanium* 4127 e *Penicillium janthinellum* 3921. Os ensaios de concentração foram realizados em triplicatas, em diferentes proporções de fibrilha (F) e torta de algodão (T), a partir de estudos prévios realizados (dados não publicados) onde verificou-se a baixa produção com o uso separado, definiu-se assim, 50% de fibrilha e 50% de torta de algodão (F50:T50), 40% de fibrilha e 60% de torta de algodão (F40:T60) e 30% de fibrilha e 70% de torta de algodão (F30:T70), sendo a quantidade do substrato utilizado para a FES de 1g, no qual a torta de algodão estava nas maiores frações. Com o objetivo de estudar a viabilidade do caroço do algodão moído e seu resíduo da moagem na produção de celulases o mesmo também foi estudado, sendo utilizado 1g do material,

correspondente a 100% do substrato, para a FES. O caroço do algodão moído foi identificado como CM e seu resíduo como CR.

Primeiramente realizou-se o preparo do substrato, sendo assim, triturou-se a fibrilha no liquidificador em velocidade média por 5 minutos, o mesmo foi feito com a torta de algodão. O ensaio de concentração foi realizado em tubos de ensaio, contando os substratos em diferentes proporções, que ficaram em fermentação em estado sólido por 4 dias à 30°C, parâmetros definidos após estudos de produção de enzimas celulolítica^{87, 98, 99}, sendo realizada a extração enzimática, a quantificação de açúcares redutores e FPase. Após obtida a concentração ao qual os fungos promovem uma melhor produção de celulases realizou-se o pré-tratamento desses substratos, visando a quebra da celulose para obtenção de maiores quantidades de celulases fúngicas.

5.5 Pré-tratamento do resíduo do algodão

Visando obter maiores quantidades de celulases, na concentração ao qual os microrganismos tiveram um melhor desempenho, realizou-se um pré-tratamento químico do resíduo, onde utilizou-se uma solução básica.

O pré-tratamento químico utilizado na fibrilha e na torta do algodão, foi realizado seguindo a metodologia descrita por Fockink⁵. Utilizou-se 20 g do resíduo, sem granulometria padronizada, disposta em solução de hidróxido de sódio (NaOH) 6% por 1 hora a 120°C. Após o tratamento do substrato, conforme a Figura 7, o mesmo passou por uma lavagem e secagem.



Figura 7 - Caroço de algodão moído (CM) após o pré-tratamento alcalino com NaOH

A obtenção do resíduo final foi dada após realizar a lavagem até atingir pH neutro e, posteriormente, realizou-se a secagem em estufa a 105°C por 2 horas até massa constante. Após a obtenção do substrato realizou-se a FES com os fungos em estudo, *Trichoderma harzanium* 4127 e *Penicillium janthinellum* 3921, ocorrendo a fermentação por 4 dias à 30°C.

5.6 Planejamento experimental

Visando analisar e selecionar os parâmetros que influenciam a FES, realizou-se um planejamento experimental do tipo Plackett-Burman¹⁰⁰ por meio do software Statistica 10, onde levou-se em consideração seis variáveis, como pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros estabelecidos pelo planejamento de Plackett-Burman.

ENSAIO	pH	Temperatura (°C)	Água (mL)	Tween-80 (%)	Nitrogênio (%)	Inóculo (uL)	Substrato (g)
01	5,9	29	5,0	1,0	1,0	1E+08	1,0
02	5,9	31	3,0	1,0	1,0	1E+06	1,0
03	3,7	31	5,0	3,0	1,0	1E+06	1,0
04	5,9	29	5,0	1,0	3,0	1E+06	1,0
05	5,9	31	3,0	3,0	1,0	1E+08	1,0
06	5,9	31	5,0	3,0	3,0	1E+06	1,0
07	3,7	31	5,0	1,0	3,0	1E+08	1,0

08	3,7	29	5,0	3,0	1,0	1E+08	1,0
09	3,7	29	3,0	3,0	3,0	1E+06	1,0
10	5,9	29	3,0	3,0	3,0	1E+08	1,0
11	3,7	31	3,0	1,0	3,0	1E+08	1,0
12	3,7	29	3,0	1,0	1,0	1E+06	1,0
13 (C)	4,8	30	4,0	2,0	2,0	1E+07	1,0
14 (C)	4,8	30	4,0	2,0	2,0	1E+07	1,0
15 (C)	4,8	30	4,0	2,0	2,0	1E+07	1,0

Na Tabela 4 considerou-se as variáveis de: concentração de substrato, concentração de inóculo, temperatura, pH, umidade, concentração do Tween-80 e a concentração de nitrogênio para suplementação no fungo que obteve melhor atividade enzimática. Estabeleceu-se faixas de variação (níveis -1 e +1) para as variáveis a partir dos pontos centrais estabelecidos, uma vez que especificam as melhores condições de cultivo, para a avaliação de algum efeito no resultado. Definiu-se o tempo de fermentação de 96 horas, uma vez que estudos comprovam o ponto máximo de produção entre 72-96 horas.

5.7 Fermentação em estado sólido para obtenção das enzimas

Após definido o planejamento realizou-se, em tubos de ensaio esterilizados por 15 minutos a 120°C, a fermentação em estado sólido. Os substratos a serem usados como fonte de celulose para esta fermentação foram o caroço do algodão, moído em moinho de facas e sem padronização de granulometria, conforme os resultados do ensaio de concentração de substrato.

A fermentação em estado sólido foi realizada com o microrganismo que obteve melhores resultados nos ensaios, sendo assim realizou-se com o *P. janthinellum* 3921. Os ensaios realizados seguiram o planejamento de Plackett-Burman, onde cada ensaio obteve um tratamento e uma quantidade de nutrientes variáveis. A fermentação foi realizada por 4 dias, a temperatura variou para cada ensaio, partindo do ponto central.

5.8 Extração das enzimas

O extrato enzimático foi obtido de acordo com a metodologia de Santos (2017)¹⁰¹. Após realizar a fermentação em estado sólido, adicionou-se 10mL de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L pH 4,8 no substrato fermentado. As amostras foram agitadas em agitador vórtex por 10 minutos, após a agitação, a amostra foi centrifugada 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 realização das análises.

5.8.1 Determinação de açúcares redutores por DNS

O procedimento para determinar os açúcares redutores e, por fim, obter as concentrações enzimáticas de FPase foi a metodologia de Miller¹⁰². A marcha analítica foi realizada com 1 mL de amostra e 1 mL de DNS em tubos de ensaio, colocados em banho-maria a 100°C por 5 minutos e resfriado em banho de gelo. Após o resfriamento adicionou-se aos tubos 16 mL de solução de tartarato duplo de sódio e potássio e realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Preparou-se uma solução padrão de glicose, contendo 2,0 g de glicose para 1 L de água destilada, visando construir a curva padrão de glicose e, por fim, obter a equação para calcular os açúcares redutores totais (AR). Os valores obtidos de absorbância foram convertidos em valores de concentração de glicose para serem utilizados na quantificação da FPase.

5.8.2 Atividade de FPase

Para determinar a atividade de celulase total utilizou-se o procedimento recomendado por Ghose¹⁰³, conhecido como método do papel de filtro (FP), sendo a atividade dada pela FPase. O substrato utilizado foi o papel de filtro Whatman No. 1, cortado em tiras de 1x6 cm, que foi colocado em tubos de ensaio com capacidade de 15 mL, adicionou-se ao tubo 1 mL de tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹, com pH ajustado para 4,8, e 0,5 mL do extrato enzimático. O experimento foi realizado em banho ultratermostático a 50 °C, durante 60 minutos.

O controle da reação foi realizado adicionando-se 1,0 mL da mesma solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático, enquanto o branco foi obtido com 1,5 mL de solução tampão e

uma tira de papel filtro. Após ser realizado o banho ultratermostático, adicionou-se 0,625 mL de DNS, sendo levado novamente para o banho maria por 5 minutos à 100°C e resfriou-se em banho de gelo. Adicionou-se 10 mL de solução de tartarato de sódio e então realizou-se a quantificação da transmitância no espectrofotômetro. Para calcular a FPase utilizou-se a equação de Ghose, representada na Equação 08.

$$FPase = \frac{AR \times V_T}{0,18 \times V_E \times T_H} \quad (08)$$

Onde,

AR – Concentração de açúcares redutores;

V_T – Volume total;

0,18 - Mols de glicose;

V_E – Volume de extrato;

T_H – Tempo de hidrólise.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Caracterização físico-química

Na Tabela 5 podemos observar os valores obtidos da caracterização físico-química para os substratos utilizados, sendo eles a fibrilha, torta de algodão e caroço de algodão moído. O alto teor de celulose presente nos materiais demonstra um bom indicativo para o seu uso como substrato da fermentação.

Tabela 5 - Caracterização físico-química dos substratos.

	FIBRILHA	TORTA DE ALGODÃO	CAROÇO MOÍDO
CARACTERIZAÇÃO	MÉDIA (%)	MÉDIA (%)	MÉDIA (%)
Teor de umidade	4,84 ± 0,012	8,86 ± 0,174	8,73 ± 0,454
Teor de cinzas	1,95 ± 0,017	4,14 ± 0,079	4,84 ± 0,119
Teor de extrativos	1,48 ± 0,037	13,0 ± 5,150	28,7 ± 7,965
Teor de lignina	6,50 ± 1,220	23,6 ± 1,970	14,4 ± 2,443
Teor de holocelulose	83,1 ± 1,030	72,5 ± 4,380	83,2 ± 1,315
Teor de celulose	68,1 ± 1,580	23,8 ± 0,444	47,1 ± 0,842
Teor de hemicelulose	13,3	46,6	36,1

Rodrigues et al. (2016)¹⁰⁴ e Ioelovich e Leykin. (2008)¹⁰⁵ obtiveram valores próximos ao realizar a caracterização físico-química da fibrilha, onde conseguiram 1,79% de extrativos, 1,5% de cinzas e 7,47% de lignina no primeiro trabalho e 1,2% de extrativos, 2,5% de cinzas e 5,0% de lignina no segundo estudo. Quanto a torta de algodão, a pesquisa realizada por Özbay (2001)¹⁰⁶ alcançou um valor próximo para os teores de cinzas (4,9%) e umidade (6,1%). Panagiotopoulos et al. (2013)¹⁰⁷ analisaram o teor de celulose (24,8%), lignina (16%) e cinzas (5,1%) na torta de algodão, obtendo resultados próximos do experimental realizado.

Referente a análise do caroço de algodão, no estudo realizado por Cheng e Biswas, (2011)¹⁰⁸, os pesquisadores conseguiram obter resultados próximos para lignina (17,3%) e teor de cinzas (3,62%). No trabalho realizado por Cheong, et al. (2010)¹⁰⁹, a análise realizada obteve um valor próximo para a umidade (8,4%). Ao analisar a composição físico-química desses

resíduos e comparar com a composição de diferentes trabalhos da literatura, pode-se concluir que a análise realizada está de acordo com a faixa de valores esperada para esse tipo de biomassa lignocelulósica, como observado na Tabela 5.

6.2 Fermentação em estado sólido

6.2.1 Ensaios de concentração de substrato

Com a finalidade de determinar qual a melhor concentração para a produção de celulases em FES, realizou-se a fermentação em diferentes proporções de concentrações, F50:T50, F40:T60 e F30:T70, além do caroço moído (CM), sendo mensurada a produção de açúcares e a atividade de enzimas. Na Tabela 6 encontram-se os resultados para a FES nas diferentes proporções analisadas para a atividade enzimática com o *Penicillium janthinellum* 3921. A mistura dos substratos fibrilha e torta de algodão foi realizada uma vez que, através de estudos prévios, verificou-se uma baixa atividade enzimática ao utilizar os substratos separados.

Tabela 6 – FPase obtida no ensaio de concentração com *Penicillium janthinellum* 3921.

PROPORÇÃO	FPase (U/g)
F50:T50	0,2076 ± 0,0318
F40:T60	0,1684 ± 0,0544
F30:T70	0,4963 ± 0,1356
CM	0,5121 ± 0,0684

Conforme observado na Tabela 6, o caroço de algodão moído (CM) obteve um melhor resultado de atividade de FPase, 0,5121 (± 0,0684) U/g, respectivamente. Sua atividade de FPase, como pode ser observada na Tabela 6, foi equivalente a proporção de F30:T70, que obteve 0,4963 (± 0,1356) U/g de atividade, porém o caroço de algodão se sobressaiu com melhores resultados.

Em estudo realizado com palha de carnaúba por Santos (2017)¹⁰¹ na produção de celulase com *Trichoderma reesei* CCT 2768 em FES, obteve-se um valor de FPase próximo ao caroço moído. Na pesquisa foi possível obter 0,75 U/g de atividade de FPase na palha de carnaúba sem pré-tratamentos. Bansal, et al. (2012)¹¹⁰ obtiveram 0,30 U/g de FPase ao realizar

a FES com *Aspergillus niger* NS-2 utilizando casca de cenoura, onde o resultado obtido no presente trabalho mostra-se dentro da faixa de ambos os estudos realizados.

Na Tabela 7 encontram-se os resultados para a FES nas diferentes proporções analisadas e a atividade enzimática obtida para *Trichoderma harzanium* 4127.

Tabela 7 – FPase obtida no ensaio de concentração com *Trichoderma harzanium* 4127.

PROPORÇÃO	FPase (U/g)
F50:T50	0,1920 ± 0,1079
F40:T60	0,1344 ± 0,0262
F30:T70	0,2537 ± 0,0804
CM	0,0699 ± 0,0470

Os resultados para a fermentação com o *T. harzanium* 4127 mostram que houve um melhor resultado de atividade de FPase para a proporção de 70% de torta de algodão, 0,2537 (\pm 0,0804) U/g. Ao comparar os resultados obtidos para a atividade de FPase para ambos os fungos, na proporções de 70% e CM, a fermentação com o fungo *P. janthinellum* 3921 houve um resultado melhor em ambas, sendo 0,4963 (\pm 0,1356) U/g, para F30:T70, e 0,5121 (\pm 0,0684) U/g, para CM. O *T. harzanium* 4127 obteve uma baixa atividade celulolítica em comparação com o *P. janthinellum* 3921, onde pode ser verificado que para CM houve um resultado bastante inferior em comparação com o *P. janthinellum* 3921.

6.2.2 Pré-tratamento do substrato

O pré-tratamento foi realizado após definir, por meio do ensaio de concentração, qual o melhor substrato e sua proporção. Sendo assim, realizou-se o pré-tratamento básico com o substrato do caroço moído, onde posteriormente realizou-se a FES para definir se o pré-tratamento apresentaria uma melhor atividade enzimática.

Na Tabela 8 encontram-se os resultados da FES com o pré-tratamento químico realizado para o *Penicillium janthinellum* 3921 e o *Trichoderma harzanium* 4127. Pode-se observar que apesar de não ter passado por um pré-tratamento específico para quebrar todo o material

lignocelulósico, o tratamento mecânico realizado na moagem do caroço obteve melhores resultados para os dois fungos ao ser comparado com o pré-tratamento químico.

Tabela 8 - FPase obtida no pré-tratamento químico para *Penicillium janthinellum* 3921 (P) e *Trichoderma harzanium* 4127 (T).

ENSAIO	FPase (U/g)
CM (P)	0,051751 ± 0,0058
CM (T)	0,028041 ± 0,0026

Em demais estudos onde realizou-se o pré-tratamento químico alcalino, como na pesquisa de Tesche (2017)¹¹¹, onde realizou-se o mesmo pré-tratamento no bagaço de cana-de-açúcar para ser utilizado na FES com o farelo de trigo em uma mistura 1:1, obteve um resultado de atividade de FPase maior, obtendo 1,2 U/g. Kazeem, Uthman-Saheed e Oke (2021)¹¹², realizaram o mesmo pré-tratamento com solução de NaOH para tratar o bagaço da cana de açúcar e obteve um resultado para a FPase ainda maior, obtendo 6,81 U/g. Damisa, Ameh e Umoh (2008)¹¹³, também realizando o pré-tratamento alcalino para obter maiores atividades de FPase utilizou como substrato o sabugo de milho, onde o pré-tratamento se mostrou eficaz e obteve 4,92 U/g de atividade.

Em comparação com o caroço do algodão moído, que obteve baixos resultados após o pré-tratamento alcalino, a disponibilidade de 14,4% ± (2,443) de lignina presente no substrato e o fato do mesmo não ser tão fibroso quanto o bagaço de cana-de-açúcar ou o sabugo de milho, que possuem em média cerca de 20,3%¹¹⁴ e 22,51%¹¹⁵ de lignina, respectivamente, ao realizar esse tratamento acredita-se que parte do substrato foi degradado com a solução, onde a celulose presente para a fermentação pode ter sido consumida. A alta quantidade de óleos no caroço do algodão também pode ter influenciado no pré-tratamento, uma vez que o material possui em média cerca de 17-22%.

Sendo assim, decidiu-se seguir o planejamento do presente trabalho apenas com o tratamento mecânico realizado no caroço, no caso, a moagem feita inicialmente. A escolha foi realizada para que houvesse a disponibilidade de todo o conteúdo lignocelulolítico durante a FES, uma vez que os resultados anteriores indicaram uma boa produção. Em relação a escolha do fungo *Penicillium janthinellum* 3921, a mesma ocorreu devido aos melhores resultados apresentados durante todos os experimentos realizados com o caroço de algodão moído, ao comparar-se com os resultados do *Trichoderma harzanium* 4127.

6.2.3 Planejamento estatístico de Plackett-Burman

Ao analisar os resultados obtidos dos ensaios de concentração observou-se que o fungo *Penicillium janthinellum* 3921 obteve melhores resultados de atividade enzimática ao ser utilizado o caroço do algodão moído. Visando otimizar a produção das celulases com o fungo *Penicillium janthinellum* 3921, utilizando como substrato da FES o caroço de algodão moído, e analisar os parâmetros que influenciam a fermentação, realizou-se um planejamento experimental do tipo Plackett-Burman¹⁰⁰ por meio do software Statistica 10.

Como uma forma de obter um controle e também um comparativo, realizou-se o experimento em duplicata. Na Tabela 9 temos os resultados da média da duplicata de FPase.

Tabela 9 - FPase obtida pela FES seguindo o planejamento de Plackett-Burman com *Penicillium janthinellum* 3921.

ENSAIO	FPase (U/g)
01	0,4653 ± 0,0327
02	0,5330 ± 0,0351
03	0,4161 ± 0,0340
04	0,4135 ± 0,0104
05	0,5793 ± 0,0755
06	0,2782 ± 0,0359
07	0,1810 ± 0,0336
08	0,3373 ± 0,1312
09	0,2707 ± 0,0939
10	0,4158 ± 0,0985
11	0,8216 ± 0,0181
12	0,2963 ± 0,0204
13 (C)	0,5459 ± 0,0343
14 (C)	0,6056 ± 0,0364
15 (C)	0,5607 ± 0,0457

Conforme descrito na Tabela 9, o Ensaio 11 obteve um melhor resultado de atividade de FPase, obtendo 0,8216 ($\pm 0,0181$) U/g. Os parâmetros estabelecidos para esse ensaio foram: 3,7 de pH, 31°C de temperatura, 3,0 mL de água total, 10^8 de inóculo, 1% de Tween 80, 3% de suplementação de nitrogênio. Conforme o diagrama de Pareto, Figura 8, as condições escolhidas não demonstraram parâmetros que influenciaram negativamente na produção de celulase e na sua atividade celulolítica.

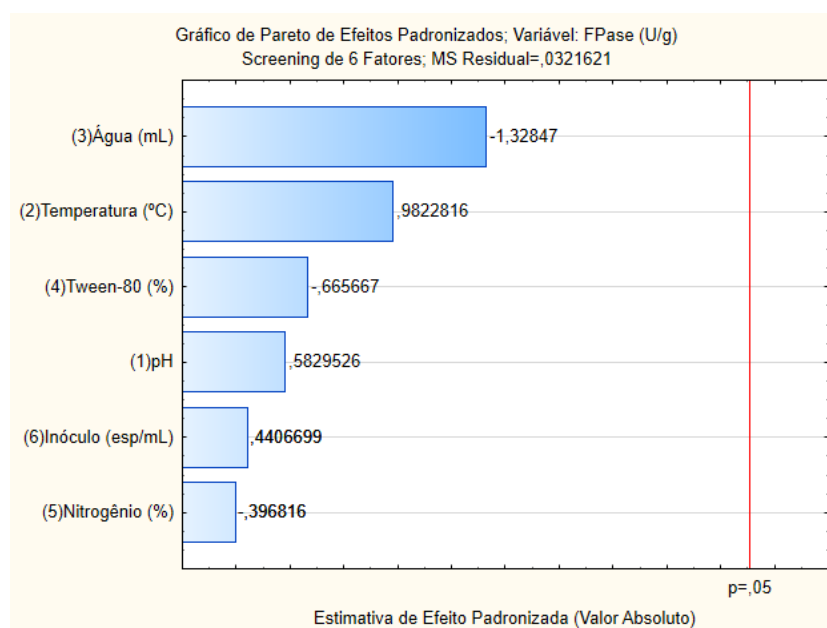


Figura 8 - Diagrama de Pareto mostrando as variáveis significativas com $p \leq 0,05$.

As condições definidas mostraram-se favoráveis na produção de celulase, onde pode-se verificar que as variáveis independentes não demonstraram variações significativas no estudo da FPase. A partir do diagrama de Pareto, pode-se afirmar que os pontos centrais definidos no planejamento estão dentro do esperado para a produção de celulase, bem como os níveis negativos e positivos, uma vez que uma variável, para se tornar significativa, ou seja, afetar diretamente na fermentação realizada, deve ultrapassar a linha vermelha à direita, o que não ocorreu nesse caso.

Com a finalidade de otimizar a fermentação em estado sólido, com o uso do planejamento de Plackett-Burman, Darabzadeh, Hamidi-Esfahani e Hejazi (2019)¹¹⁶ realizaram um estudo com o fungo *Trichoderma reesei* utilizando o resíduos de arroz como substrato, na pesquisa obtiveram 1,16 ($\pm 0,03$) U/g. Visando produzirem etanol a partir das celulases obtidas

por FES, Lever et al. (2010)¹¹⁷ utilizaram palha de trigo como substrato para a fermentação com *Trichoderma reesei*, obtendo 0,75-1,2 U/g de atividade celulolítica. Em um estudo com o uso da casca de soja como substrato para FES, Brijwani e Vadlani (2011)¹¹⁸ conseguiram obter 0,75 U/g utilizando *T. reesei* no estudo do substrato sem pré-tratamento. Os resultados apresentados dos estudos se mostram próximo do obtido experimentalmente, a comparação com diferentes substratos ocorre devido aos poucos estudos com os resíduos do algodão.

Apesar das baixas quantidades de atividade celulolítica obtida, a viabilidade de produção de celulases a partir de resíduos de algodão mostram que a obtenção alternativa dessas enzimas pode ser otimizada para que sejam em maiores quantidades. Realizando um comparativo com outras pesquisas, Singhania, et al. (2015)¹¹⁹ utilizaram o farelo de trigo para a FES e obtiveram 20 ($\pm 0,1$) U/g de atividade enzimática com o fungo *P. janthinellum* EMS-UV-8. Scholl et al. (2015)⁸⁸, utilizando o fungo *P. echinulatum* SIM29 obteve 32,93 IU/g de atividade enzimática, como substrato empregaram capim elefante com farelo de trigo em FES.

O uso de misturas de resíduos para a obtenção de maiores quantidades de FPase vem tornando-se uma forma de aumentar a produtividade. Um estudo realizado Dhillon, et al.(2011)¹²⁰ para verificação de FES com a mistura de resíduos e em cultivo multiespécies, obtiveram 24,17 ($\pm 0,59$) U/g em 96 horas com *A. niger* e *T. reesei*, empregando o farelo de trigo como substrato. Ao realizarem o uso do farelo de trigo com a palha de arroz (3:2) houve um aumento, obtendo 30,99 ($\pm 0,73$) U/g. Sendo assim, uma alternativa para obter uma alta atividade enzimática pode ser na associação do caroço de algodão moído com outro substrato residual ou um cultivo multiespécies, desse modo, pode verificar-se se ocorrerá o aumento da produtividade.

7 CONCLUSÃO

A partir da caracterização físico-química dos substratos, fibrilha, caroço e torta de algodão, observou-se que o complexo lignocelulósico presente no material tornava-o atrativo para a obtenção de enzimas celulolíticas, onde a fibrilha, o caroço e a torta de algodão apresentaram $68,1\% \pm 1,580$, $23,8\% \pm 0,444$ e $47,1\% \pm 0,842$ de celulose, respectivamente. O estudo dos resíduos do algodão foram essenciais para conhecer o substrato e observar sua capacidade em serem utilizados na produção de celulasas fúngicas, sendo estas mundialmente utilizadas e com grande importância industrialmente.

O caroço do algodão demonstrou-se um grande potencial na produção de celulasas fúngicas. Apesar do pré-tratamento químico com NaOH não ter favorecido na produção, o pré-tratamento físico realizado através da moagem do material demonstrou-se eficiente. Através do estudo dos microrganismos, o *Trichoderma harzanium* 4127 e o *Penicillium janthinellum* 3921, utilizados nos ensaios de concentração verificou-se que o *P. janthinellum* 3921 obteve melhores resultados ($0,5121 \pm 0,0684$ U/g), produzindo cerca de 86,4% a mais que o *T. harzanium* 4127 ($0,0699 \pm 0,0470$ U/g) no mesmo período utilizando o caroço de algodão moído.

O uso do caroço de algodão moído com o fungo *Penicillium janthinellum* 3921 em FES, com os parâmetros pré-definidos a partir do planejamento de Plackett-Burman, obteve resultados satisfatórios ao comparar-se com outras pesquisas para a produção de celulasas com outros resíduos. A partir do estudo realizado foi possível obter, $0,8216 \pm 0,0181$ U/g de atividade de FPase, utilizando o pH em 3,7, 31°C de temperatura, 3,0 mL de água, 10^8 de inóculo, 1% de Tween-80 e 3% de suplementação de nitrogênio, em uma fermentação em estado sólido de 4 dias, obtendo um aumento de 37,7% em relação a produção realizada no ensaio de concentração do *P. janthinellum* 3921 com o caroço de algodão moído ($0,5121 \pm 0,0684$ U/g).

Os resultados obtidos são promissores, uma vez que seus parâmetros podem ser otimizados e introduzidas outras variáveis que podem afetar diretamente na fermentação, como aeração, agitação controlada e o tempo de cultivo, sendo assim, capaz de produzir uma maior quantidade de celulase e obter, conseqüentemente, maiores atividades de FPase. A efetividade em produzir enzimas celulolíticas em um curto período torna o uso do *P. janthinellum* 3921 com o caroço de algodão moído bastante atrativo, visto que industrialmente produções que demandam um maior tempo de fermentação acabam não tornando-se economicamente viável.

8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos verifica-se o potencial em obter celulases a partir de resíduos do algodão. Diante disso, sugere-se:

- Acrescentar parâmetros como agitação e aeração para verificar a influência dos mesmos na produção de celulases fúngicas;
- Verificar qual o ponto de obtenção máxima de atividade celulolítica durante a fermentação em diferentes tempos de cultivo de cultivo;
- Estudo da proporção de fibrilha e torta de algodão em maiores quantidades e realização do pré-tratamento no material, uma vez que apresentaram valores próximos do caroço de algodão com o *Penicillium janthinellum* 3921.
- Estudo da associação do caroço com a torta de algodão e/ou fibrilha em diferentes proporções para verificação de aumento de produtividade.

9 REFERÊNCIAS

- [1] 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.
- [2] AHMAD, Shakeel; HASANUZZAMAN, Mirza (Ed.). **Cotton Production and Uses: Agronomy, Crop Protection, and Postharvest Technologies**. Springer Nature, 2020.
- [3] PINHEIRO, Lara Rebouças; AMBROZIM, Flaviane Mendonça; DE OLIVEIRA, Viviane Marques. Produção de celulases por fermentação em estado sólido a partir de resíduos agroindustriais. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 10, p. 19056-19060, 2019.
- [4] BRASIL. Decreto nº 43.415, 30 de março de 2004. Define conceitos e características do algodão em caroço, algodão em pluma, caroço de algodão, linter e subprodutos do beneficiamento do algodão. Instituto Mineiro de Agropecuária – IMA. Belo Horizonte, MG. Portaria Nº 630. 2004.
- [5] FOCKINK, Douglas Henrique. **Pré-tratamento e hidrólise enzimática de bagaço de cana e de resíduos do processamento do algodão**. 2018.
- [6] 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.
- [7] DOS SANTOS, Antonio Carlos et al. Lignin–enzyme interactions in the hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Trends in biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 518-531, 2019.
- [8] SRIVASTAVA, Neha et al. Applications of fungal cellulases in biofuel production: advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 2379-2386, 2018.
- [9] ABRAPA. **Área, Produção e Produtividade Brasil**. 2021. Disponível em: <<https://www.abrapa.com.br/Paginas/dados/balanca-comercial-brasileira-de-algodao.aspx>>. Acesso em: 23 de Novembro de 2021
- [10] LIMA, Zilda Cristina Malheiros et al. Germinação de mamoneira em diferentes combinações de vermiculita e composto orgânico. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 11, p. 102042-102051, 2021.

- [11] FOCKINK, Douglas Henrique; MACENO, Marcelo Adriano Corrêa; RAMOS, Luiz Pereira. Production of cellulosic ethanol from cotton processing residues after pretreatment with dilute sodium hydroxide and enzymatic hydrolysis. **Bioresource technology**, v. 187, p. 91-96, 2015.
- [12] 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.
- [13] THAPA, Santosh et al. Microbial cellulolytic enzymes: diversity and biotechnology with reference to lignocellulosic biomass degradation. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 19, p. 621-648, 2020.
- [14] CHEN, Kai; ARNOLD, Frances H. Engineering new catalytic activities in enzymes. **Nature Catalysis**, v. 3, n. 3, p. 203-213, 2020.
- [15] WEBB, Edwin C. et al. **Enzyme nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes**. Academic Press, 1992.
- [16] RESEACH, B. Global markets for enzymes in industrial applications. **BCC Research**. 2021.
- [17] BRÁS, Joana LA et al. Structural insights into a unique cellulase fold and mechanism of cellulose hydrolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 13, p. 5237-5242, 2011.
- [18] LOPEZ-RAMIREZ, N. et al. Effect of stirring on growth and cellulolytic enzymes production by *Trichoderma harzianum* in a novel bench-scale solid-state fermentation bioreactor. **Bioresource technology**, v. 265, p. 291-298, 2018.
- [19] AHMED, Sibtain et al. Production and purification of cellulose-degrading enzymes from a filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. **Pak J Bot**, v. 41, n. 3, p. 1411-1419, 2009.
- [20] ASTOLFI, Viviane et al. Cellulolytic enzyme production from agricultural residues for biofuel purpose on circular economy approach. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 42, n. 5, p. 677-685, 2019.

- [21] DE SIQUEIRA, Felix G.; FERREIRA FILHO, Edivaldo Ximenes. Plant cell wall as a substrate for the production of enzymes with industrial applications. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 54-60, 2010.
- [22] JUTURU, Veeresh; WU, Jin Chuan. Microbial cellulases: engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 188-203, 2014.
- [23] FARINAS, Cristiane Sanchez. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. **Embrapa Instrumentação-Documentos (INFOTECA-E)**, 2011.
- [24] SHALLOM, Dalia; SHOHAM, Yuval. Microbial hemicellulases. **Current opinion in microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219-228, 2003.
- [25] DUARTE, Gilvan Caetano. **Holocelulases produzidas por *Aspergillus oryzae*: purificação, caracterização e degradação de biomassa lignocelulósica**. 2013.
- [26] JAYASEKARA, Sandhya; RATNAYAKE, Renuka. Microbial cellulases: an overview and applications. **Cellulose**, v. 22, 2019.
- [27] SANKARRAJ, Nisha; NALLATHAMBI, Gobi. Enzymatic biopolishing of cotton fabric with free/immobilized cellulase. **Carbohydrate polymers**, v. 191, p. 95-102, 2018.
- [28] CHATHA, Shahzad Ali Shahid; ASGHER, Muhammad; IQBAL, Hafiz MN. Enzyme-based solutions for textile processing and dye contaminant biodegradation—a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 16, p. 14005-14018, 2017.
- [29] SHARMA, Harsh P.; PATEL, Hiral; SHARMA, Sugandha. Enzymatic extraction and clarification of juice from various fruits—a review. **Trends Post Harvest Technol**, v. 2, n. 1, p. 1-14, 2014.
- [30] OGRIZEK, Linda et al. Properties of bacterial cellulose produced using white and red grape bagasse as a nutrient source. **Processes**, v. 9, n. 7, p. 1088, 2021.
- [31] WOJDYŁO, Aneta et. al. Effect of different pre-treatment maceration techniques on the content of phenolic compounds and color of Dornfelder wines elaborated in cold climate. **Food Chemistry**, v. 339, p. 127888, 2021.
- [32] MONCADA, Jonathan et al. Design strategies for sustainable biorefineries. **Biochemical Engineering Journal**, v. 116, p. 122-134, 2016.

- [33] SILVA, Caio OG; FILHO, Edivaldo XF. A review of holocellulase production using pretreated lignocellulosic substrates. **BioEnergy Research**, v. 10, n. 2, p. 592-602, 2017.
- [34] CHAMPREDA, Verawat et al. Designing cellulolytic enzyme systems for biorefinery: from nature to application. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 128, n. 6, p. 637-654, 2019.
- [35] SIQUEIRA, Joyce Gueiros Wanderley et al. Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: a review. **Biomass and Bioenergy**, v. 132, p. 105419, 2020.
- [36] MANDELS, M.; Weber, J. The Production Of Cellulases. **Advances In Chemistry Series**, V.95, P.391–414, 1969.
- [37] ILMEN, Marja et al. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1298-1306, 1997.
- [38] KHOKHAR, Ibatsam et al. Isolation and screening of highly cellulolytic filamentous fungi. **Journal of applied sciences and environmental management**, v. 16, n. 3, 2012.
- [39] ORLANDELLI, Ravelly Casarotti et al. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, 2012.
- [40] HARMAN, Gary E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 190-194, 2006.
- [41] SCHUSTER, André; SCHMOLL, Monika. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 787-799, 2010.
- [42] MUKHERJEE, Prasun K. et al. (Ed.). **Trichoderma: biology and applications**. CABI, 2013.
- [43] LI, Jia-Xiang, et al. Rapid production of lignocellulolytic enzymes by *Trichoderma harzianum* LZ117 isolated from Tibet for biomass degradation. **Bioresource technology**. 292: 122063. 2019.
- [44] ZHANG, Yu, et al. Low-cost cellulase-hemicellulase mixture secreted by *Trichoderma harzianum* EM0925 with complete saccharification efficacy of lignocellulose. **International journal of molecular sciences**. 21.2: 371. 2020.

- [45] VAISHNAV, Neha et al. *Penicillium*: the next emerging champion for cellulase production. **Bioresource Technology Reports**, v. 2, p. 131-140, 2018.
- [46] SINGH, Anusuiya et al. Improved cellulase production by *Penicillium janthinellum* mutant. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 55, p. 436-440. 2017.
- [47] SREEJA-RAJU, AthiraRaj, et al. *Penicillium janthinellum* NCIM1366 shows improved biomass hydrolysis and a larger number of CAZymes with higher induction levels over *Trichoderma reesei* RUT-C30. **Biotechnology for Biofuels**. 13.1: 1-15. 2020.
- [48] SINGHVI, M. S.; ADSUL, M. G.; GOKHALE, D. V. Comparative production of cellulases by mutants of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 and its application in hydrolysis of Avicel and cellulose. **Bioresource Technology**. 102.11: 6569-6572. 2011.
- [49] CANILHA, L.; MILAGRES, A.; SILVA, S.; SILVA, J.; FELIPE, M.; ROCHA, G.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, v. 44, p. 48-54, 2010.
- [50] MOOD, Sohrab Haghghi et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77-93, 2013.
- [51] KNAUF, Michael et al. Lignocellulosic biomass processing: a perspective. **International sugar journal**, v. 106, n. 1263, p. 147-150, 2004.
- [52] ZOGHLAMI, Aya; PAËS, Gabriel. Lignocellulosic biomass: understanding recalcitrance and predicting hydrolysis. **Frontiers in chemistry**, v. 7, p. 874, 2019.
- [53] ROMERO, M. D. et al. Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 3-5, p. 244-250, 1999.
- [54] ADSUL, M. G. et al. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, n. 1, p. 67-72, 2004.
- [55] LIMING, Xia; XUELIANG, Shen. High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. **Bioresource technology**, v. 91, n. 3, p. 259-262, 2004.
- [56] BAILEY, Michael J.; POUTANEN, Kaisa. Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 5-10, 1989.

- [57] DARABZADEH, Nazanin; HAMIDI-ESFAHANI, Zohreh; HEJAZI, Parisa. Improvement of cellulase production and its characteristics by inducing mutation on *Trichoderma reesei* 2414 under solid state fermentation on rice by-products. **Applied Food Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 11-18, 2018.
- [58] MARQUES, T. R. **Aproveitamento tecnológico de resíduos de acerola: Farinhas e barra de cereais**. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Agroquímica. Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2013.
- [59] FERREIRA, IL; FREIRE, EC In: FREIRE, EC **Industrialização da Pluma**. 1. ed. Brasília: ABRAPA, cap. 25, p. 871-887. 2007.
- [60] FAOSTAT. **Crops and livestock products**. 2021. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>>. Acesso em: 09 de Dezembro de 2021.
- [61] BELTRÃO, N.E.M. et al. **Potencialidades de alguns subprodutos do algodoeiro**. Fitomassa e seu subproduto principal, a celulose. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2000.
- [62] BEZERRA, Elieber Barros et al. Processing and properties of PCL/cotton linter compounds. **Materials Research**, v. 20, p. 317-325, 2017.
- [63] HERNANDEZ, E. Cottonseed: Overview. **Encyclopedia of Food Grains: Second Edition**. 1.4: 242-246. 2015.
- [64] ONUKWULI, Dominic Okechukwu, et al. Optimization of biodiesel production from refined cotton seed oil and its characterization. **Egyptian Journal of Petroleum**. 26.1: 103-110. 2017.
- [65] CHERIAN, Elsa; KALPANA, R.; JAYALAKSHMI, E. Producton of cellulase by *Aspergillus fumigatus* JCF using agro-based cellulosic waste and its usage in bioethanol synthesis. **International Journal of Energy Technology and Policy**. 11.3: 294-302. 2015.
- [66] JABASINGH, S. Anuradha; VALLINACHIYAR, C. Optimization of cellulase production by *Aspergillus nidulans*: application in the biosoftening of cotton fibers. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 85-97, 2011.
- [67] PINHEIRO, Thais Santos. Produção de celulasas e xilanases por *Aspergillus tubingensis* AN1257 em torta de caroço de algodão em biorreator instrumentado. 2019.

- [68] WANG, Rui et al. Removing the residual cellulase by graphene oxide to recycle the biopolishing effluent for dyeing cotton fabrics. **Journal of environmental management**, v. 207, p. 423-431, 2018.
- [69] HU, Yunzi, et al. Optimisation of cellulase production from textile waste using experimental design. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 118. p. 133-142, 2018.
- [70] RAMAMOORTHY, Navnit Kumar; SAMBAVI, T. R.; RENGANATHAN, Sahadevan. A study on cellulase production from a mixture of lignocellulosic wastes. **Process Biochemistry**. 83: 148-158. 2019.
- [71] WANG, Huaimin, et al. Textile waste valorization using submerged filamentous fungal fermentation. **Process safety and environmental protection**. 118: 143-151. 2018.
- [72] NIKOLIĆ, Svetlana et al. Production of bioethanol from pre-treated cotton fabrics and waste cotton materials. **Carbohydrate polymers**, v. 164, p. 136-144, 2017.
- [73] CHENG J. J.; TIMILSINA G. R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: a review. **Renewable Energy**. [S.l.], v.36, p.3541-3549, 2011.
- [74] SUN, Ye; CHENG, Jiayang. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.
- [75] NAKAEMA, Hugo. Estratégias de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica para melhorar a produção de biogás e bioquímicos em biorrefinarias. 2021.
- [76] SILVEIRA, Cristina Moreira da; FURLONG, Eliana Badiale. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Food Science and Technology**, v. 27, n. 4, p. 805-811, 2007.
- [77] SINGH, Anita et al. An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. **Bioresource Technology Reports**, v. 14, p. 100652, 2021.
- [78] PELENZ, Aline et al. Produção de celulasas a partir de capim elefante (*pennisetum purpureum*) por fermentação em estado sólido. 2018.
- [79] PANDEY, Ashok. Solid-state fermentation. **Biochemical engineering journal**, v. 13, n. 2-3, p. 81-84, 2003.

- [80] SMITS, Johannes Petrus. **Solid-state fermentation: modelling fungal growth and activity**. Wageningen University and Research, 1998.
- [81] LANGARO, Carina et al. Otimização do processo de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar por hidrólise enzimática com celulases fúngicas. **Revista Tecnológica**, p. 53-62, 2014.
- [82] MAURYA, Devendra P. et al. Optimization of solid state fermentation conditions for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*. **Journal of Environmental Biology**, v. 33, n. 1, p. 5, 2012.
- [83] DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, DMF. Biotecnologia industrial: Fermentação em estado sólido. **São Paulo: Ed. Edgard Blücher**, v. 2, 2001.
- [84] SILVA, Leticia Souza et al. Fermentação em estado sólido e submerso para produção de celulase: Revisão bibliográfica. **CIAGRO 2021**, Recife. 2020.
- [85] PURKARTHOFER, Heinz; SINNER, Michael; STEINER, Walter. Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: optimization of production in submerged and solid-state culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 8, p. 677-682, 1993.
- [86] SACHSLEHNER, Alois et al. Induction of mannanase, xylanase, and endoglucanase activities in *Sclerotium rolfsii*. **Applied and environmental microbiology**, v. 64, n. 2, p. 594-600, 1998.
- [87] ABDULLAH, Jwan J., et al. Optimizing cellulase production from municipal solid waste (MSW) using solid state fermentation (SSF). **Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications**, 6.3: 1-10. 2016.
- [88] SCHOLL, Angélica Luisi et al. Elephant grass pretreated by steam explosion for inducing secretion of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 solid-state cultivation. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 97-107, 2015.
- [89] CARVALHO, I. Z. de; et al. Avaliação da casca de café como substrato produção de celulases por fermentação em estado sólido. In: **Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia (CONTECC)**. Maceió, Alagoas. 2018.
- [90] KILIKIAN, B. V. et al. Filamentous fungi and media for cellulase production in solid state cultures. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 279-286, 2014.

- [91] SALOMÃO, Gabriella Soares Borges et al. Production of cellulases by solid state fermentation using natural and pretreated sugarcane bagasse with different fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 1-6, 2019.
- [92] MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. de F.; MARCONCINI, J. M. Procedimentos para análise lignocelulósica. **EMBRAPA**, Campina Grande, PB, 54p., 2010.
- [93] Technical Association of the Pulp and Paper Industry. TAPPI T204 cm-97: solvent extractives of wood and pulp. 1997.
- [94] Technical Association of the Pulp and Paper Industry. TAPPI T222 om-11: acid-insoluble lignin in wood and pulp. 2011.
- [95] ARAUJO, Emmanoella Costa Guaraná et al. Determinação Dos Componentes Estruturais Da Madeira Do Angico Vermelho. **XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão – JEPEX 2013 – UFRPE**. 2013.
- [96] AGUILERA, Jorge González et al. Otimização do método de produção massal de *Trichoderma asperellum* (Ascomycota: Hypocreaceae) em arroz. **Acta Biológica Catarinense**, v. 7, n. 3, p. 46-58, 2020.
- [97] Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. IV Curso Teórico e Prático: avaliação da qualidade de produtos à base de Trichoderma. Brasília; 46 p. 2012.
- [98] GUTIERREZ-CORREA, Marcel, et al. Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**. 68.2: 173-178. 1999.
- [99] RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, Ursula Fabiola, et al. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 46: 912-919. 2011.
- [100] PLACKETT, R.L. & BURMAN, J.P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, 33:305-325, 1946.
- [101] 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. Bachelor's Thesis. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2017.

- [102] MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, 31(3):426-428, 1959.
- [103] GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.
- [104] RODRIGUES, Claudinei Henrique Ferreira; SOUZA, Vinicius de Jesus Carvalho de; CARASCHI, José Cláudio. **Estudo da potencialidade do línter de algodão para a produção de celulose solúvel**. Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Itapeva, Itapeva, 2016.
- [105] IOELOVICH, Michael; LEYKIN, Alex. Structural investigations of various cotton fibers and cotton celluloses. **BioResources**, 3.1: 170-177. 2008.
- [106] ÖZBAY, N., et al. Biocrude from biomass: pyrolysis of cottonseed cake. **Renewable Energy**, 24.3-4: 615-625. 2001.
- [107] PANAGIOTOPOULOS, I. A., et al. Biodiesel and biohydrogen production from cottonseed cake in a biorefinery concept. **Bioresource technology**, 136: 78-86. 2013.
- [108] CHENG, H. N.; BISWAS, Atanu. Chemical modification of cotton-based natural materials: Products from carboxymethylation. **Carbohydrate Polymers**. 84.3: 1004-1010. 2011.
- [109] CHEONG, Jong-Chun, et al. Physico-chemical characteristics and utilization of raw materials for mushroom substrates. **The Korean Journal of Mycology**. 38.2: 136-141. 2010.
- [110] BANSAL, Namita, et al. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste management**. 32.7: 1341-1346. 2012.
- [111] TESCHE, Luana Zanchetta. Estudo comparativo das características e da eficácia de celulases de fungos endofíticos na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. 2017.
- [112] KAZEEM, Muinat Olanike; UTHMAN-SAHEED, Lateefah; OKE, Mushafau Adebayo. Impact of pretreatment severity on fungal cellulase production on sugarcane bagasse substrate. **Journal of Taibah University for Science**. 15.1: 367-375. 2021.
- [113] DAMISA, D.; AMEH, J. B.; UMOH, V. J. Effect of chemical pretreatment of some lignocellulosic wastes on the recovery of cellulase from *Aspergillus niger* AH3 mutant. **African journal of Biotechnology**, 7.14. 2008.

- [114] NOSRATPOUR, Mohammad Javad; KARIMI, Keikhosro; SADEGHI, Morteza. Improvement of ethanol and biogas production from sugarcane bagasse using sodium alkaline pretreatments. **Journal of environmental management**. 226: 329-339. 2018.
- [115] MAFA, Mpho, et al. The effects of alkaline pretreatment on agricultural biomasses (corn cob and sweet sorghum bagasse) and their hydrolysis by a termite-derived enzyme cocktail. **Agronomy**. 10.8: 1211. 2020.
- [116] DARABZADEH, Nazanin; HAMIDI-ESFAHANI, Zohreh; HEJAZI, Parisa. Optimization of cellulase production under solid-state fermentation by a new mutant strain of *Trichoderma reesei*. **Food science & nutrition**. 7.2: 572-578. 2019.
- [117] LEVER, Mitchell, et al. Ethanol from lignocellulose using crude unprocessed cellulase from solid-state fermentation. **Bioresource Technology**. 101.18: 7083-7087. 2010.
- [118] BRIJWANI, Khushal; VADLANI, Praveen V. Cellulolytic enzymes production via solid-state fermentation: effect of pretreatment methods on physicochemical characteristics of substrate. **Enzyme research** 2011.
- [119] SINGHANIA, Reeta Rani, et al. An integrative process for bio-ethanol production employing SSF produced cellulase without extraction. **Biochemical Engineering Journal**. 102: 45-48. 2015.
- [120] DHILLON, Gurpreet Singh, et al. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. **Industrial Crops and Products**. 34.1: 1160-1167. 2011.