UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Ilha Solteira

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ENGENHARIA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA

PRODUÇÃO DE CELULASES POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE SOLO DO BIOMA CERRADO VISANDO APLICAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS

Amanda da Silva Dias

Ilha Solteira - SP
Janeiro, 2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ENGENHARIA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA

PRODUÇÃO DE CELULASES POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE SOLO DO BIOMA CERRADO VISANDO APLICAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS

Amanda da Silva Dias

Profª. Drª. Ana Maria Rodrigues Cassiolato
Profª. Drª. Heloiza Ferreira Alves do Prado

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Engenharia, Câmpus de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ilha Solteira - SP
Janeiro, 2024

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

D541p

Dias, Amanda da Silva.
Produção de celulases por fungos filamentosos isolados de solo do bioma cerrado visando aplicação em biocombustíveis / Amanda da Silva Dias. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2024
41 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, 2024

Orientador: Ana Maria Rodrigues Cassiolato
Co-orientador: Heloiza Ferreira Alves do Prado
Inclui bibliografia

1. Celulase. 2. Filamentous Fungi. 3. Fungi. 4. Solid state fermentation.

Amanda Sertori dos Santos
Bibliotecária - CRB/8-9061
Seção Técnica de Referência, Atendimento ao Usuário e Documentação
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Ilha Solteira

ATA DE DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Produção de Celulases por fungos filamentosos isolados de solo do Bioma Cerrado visando aplicação em biocombustíveis

AMANDA DA SILVA DIAS

REGULAMENTO SOBRE A AVALIAÇÃO:

ARTIGO 25° - § 2° A apresentação pública do trabalho de TCC deverá ser de no mínimo 20 (vinte) minutos e máximo de 40 (quarenta) minutos. Após um intervalo de 5 (cinco) minutos, haverá a arguição do Trabalho pelos examinadores. O tempo de arguição, será de até 15 (quinze) minutos para cada examinador, e até 15 (quinze) minutos o tempo para a resposta do(a) aluno(a) a cada examinador ou no caso de se optar pelo diálogo, o tempo conjunto entre examinador e acadêmico(a) será de no máximo 30 (trinta) minutos.

ARTIGO 24° - No julgamento do TCC, a banca examinadora deverá avaliar a apresentação oral, escrita e a defesa do trabalho durante a arguição. O conceito final será APROVADO ou REPROVADO.

COMISSÃO EXAMINADORA

1º EXAMINADOR (Coorientador-Presidente)
Nome: Heloiza Ferreira Alves do Prado
Heloiza Ferreira Alves do Prado

2º EXAMINADOR
Nome: Rosemeire da Silva Filardi
R. Filardi

3º EXAMINADOR
Nome: Cintia Lionela Ambrosio de Menezes
Cintia Lionela A. Menezes

CONCEITO

(X)APROVADO ( )REPROVADO

Ilha Solteira-SP, 05 de Janeiro de 2024.

Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira
Cursos: Agronomia, Ciências Biológicas, Eng. Civil, Eng. Elétrica, Eng. Mecânica, Física, Matemática e Zootecnia.
Avenida Brasil Centro, 56 CEP 15385-000 Ilha Solteira São Paulo Brasil
pabx (18) 3743 1000 fax (18) 3742 2735 scom@adm.feis.unesp.br www.feis.unesp.br

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pela saúde, proteção, foco, fé, força, determinação e coragem, me permitindo passar por mais essa etapa da minha vida acadêmica.

Aos meus amados avós José e Rosemary, que me acolheram e me apoiaram durante toda essa trajetória, incentivando e aconselhando nos momentos difíceis, nunca me deixando desanimar ou desistir, sempre apontando os pontos positivos e acreditando no meu potencial.

A minha amada mãe que sempre me incentivou e apoiou independente da distância ou do caminho a ser tomado, me ajudando sem medir esforços e esperando os finais de semana para me ver.

A minha co-orientadora Profª. Drª. Heloiza por me acolher de braços abertos, por todo carinho, paciência, dedicação, por cada minuto do seu tempo dedicado a orientação desse trabalho, seja presencial, por mensagem ou chamada de vídeo, agradeço imensamente por todos os ensinamentos e incentivo na carreira acadêmica.

A minha orientadora Profª. Drª. Ana Maria por me receber tão bem como orientada e incentivo na carreira acadêmica.

Ao meu namorado Guilherme por todo incentivo, palavras de carinho e motivação.

Aos amigos que a faculdade me deu Emerson, Luisa e Vitória por todo carinho, apoio, motivação, incentivo, paciência e ombro amigo para meus desabafos.

A minha amiga Ana Luiza por ser a pessoa que me manteve a calma com a paciência, cumplicidade e palavras de carinho e incentivo, sempre compreensiva esperando para que nos víssemos no final de semana.

Aos meus colegas do laboratório de Microbiologia e processos biotecnológicos por cada momento e aprendizado durante este período.

Aos professores que tive ao longo da vida acadêmica e contribuíram para a minha formação.

Aos funcionários da UNESP que tiveram contribuição no auxílio direto ou indireto deste trabalho.

Antecipadamente, agradeço à banca examinadora pelo tempo concedido para examinar este trabalho.

A todos que contribuíram de alguma forma para que eu chegasse até aqui, agradeço imensamente.

RESUMO

As enzimas celulolíticas, pertencentes à classe das Hidrolases, desempenham um papel crucial na hidrólise enzimática da celulose, um componente-chave na biomassa vegetal, o que as tornam foco de estudo para aplicações industriais. Esse processo é crucial na produção de açúcares fermentáveis, como a glicose, que pode ser convertida em etanol, um biocombustível. Além disso, as celulases têm aplicações na indústria de alimentos, papel e bioenergia, contribuindo para a produção de diversos produtos e processos sustentáveis. A eficiência e especificidade destas enzimas, o que as tornam ferramentas valiosas em processos industriais relacionados à degradação da celulose e à produção de biocombustíveis. As celulases são categorizadas em três grupos conforme seu local de ação no substrato: Endoglucanases (EnG), que quebram ligações internas na fibra celulolítica; Exoglucanases (ExG), que atuam nas extremidades mais externas da celulose; e β-glicosidases (BG), responsáveis pela hidrólise de oligossacarídeos solúveis em glicose. Os microrganismos estudados neste trabalho foram coletados em solo do Bioma Cerrado. Isolados e transferidos para placas com Ágar Dextrosado de Batata (PDA), incubados a 30ºC por 96 horas na estufa BOD. As colônias fúngicas foram transferidas para a devida manutenção e posteriormente, submetidas aos ensaios. O extrato enzimático bruto foi obtido através do cultivo em Estado Sólido (CES) utilizando farelo de trigo como substrato. O farelo de trigo, fornecido em frascos Erlenmeyers de 250 mL, foi utilizado na quantidade de 5 g. O método dextrinizante proposto por Miller (1959) foi utilizado para a determinação da atividade amilolítica.

Palavras-chave: celulase, filamentous fungi, fungi e solid state fermentation.

ABSTRACT

Cellulolytic enzymes, belonging to the Hydrolases class, play a crucial role in the enzymatic hydrolysis of cellulose, a key component in plant biomass, making it significant on an industrial scale. This process is essential in the production of fermentable sugars, such as glucose, which can be converted into ethanol, a biofuel. Additionally, cellulases have applications in the food, paper, and bioenergy industries, contributing to the production of various sustainable products and processes. The efficiency and specificity of these enzymes make them valuable tools in industrial processes related to cellulose degradation and biofuel production. Also known as cellulases, these enzymes are categorized into three groups based on their location on the substrate: Endoglucanases (EnG), breaking internal bonds in the cellulolytic fiber; Exoglucanases (ExG), acting on the external region of cellulose; and ***β***-glucosidases (BG), responsible for the hydrolysis of glucose-soluble oligosaccharides. The microorganisms studied in this work were collected from the Cerrado Biome soil. Isolates were transferred to Petri dishes with Potato Dextrose Agar (PDA), incubated at 30°C for 96 hours in a BOD incubator. Typical colonies were transferred for maintenance and assays. The crude enzymatic extract was obtained through Solid-State Cultivation (SSC) using wheat bran as a substrate. Wheat bran, provided in 250 mL Erlenmeyer flasks, was used in the amount of 5 g. The dextrinizing method proposed by Miller (1959) was used for the determination of amylolytic activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fluxograma simplificado do processo de produção do etanol de primeira geração, a partir do bagaço de cana……16

Figura 2 – Ilustração de biomassa lignocelulósica……..17

Figura 3 – Ação sinérgica das celulases……..20

Figura 4 – Determinação de Endoglucanase - uso de carboximetilcelulose (CMCase).....21

Figura 5 – Determinação de Exoglucanase - Celulose Microcristalina (Avicel).....22

Figura 6 – Aspecto da colônia dos fungos filamentosos: a) P2D19, b) 14.3, c) 22.1, d) 5.2……..30

Figura 7 – Isolados fúngicos sob Cultivo em Estado Sólido utilizando farelo de trigo como substrato, após 72 horas de cultivo. a) P2D19, b) 14.3, c) 22.1, d) 5.2……31

Figura 8 – Diagrama de calibração para padrão de glicose, obtido pelo programa Excel…...33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação de enzimas e suas reações……19

Tabela 2 – Atividades de Endoglucanase e Exoglucanase para os isolados fúngicos, cultivados sob CES, usando farelo de trigo como substrato, após 72 horas de cultivo……33

SUMÁRIO

1. Introdução……11
2. Revisão Bibliográfica……...12
   2.1 Energia renovável e biocombustíveis.....12
      2.1.1 Produção de biocombustíveis.....14
      2.1.2 Etanol de 1ª e 2ª geração……...15
   2.2 Biomassa lignocelulósica……17
   2.3 Enzimas……...18
      2.3.1 Nomenclatura enzimática……18
      2.3.2 Enzimas Celulolíticas.....20
      2.3.3 Endoglucanases (EnGases).....21
      2.3.4 Exoglucanases (ExGases).....22
      2.3.5 β-glicosidases…..……...……..23
   2.4 Fungos filamentosos…….....23
   2.5 Aprimoramento da produção de celulase por fungos filamentosos……25
   2.6 Cultivo microbiano……..25
      2.6.1 Cultivo em Estado sólido (CES).....……..……....26
      2.6.2 Cultivo Submerso (CSm).....27
   2.7 Produção de celulase por fungos filamentosos…….……..27
3. Objetivos…….……..28
4. Materiais e Métodos…….…….28
   4.1 Levantamento bibliográfico sobre celulase…….……29
   4.2 Microrganismos……...……29
   4.3 Meio para reativação e manutenção……29
   4.4 Cultivo em Estado Sólido (CES).....29
   4.5 Determinação de atividade enzimática……30
5. Resultados e discussões……....30
   5.1 Reativação dos isolados……...……...30
   5.2 Cultivo em Estado Sólido……32
   5.3 Determinação da atividade celulolítica……...33
6. Considerações finais……35
7. Referências bibliográficas……36

1. INTRODUÇÃO

O Bioma Cerrado, o segundo maior do país, abrange cerca de 24% do território brasileiro, sendo uma das áreas mais ricas mundialmente e com mais prioridade para conservação. Esse Bioma exibe uma diversidade de formações vegetais que vão desde áreas de campos abertos até florestas densas. (Embrapa, 2006).

Nas últimas décadas, o Cerrado era considerado uma terra improdutiva, passando por mudanças significativas quando o assunto é uso e ocupação. Porém, a expansão da agricultura e agropecuária de alta tecnologia foi uma mudança marcante pelos profundos impactos causados neste Bioma (Durigan *et al*., 2011). Na proporção em que a destruição pelos impactos ambientais avança, a conscientização sobre a importância da preservação dos recursos naturais também cresce globalmente. Vários elementos da biodiversidade, incluindo animais, árvores, fungos, microrganismos e até genes derivados de organismos vivos, dependendo de pesquisas científicas do remanescente dos recursos naturais, são agora assegurados preciosidades com valor inestimável, tendo o potencial de prover produtos industriais e/ou derivados com tal utilidade (Durigan *et al*., 2011).

Dos microrganismos encontrados no solo, os fungos são foco de interesse crescente, já que apresentam uma vasta gama de enzimas secretadas, as quais possuem um significativo potencial em aplicações biotecnológicas (Saha, 2003).

Pertencentes ao reino Fungi, os fungos filamentosos, mais conhecidos como mofos, são microrganismos que realizam papéis vitais em diversos ecossistemas. Compostos por estruturas filamentares chamadas hifas, tais fungos formam um complexo de redes conhecidas como micélios, que são fundamentais para a absorção de nutrientes do ambiente em que se encontram. Sua reprodução ocorre tanto de forma assexuada, por meio de esporos liberados em estruturas especializadas, quanto de forma sexuada, envolvendo a formação de esporângios. Encontrados em habitats variados, desde solo até alimentos em decomposição e ambientes aquáticos, esses organismos desempenham um papel essencial na decomposição de matéria orgânica e na reciclagem de nutrientes (Takahashi *et al*., 2017).

Os fungos filamentosos são conhecidos por sua habilidade de produzir uma variedade de enzimas celulolíticas, incluindo celulase, avicelase e β-glicosidase, essenciais no processo de decomposição de materiais celulósicos. A produção de avicelase através dos micélios de fungos filamentosos é uma área de pesquisa importante devido ao potencial dessas enzimas

em várias aplicações industriais, como na produção de biocombustíveis e na indústria de papel e celulose. A capacidade dos fungos filamentosos de produzir enzimas do complexo celulolítico, também é explorada em setores como a indústria alimentícia, onde são usadas para melhorar processos de fermentação e produção de alimentos (Orlandelli *et al*., 2012).

Considerando que os diferentes Biomas brasileiros apresentam uma extensa diversidade microbiana, este estudo visa a produção das enzimas celulolíticas avicelase e CMCase, por fungos filamentosos isolados do solo do Bioma Cerrado, pertencente a uma coleção de fungos do Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Socio Economia da Unesp, Campus de Ilha Solteira.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Energia renovável e biocombustíveis

Biocombustíveis são combustíveis derivados de biomassa renovável, como plantas, resíduos agrícolas, microrganismos e outros materiais orgânicos. Esses combustíveis são considerados renováveis porque a fonte de matéria-prima utilizada para sua produção é regenerável no curto prazo, em contraste com os combustíveis fósseis. Os biocombustíveis incluem categorias como bioetanol, biodiesel, biogás e combustíveis sintéticos (produzidos com gás de hidrogênio e dióxido de carbono, sem uso de petróleo), sendo utilizados como alternativas mais sustentáveis aos combustíveis convencionais. Os biocombustíveis exercem uma função crucial na matriz energética devido à sua capacidade de mitigar as emissões de gases do efeito estufa. A substituição de combustíveis fósseis por biocombustíveis é estimada para resultar em uma redução de aproximadamente 43% desses gases. Assim, essa transição pode contribuir para alcançar a meta estabelecida durante a reunião da COP21 na França em 2015, que visa a redução de 2°C na temperatura global (Santos *et al*., 2022).

Em relação à energia renovável, ela refere-se a fontes de energia obtidas a partir de recursos naturais que são continuamente regenerados, como a luz solar, o vento, a água em movimento, a biomassa e o calor geotérmico. Diferentemente dos combustíveis fósseis, que são finitos e não renováveis, as fontes de energia renovável são sustentáveis a longo prazo, pois são geradas a partir de processos naturais que ocorrem de forma contínua. O uso dessas fontes contribui para a redução das emissões de gases de efeito estufa e para a mitigação dos impactos ambientais associados à produção de energia (Borges *et al*., 2017).

Por mais que a pandemia tenha afetado a demanda de energia, várias usinas sucroalcooleiras continuaram a produção de bioenergia (Bloomberg, 2020). O primeiro Levantamento da Safra 2020/2021 indicou uma redução de 2% em comparação ao período

anterior, atribuída aos desafios impostos pelas medidas de distanciamento social (CONAB, 2020). Essas medidas resultaram na necessidade de redução e realocação de pessoal, levando o setor a adotar novas práticas para mitigar os impactos da crise sanitária. As metas de descarbonização para biocombustíveis, estabelecidas pela Resolução CNPE nº 15/2019, delineiam objetivos compulsórios para o Programa RenovaBio. Esse programa desempenha um papel significativo na descarbonização do setor de transporte, ao mesmo tempo em que fortalece a segurança no abastecimento de biocombustíveis.

De forma a compreender a grande demanda nacional e internacional por energia limpa e renovável, é essencial adotar medidas que controlem conflitos de natureza econômica, como a competição direta por matérias-primas e a expansão descontrolada de monoculturas para esse propósito. Com o objetivo de reduzir os impactos ambientais, a comunidade científica e tecnológica está explorando novas abordagens na produção de biocombustíveis (Zhao *et al*., 2019). Nesse contexto, fica em evidência o bioetanol de segunda geração (BE2G), um biocombustível obtido a partir de biomassa renovável lignocelulósica. Essa biomassa é composta por uma variedade de polissacarídeos e é proveniente dos subprodutos gerados no processo de produção do bioetanol de primeira geração (BE1G) (Robak *et al*., 2018).

A utilização da biomassa lignocelulósica tem o potencial de aumentar significativamente a eficiência global na produção de bioetanol por unidade de área cultivada em biorrefinarias integradas de etanol e açúcar, sem alterar a extensão total das áreas de cultivo.

Biorrefinaria teve sua definição na Farm Bill de 2002, é caracterizada por instalações que transformam biomassa em biocombustíveis, produtos químicos e eletricidade. A definição evoluiu para abranger o uso de commodities agrícolas de baixo valor, visando produzir uma gama diversificada de produtos de alto valor (Bastos, 2007; Silva, 2010; Santos; Borschiver *et al*., 2013). Seu principal propósito é obter diversos produtos através de operações que maximizam a extração de compostos desejados e minimizam a geração de resíduos. Funcionando de maneira análoga a refinarias de petróleo, a biorrefinaria utiliza matérias-primas que contribuem para a redução da poluição ambiental (National Renewable Energy Laboratory - NREL, 2004). Além disso, teoricamente, isso permite o emprego de qualquer tipo de biomassa lignocelulósica, como resíduos agrícolas, recursos florestais e resíduos municipais, como matéria-prima para a produção de bioetanol de segunda geração (BE2G) (Salomão *et al*., 2019).

2.1.1 Produção de biocombustíveis

Considerando o crescente destaque das fontes de combustíveis renováveis como possíveis substitutas dos combustíveis fósseis, é crucial tornar a implementação delas no mercado mais competitiva. No caso específico do biodiesel, uma opção é aproveitar os coprodutos de sua produção como fontes promissoras de energia. Dessa maneira, é viável reutilizar o que seria tratado como resíduo para gerar energia, resultando na redução dos custos associados aos biocombustíveis (Veroneze *et al*., 2019).

O Brasil destaca-se na promoção de fontes renováveis, especialmente na bioenergia, no que diz respeito ao etanol proveniente da cana-de-açúcar, onde o país lidera a produção mundial, e no biodiesel obtido a partir de óleos vegetais ou gorduras animais, aproveitando sua condição climática favorável. A agricultura energética é impulsionada pela intensa radiação solar ao longo do ano. O uso de recursos já destinados ao consumo, como a canola, na produção de biocombustíveis, elimina a competição com a produção de alimentos, pois não requer a redução da área cultivada. Isso contribui para uma matriz energética limpa e diversificada nacionalmente. O país possui várias vantagens para o desenvolvimento bem-sucedido de biocombustíveis, e o setor está previsto para crescer ainda mais. Cerca de 20% do consumo no setor de transportes já é proveniente de biocombustíveis, conforme o Ministério de Minas e Energia. Com o aumento dos investimentos e esforços globais para impulsionar combustíveis renováveis, o Brasil está posicionado de maneira favorável nesse cenário (Raízen, 2021; Dayrell *et al*., 2022);

No Brasil, atualmente, há duas biorrefinarias: a Granbio, localizada em São Miguel, Alagoas e a Raízen Energia - Unidade Costa Pinto, localizada em Piracicaba, São Paulo. A Granbio começou suas operações em 2014, enquanto a Raízen Energia iniciou em 2015.

A empresa brasileira Granbio é especializada na produção exclusiva de etanol de segunda geração (E2G). Trabalha desenvolvendo biotecnologia industrial para apoiar o progresso desse produto e é majoritariamente controlada pela GranInvestimentos SA. Sua planta industrial está localizada em São Miguel dos Campos, Alagoas, e a sede administrativa fica em São Paulo (SP). A Granbio tem como missão transformar biomassa em biocombustíveis, bioquímicos e materiais renováveis a partir do carbono presente em celulose e materiais lignocelulósicos (Granbio, 2020; Côrrea, 2014).

O grupo Raízen, formado pela fusão entre a Cosan e a Shell em 2011, teve sua origem na cidade de Piracicaba, São Paulo. Ao contrário da GranBio, a Raízen não se limita à produção de etanol de segunda geração; ela também destaca-se na produção, principalmente, de etanol de primeira geração, atingindo aproximadamente 2 bilhões de litros anualmente, além de cerca de 40 milhões de litros de etanol celulósico. A empresa atua em diversos

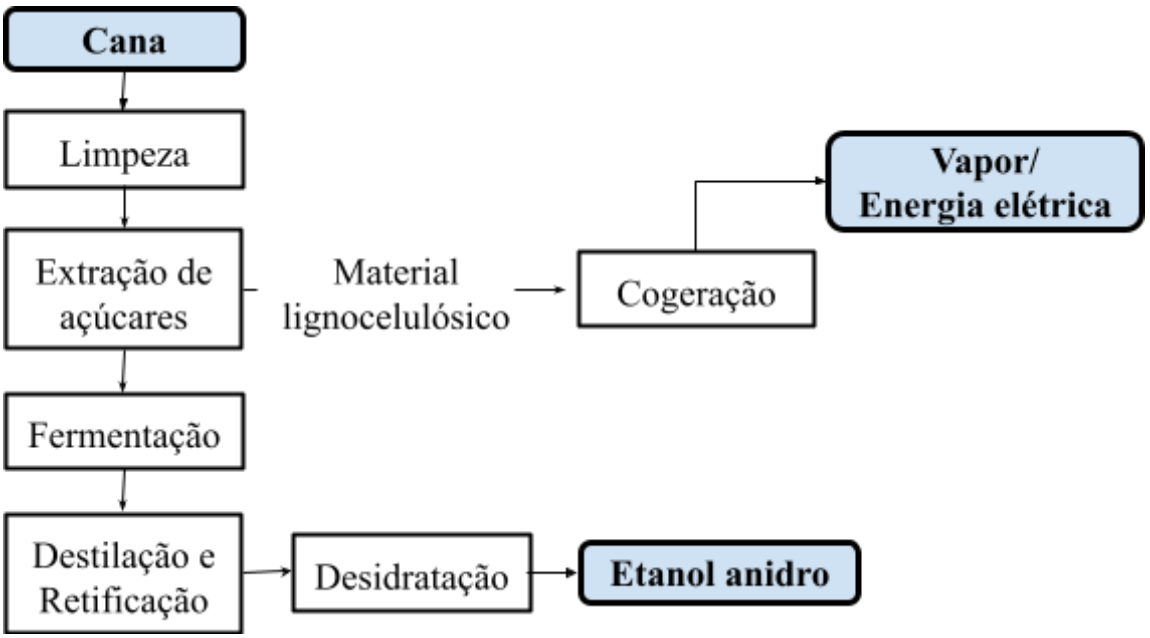
setores, incluindo produção de açúcar, bioenergia de biomassa, distribuição de combustíveis e infraestrutura. Para manter sua significativa participação no mercado de biocombustíveis e avançar no segmento de combustíveis avançados, a Raízen investe em projetos de pesquisa. Esses projetos visam aprimorar a eficiência na produção de etanol de segunda geração, expandir a infraestrutura de biorrefinarias, explorar a biodigestão de vinhaça e utilizar novas matérias-primas, como o sorgo sacarino, na produção de biocombustíveis (Lorenzi *et al*., 2019; Côrrea, 2014).

2.1.2 Etanol de 1ª e 2ª geração

A primeira geração de biocombustíveis líquidos é obtida a partir de açúcares, grãos ou sementes por meio de processos simples que envolvem etapas como recepção e limpeza da cana-de-açúcar, extração de açúcares, tratamento e concentração de suco, fermentação, destilação e desidratação. O processo convencional inicia-se com a recepção da cana na fábrica, seguida pela limpeza para remover impurezas. O tratamento e a concentração do suco são feitos, seguidos pela fermentação, na qual a glicose é convertida em etanol por leveduras. A fermentação é interrompida quando a concentração de etanol atinge cerca de 10% (v/v), evitando inibir a levedura. O processo de fermentação pode ser aeróbico ou anaeróbico, dependendo da necessidade de oxigênio durante o processo (Vohra *et al*., 2014).

Podem apresentar vantagens, como baixo consumo de recursos hídricos e terrestres por unidade de produção de energia biocombustível, além de emissões reduzidas de gases do efeito estufa (Jiao *et al*., 2018). As vantagens dessas culturas incluem alto rendimento e baixos custos de conversão, embora a sazonalidade do cultivo e seu conflito com a produção alimentar sejam desafios importantes desse método de produção (Aditiya *et al*., 2016).

Figura 1 – Fluxograma simplificado do processo de produção do etanol de primeira geração, a partir do bagaço de cana.



Fonte: Adaptado de (Dias *et al*., 2013).

Nesse cenário, surgiu a proposta de uma segunda geração de bioetanol, com ênfase na utilização de subprodutos de resíduos agrícolas e florestais como fontes de matéria-prima. Essa abordagem inovadora visa minimizar o problema de disputa entre alimentos e combustíveis (Jambo *et al*., 2016). Para a produção do etanol de segunda geração é utilizada como matéria-prima a biomassa lignocelulósica, composta principalmente de celulose, hemicelulose e lignina (Sindhu *et al*., 2016). No entanto, a complexidade dessa biomassa cria uma barreira física, conferindo resistência, rigidez e impermeabilidade, o que dificulta o acesso de microrganismos. Para transformar essa biomassa em etanol, são necessárias quatro etapas fundamentais: pré-tratamento, hidrólise enzimática, fermentação dos polímeros de açúcares em etanol e destilação. O pré-tratamento desempenha um papel crucial na conversão da matéria-prima em etanol, despolimerizando a lignocelulose. A estrutura cristalina da celulose é primordial para dificultar a hidrólise, tendo então, o pré-tratamento como redutor do grau de cristalinidade, favorecendo uma forma amorfa mais suscetível ao ataque enzimático (Rastogi *et al*., 2017).

Sendo derivado de biomassa, o etanol de segunda geração representa uma fonte mais sustentável de energia, diferente dos combustíveis fósseis, em relação à emissão de CO_2, o etanol de segunda geração, causa menor impacto ambiental (Haji-Esmaeili *et al*., 2020).

As enzimas desempenham um papel crucial ao facilitar a obtenção de fontes de carbono mais facilmente assimiláveis para o crescimento e metabolismo dos fungos. Na produção de bioetanol, a hidrólise enzimática é um estágio crítico em que carboidratos

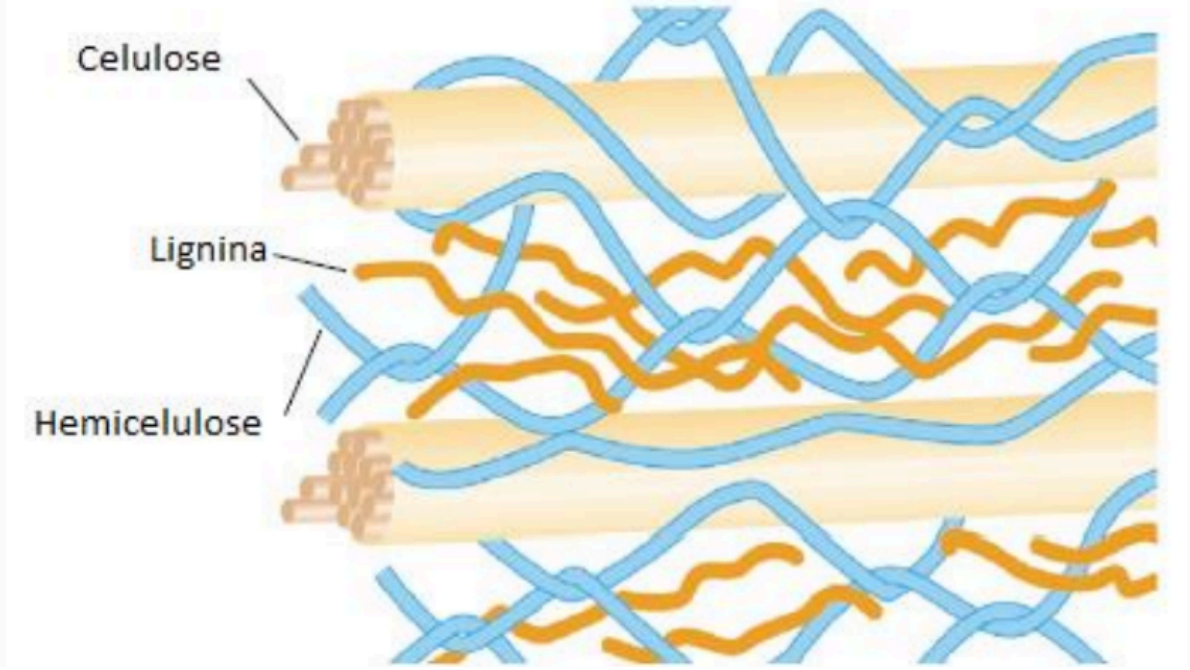
complexos são convertidos em monômeros simples. Embora o pré-tratamento biológico seja apropriado para biomassa que contém lignoceluloses, devido à eficiência das enzimas microbianas na degradação desses compostos, é conhecido que a taxa de reação enzimática é lenta e os custos são mais elevados em comparação com outros métodos (Gupta *et al*., 2015; Paudel *et al*., 2017).

2.2 Biomassa lignocelulósica

A expressão "biomassa lignocelulósica" refere-se a um tipo específico de biomassa composta principalmente por materiais lignocelulósicos. Esses materiais são derivados de fontes biológicas, como plantas, e são compostos principalmente por lignina, celulose e hemicelulose. A biomassa lignocelulósica é uma matéria-prima relevante para a produção de biocombustíveis, produtos químicos renováveis e outros materiais sustentáveis (Rubin, 2008).

A lignina é um polímero complexo que fornece rigidez às plantas, enquanto a celulose e a hemicelulose são polissacarídeos que compõem as paredes celulares das plantas (Silva, 2009). A exploração da biomassa lignocelulósica envolve processos de conversão para extrair ou transformar esses componentes em produtos úteis. Essa abordagem é significativa no contexto da busca por fontes de energia renovável e na redução da dependência de recursos fósseis (Yu, 2012).

Figura 2 – Ilustração de biomassa lignocelulósica.



Fonte: (Boudet *et al*., 2003).

2.3 Enzimas

Enzimas são conjuntos de substâncias orgânicas compostas por macromoléculas formadas pela combinação de aminoácidos. Elas desempenham funções intracelulares e também extracelulares, as quais catalisam reações químicas vitais para o metabolismo. Além disso, as enzimas apresentam um papel crucial na degradação da matéria-prima e também na deterioração de alimentos. Muitas das enzimas foram nomeadas com o uso do sufixo “ase” ao final dos nomes de seus substratos e/ou em relação a sua atividade enzimática, o que as difere de outras enzimas que foram nomeadas antes mesmo de ter o conhecimento da reação que catalisam, recebendo então, o nome de seus descobridores (Lehninger *et al*., 2014).

A estrutura primária das enzimas é determinada pela sequência específica de aminoácidos que a compõem. A estrutura secundária é o resultado da interação entre aminoácidos adjacentes, formando arranjos como a α-hélice. A estrutura terciária das enzimas é o produto das interações entre aminoácidos que estão próximos. Por fim, a estrutura quaternária é formada pela interação entre cadeias polipeptídicas, resultando na configuração tridimensional final da enzima (Júnior, 2001).

2.3.1 Nomenclatura enzimática

Tendo em vista os progressos em relação ao isolamento e identificação na descoberta de novas enzimas, foi criada então uma Comissão Internacional de Enzimas ou “Enzyme Commission (EC)”, em 1956 pela União Internacional de Bioquímica, para que assim, fosse possível facilitar e ordenar normas/padrões e evitar aleatoriedade na hora de nomear enzimas estudadas por pesquisadores distintos (Lima *et al*., 2019).

O número EC é composto por quatro partes, cada uma delas representando um nível diferente de classificação:

- Número da classe: Representa o tipo geral de reação que a enzima catalisa.
- Número da subclasse: Fornece informações mais detalhadas sobre a reação.
- Número da sub-subclasse: Refina ainda mais a descrição da reação.
- Número do registro: Um número sequencial atribuído a uma enzima específica dentro de uma sub-subclasse.

Por exemplo, As enzimas presentes no complexo celulolítico são hidrolases especializadas em quebrar ligações O-glicosídicas. A Enzyme Commission (EC) as categoriza com o código EC 3.2.1.x. A sigla "EC" refere-se à Enzyme Commission (Comissão de Enzimas); o primeiro dígito (3) identifica a classe predominante da enzima, que neste caso é a das hidrolases; o segundo dígito (2) especifica a subclasse da enzima, relacionada às

glicosilases. O terceiro dígito (1) indica a sub-subclasse, caracterizando enzimas que hidrolisam compostos O- e S-glicosil, sendo que o valor de x varia de acordo com a especificidade da celulase em questão (Voet, 2013).

Dessa forma, as enzimas foram divididas a partir da atividade catalisadora que realizam, havendo então seis classes diferentes de enzimas, sendo elas: Oxido-redutases, catalisadoras de reações de oxi-redução; Transferases, catalisadoras de transferências de grupos; Hidrolases, catalisadoras de hidrólise; Liases, catalisadoras de quebra de reações; Isomerases, catalisadoras de mudanças intramolecular e, por fim, as Ligases, catalisadoras de ligação covalente de moléculas e quebra de ligação de alta energia (Monteiro *et al*., 2009).

Tabela 1 – Classificação de enzimas e suas reações.

Classificação	Tipo de reação catalisada
1. Oxidorredutases	Reações de oxidorredução
2. Transferases	Transferência de grupos funcionais
3. Hidrolases	Reações de hidrólise
4. Liases	Eliminação de grupos para formação de ligações duplas
5. Isomerases	Isomerização
6. Ligases	Formação de ligações pelo acoplamento com hidrólise de ATP

Fonte: (Voet, 2013).

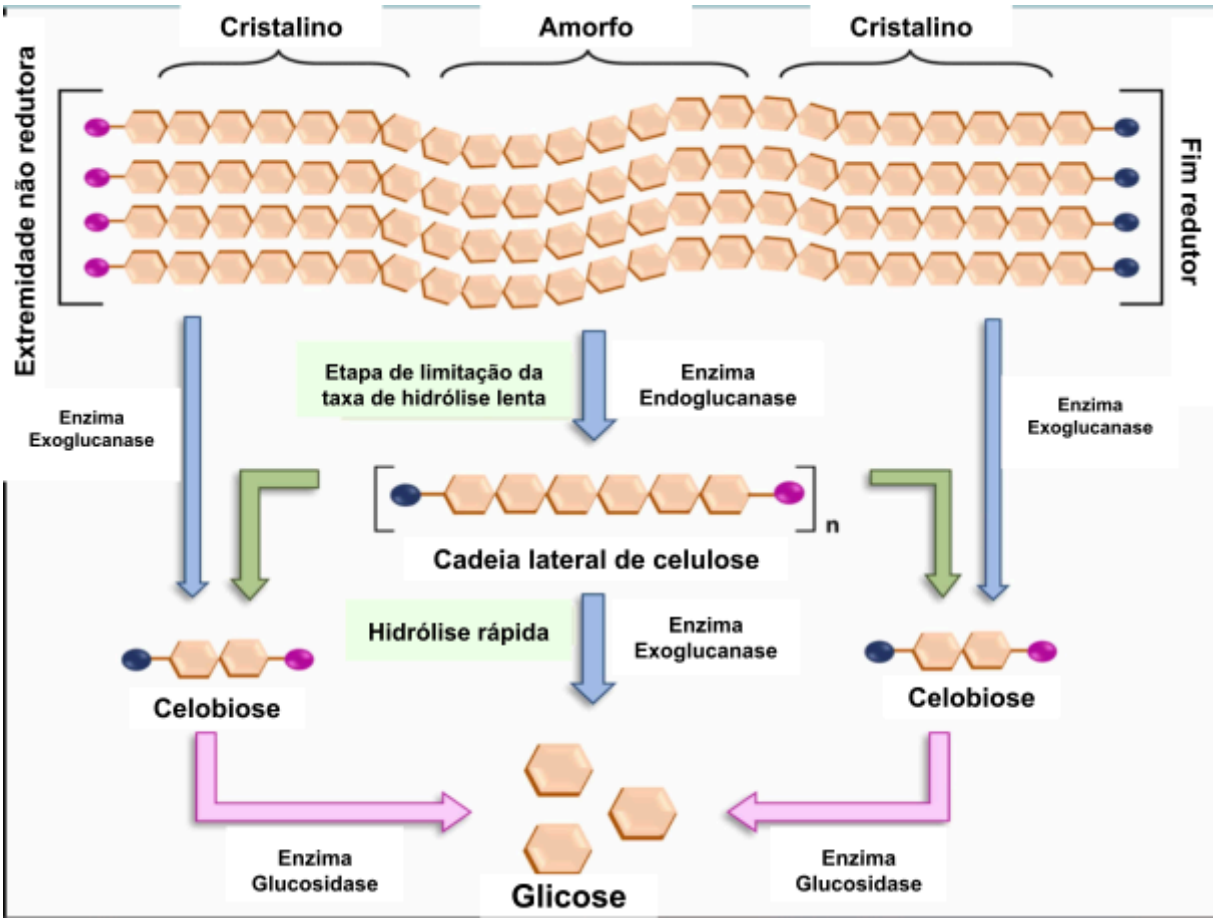
2.3.2 Enzimas celulolíticas

O conjunto de enzimas celulolíticas pertencem à classe das Hidrolases, as quais são responsáveis por catalisar reações de hidrólise enzimática da celulose. Sendo biocatalisadores de alta especificidade, essas enzimas também colaboram para a liberação de açúcares, no entanto, a glicose, por ter a aptidão de se converter em etanol, apresenta uma maior relevância e utilidade industrial.

Chamadas também de celulases, essas enzimas apresentam uma classificação dividida em três grupos compatíveis com seu local de atuação no substrato de interesse, sendo elas: Endoglucanases (EnG), que fragmentam ligações internas da fibra celulolítica; Exoglucanases (ExG), que operam na região externa da celulose; e ***β***-glicosidases (BG), que atuam hidrolisando oligossacarídeos solúveis em glicose (Castro *et al*., 2010).

As enzimas celulolíticas atuam em grupo, realizando o processo de hidrólise simultaneamente, o que evidencia um melhor desempenho do que quando o processo é realizado individualmente (Galindo, 2016).

Figura 3 – Ação sinérgica das celulases



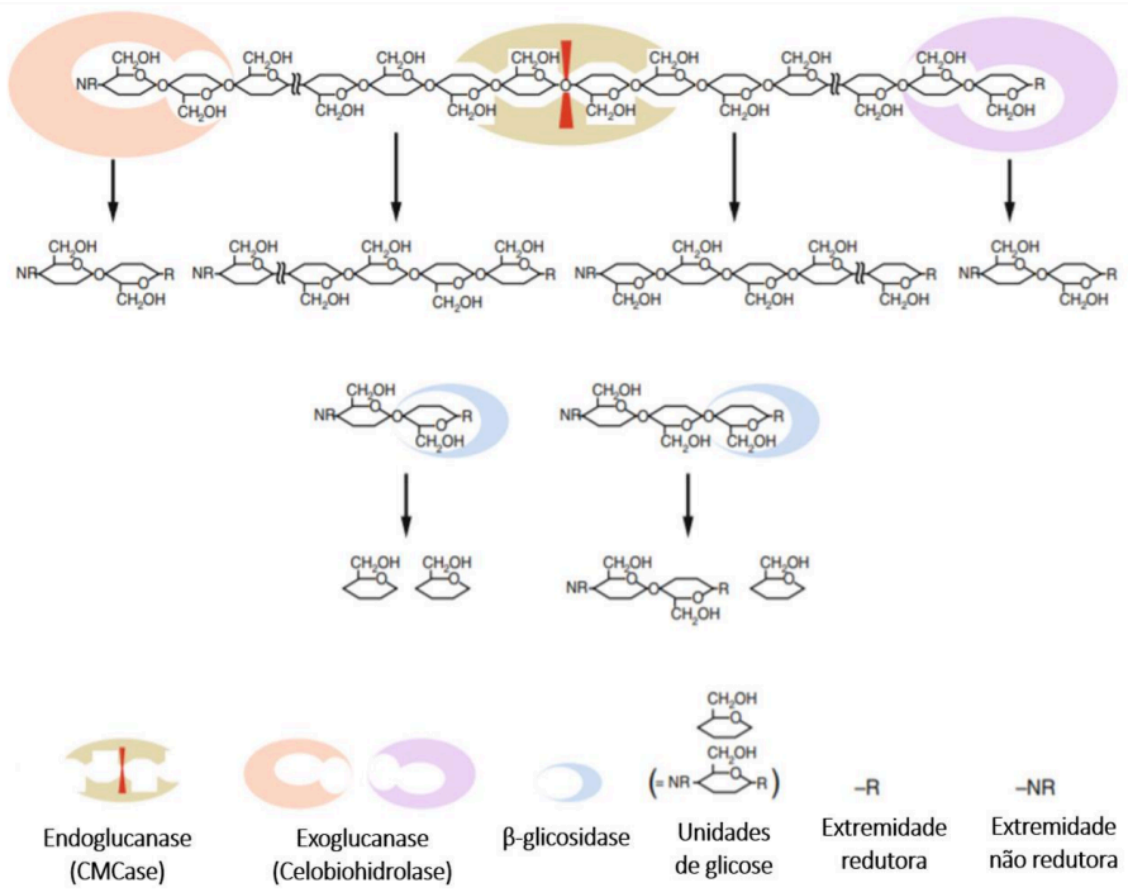
Fonte: Adaptado de (Ranjan, 2023).

2.3.3 Endoglucanases

Endo-***β***-1,4-glucanase ou como é chamada, endoglucanase (EnGases), é uma enzima celulolítica encarregada de desencadear o processo de hidrólise nas regiões internas da estrutura da fibra celulósica, acarretando na liberação de oligossacarídeos de vários graus de polimerização (GP), sendo responsável também, pela redução do grau de polimerização (GP) (Castro *et al*., 2010).

O substrato de preferência para a determinação da atividade enzimática deste grupo de enzimas por seu alto grau de polimerização e pouca cristalinidade, é a carboximetilcelulose (CMC) (Santos, 2014).

Figura 4 – Determinação de Endoglucanase - uso de carboximetilcelulose (CMCase).



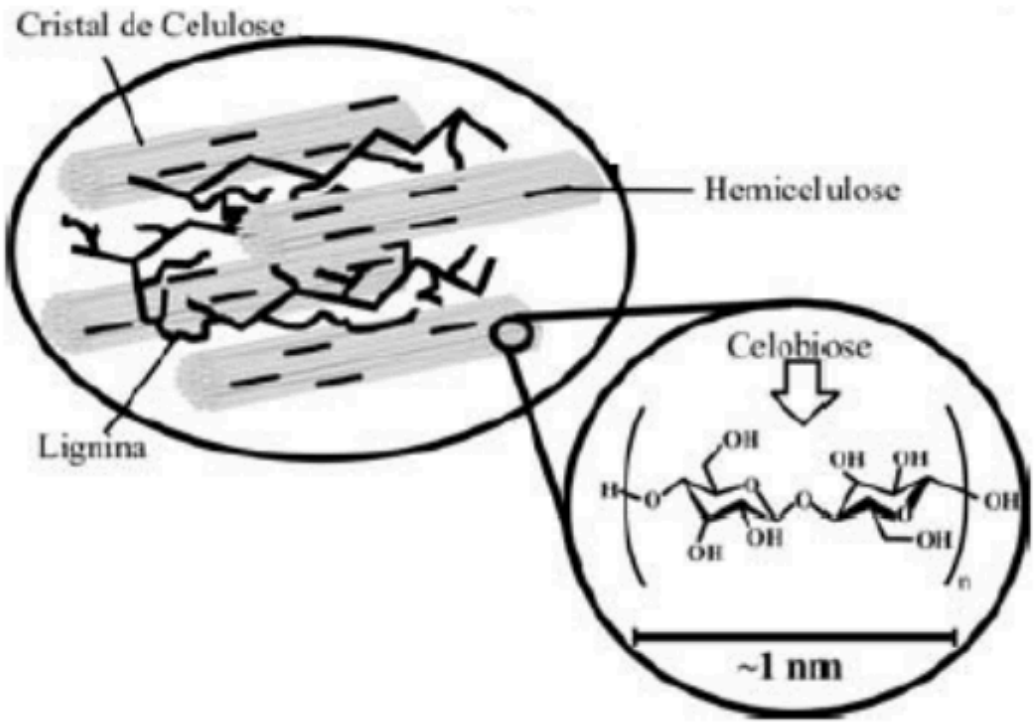
Fonte: Adaptado de (Barbosa, 2019).

2.3.4 Exoglucanases

As exoglucanases (ExGases) ou exo-***β***-1,4-glucanase, é formada por celobiohidrolase (CBH) e glucanohidrolase (GH), realizando a hidrólise da fibra celulósica, fazendo com que o polímero libere glicose (Lynd *et al*., 2002). Esta enzima libera constitutivos de celobiose, tendo sua área de atuação localizada nas extremidades da molécula de celulose microcristalina. As celobiohidrolases (CBH) atuam progressivamente, agindo nas porções redutoras e não redutoras das cadeias de celulose, liberando dois produtos principais, a glucanohidrolase e a celobiohidrolase (Cao *et al*., 2002).

O papel crucial na hidrólise primária da fibra é realizado pela celobiohidrolases (CBH), sendo responsáveis pela amorfogênese, um feito que ainda não é totalmente compreendido, que por sua vez, aumenta a taxa de hidrólise da celulose ao expor intensamente as partes cristalinas às celulases. Este processo envolve uma ruptura física do substrato, ocasionando a desestatificação das fibras devido ao aumento das regiões intersticiais (Zhang *et al*., 2004; Florencio, 2011).

Figura 5 – Determinação de Exoglucanase - Celulose Microcristalina (Avicel).



Fonte: Adaptado de (Silva *et al*., 2009).

2.3.5 β-glicosidases

O grupo das **β**-glicosidases ou como também são conhecidas, as celobiases, desempenham o papel de catalisar a hidrólise da celobiose, das celodextrinas solúveis em glicose e de alguns oligossacarídeos solúveis em glicose. Por serem capazes de reduzirem a inibição das endoglucanases e das exoglucanases, acabando aumentando o rendimento dos açúcares totais de fermentação (Pereira, 2016). Este processo se faz vantajoso pelo fato de que a celobiose não é hidrolisada por endoglucanases ou exoglucanases, o que o torna um substrato de uso para a determinação da atividade enzimática de **β**-glicosidase (Hargreaves, 2008).

2.4 Fungos filamentosos

Sendo eles um grupo diversificado de organismos, os fungos podem aparecer em forma de bolores, levedura e cogumelos, com cerca de 100.000 espécies descritas, com a possibilidade de existirem até 1,5 milhão de espécies. Distintos dos outros protistas, os fungos estão filogeneticamente relacionados aos animais. Predominantemente microscópicos e terrestres, eles habitam o solo e a matéria vegetal morta, desempenhando um papel

fundamental na mineralização do carbono orgânico. Muitos fungos são parasitas de plantas, podendo causar doenças em animais, incluindo humanos. Além disso, alguns estabelecem associações simbióticas com plantas, auxiliando na absorção de minerais do solo, enquanto outros, através da fermentação e da produção de antibióticos trazem benefícios à vida humana (Madigan *et al*., 2016).

Os fungos são classificados com base em diversas características, incluindo sua estrutura, modo de reprodução, forma de nutrição e características morfológicas. A classificação dos fungos abrange diferentes grupos, sendo os principais: Zygomycetes; Ascomycetes; Basidiomycetes; Chytridiomycetes e Glomeromycetes (Madigan *et al*., 2016).

Os Zygomycetes incluem fungos como os bolores do pão, apresentando uma reprodução sexuada que envolve a formação de zygosporos. Ascomycetes compreendem uma ampla variedade de fungos, como leveduras e bolores, com reprodução sexual ocorrendo através de estruturas chamadas ascos, que contêm esporos. No grupo dos Basidiomycetes incluem os cogumelos e muitos fungos decompositores. A reprodução sexual envolve a formação de basídios, nos quais os esporos são produzidos. Os Chytridiomycetes são fungos primitivos que frequentemente apresentam uma fase flagelada em seu ciclo de vida. Já os Glomeromycetes são um grupo de fungos micorrízicos arbusculares que formam associações simbióticas mutualísticas com as raízes de muitas plantas, as ajudando na absorção de nutrientes, especialmente fosfato, do solo, enquanto as plantas fornecem carboidratos às hifas dos fungos. Essa interação beneficia tanto os fungos quanto as plantas envolvidas, desempenhando um papel crucial nos ecossistemas terrestres (Madigan *et al*, 2016).

Fungos são organismos heterotróficos que se alimentam por absorção, pois liberam enzimas sobre diversos substratos e absorvem os nutrientes derivados da decomposição desses compostos (Moreira *et al*., 2006). Suas células são envolvidas por uma parede celular composta principalmente de quitina, armazenam glicogênio e podem exibir uma organização celular tanto unicelular quanto multicelular. Na forma multicelular, desenvolvem estruturas filamentares conhecidas como hifas, que se agrupam formando o micélio. A reprodução pode se dar de maneira assexuada, envolvendo apenas mitoses, ou sexuada, que compreende os processos de plasmogamia, cariogamia e meiose (Silveira *et al*., 2002).

Determinados grupos de fungos exibem dimorfismo em relação à sua estrutura física. Em temperaturas em torno de 25°C, assumem uma forma filamentosa, conhecida como micelial, enquanto entre 35 e 37°C adotam a forma de leveduras, caracterizadas por serem unicelulares (Nogueira *et al*., 2000). Alguns fungos desempenham o papel de saprobiontes, caracterizando-se por decompor matéria orgânica em estado de decomposição. Outros agem

como simbiontes ao associar-se a outros organismos vivos para a obtenção de nutrientes, sem prejudicar o hospedeiro, como é o caso dos liquens e das micorrizas. Por outro lado, há fungos parasitas que, ao extrair nutrientes de seus hospedeiros, causam danos. Esses fungos parasitas podem afetar diversas espécies animais, incluindo o homem, resultando em condições conhecidas como micoses. Além disso, podem parasitar plantas, causando danos significativos em cultivos agrícolas, e até mesmo outros fungos (Maia *et al*., 2010).

Os fungos, em conjunto com as bactérias, desempenham um papel fundamental na preservação da vida e na sustentação do equilíbrio da biosfera (Souza, 2006), encontrados quase que em todos os cantos do planeta, abrangendo ambientes terrestres, aquáticos e atmosféricos. Apesar da estimativa de 1,5 a 3,8 milhões de espécies fúngicas, somente uma parcela pequena, situando-se entre 5% a 13%, é atualmente reconhecida e conhecida (Kirk *et al*., 2008; Hawksworth *et al*., 2017).

2.5 Aprimoramento da produção de celulose

O êxito das aplicações de materiais celulósicos como fontes renováveis de carbono está intrinsecamente ligado ao avanço de tecnologias de processo viáveis para a fabricação de celulase. Estudos indicam que a etapa mais dispendiosa na produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica é a produção de celulase, responsável por cerca de 40% do custo total. Uma redução significativa nos custos torna-se crucial para melhorar a efetividade comercial do desempenho da celulase (Behera *et al*., 2016).

Uma estratégia eficaz para a criação de enzimas celulolíticas envolve a escolha criteriosa de microrganismos, uma concepção aprofundada da fisiologia básica desses microrganismos celulolíticos e a otimização das condições do processo de fermentação. Progressos recentes na tecnologia de DNA recombinante possibilitam a rápida identificação de novos genes de celulase, permitindo a produção em grande escala dessas enzimas e suas modificações genéticas para diversas aplicações (Behera *et al*., 2016).

2.6 Cultivo microbiano

As propriedades físico-químicas do meio de cultivo são cruciais na eficiência da produção do produto final, não só para o desenvolvimento celular (Atlas, 1997; Medigan *et al*., 2000 citado por Bon *et al*., 2008). Nos procedimentos industriais envolvendo microrganismos, é possível empregar meios de composição químicamente definidos. Nessa situação, os elementos constituintes do meio são identificados tanto qualitativa quanto

quantitativamente (European Comission, 2002; Krishna, 2005; Martins *et al*., 2005 citado por Bon *et al*., 2008).

A seleção da matéria-prima deve levar em conta características como composição adequada para promover o crescimento do microrganismo e a formação do produto desejado, além de ter um custo de obtenção reduzido e uma disponibilidade elevada. Sendo então, um dos fatores mais significativos nos custos de produção, um dos motivos para o interesse na utilização de resíduos provenientes de atividades agroindustriais ou florestais (Bon *et al*., 2008).

No âmbito do processo de produção, duas formas comuns de cultivo são o cultivo submerso, no qual os microrganismos se desenvolvem em meio líquido, e o cultivo em estado sólido, no qual o crescimento ocorre em substrato sólido, como grãos, farelos ou resíduos sólidos (Schmidell *et al*., 2001).

2.6.1 Cultivo em Estado sólido (CES)

O cultivo em meio sólido é caracterizado como um processo no qual o crescimento microbiano e a produção de produtos ocorrem na superfície de substratos sólidos, sem a presença de água livre. Comumente, os substratos empregados incluem produtos agrícolas, como por exemplo, farelo de trigo, casca de arroz, soja, milho e outros resíduos agroindustriais, o que permite uma adaptação mais eficaz do fungo (Mitchell *et al*., 2000; Pandey *et al*., 2000; Pandey *et al*., 2001; Krishna, 2005; Couto *et al*., 2006).

Este meio de cultivo oferece vantagens em relação ao Cultivo Submerso (CSm), principalmente quando se trata do cultivo de fungos filamentosos. Essa abordagem resulta em maior eficiência, produtividade aumentada e menor consumo de energia (Sánchez *et al*., 2015; Santos, 2021). A menor complexidade desse meio de cultivo, dispensa de equipamentos mais avançados, oferece baixo teor de umidade que minimiza problemas de contaminação e consumo reduzido de energia. No entanto, há desafios, como dificuldades na ampliação de escala e no controle de variáveis físico-químicas, como pH, temperatura, oxigênio e grau de mistura (Bon *et al*., 2008).

Essas alterações incluem aceleração na taxa de reação devido ao contato direto entre substrato e microrganismo, eliminação de etapas de pré-tratamento, utilização de substratos simples, redução de custos operacionais e de capital, além de ocupar menos espaço. A baixa quantidade de água empregada diminui custos de recuperação do produto, facilita a aeração e reduz problemas de contaminação. Condições semelhantes às naturais possibilitam maiores rendimentos industriais, e o produto final mais concentrado permite processos diretos de

secagem e embalagem. Apesar dessas vantagens, a fermentação em estado sólido enfrenta desafios, como dificuldades na dissipação de calor e gases, problemas na ampliação de escala do sistema e a necessidade de um controle rigoroso das condições ambientais (Schmidell *et al*., 2001).

Contudo, a pesquisa contínua busca superar essas limitações e explorar todo o potencial desse método.

2.6.2 Cultivo Submerso (CSm)

O cultivo submerso é caracterizado como um processo que ocorre em um meio composto principalmente por água e nutrientes dissolvidos nela. Essa abordagem facilita o cultivo em larga escala, assegurando a homogeneidade do meio e simplifica o controle dos parâmetros do processo. O cultivo submerso é extensivamente empregado na produção de compostos bioativos, que são secretados principalmente no caldo de cultivo. O processo em questão apresenta como vantagem, uma purificação mais simplificada do produto (Subramaniyam *et al*., 2012).

Este cultivo é amplamente utilizado na produção de diversos compostos de importância econômica, sendo aplicado em setores como indústria alimentícia, química, farmacêutica e agricultura. Como um processo metabólico, o cultivo submerso (CSm), envolve a conversão biológica de substratos com uma certa complexidade em compostos que possibilitam a obtenção de energia, incluindo os fungos, bactérias e leveduras. Nos cultivos, são sintetizados vários compostos, sejam eles metabólitos primários ou secundários, que geralmente exibem bioatividade, o que os torna essenciais para a indústria (Singh *et al*., 2017; Raimbault, 1998; Tabaraie *et al*., 2020).

2.7 Produção de celulases por fungos filamentosos

A síntese de celulase em fungos filamentosos demanda um processo de indução, sendo a celulose e seus derivados utilizados como indutores. Por mais que o Avicel seja frequentemente empregado na indução para a produção de celulase, seu custo elevado restringe sua aplicação em larga escala na produção industrial. Porém, têm se identificado culturas bioenergéticas, como farelo de trigo e palha de arroz, como indutores eficazes tanto para alguns fungos filamentosos. Ultimamente, diversas biomassas economicamente viáveis têm sido objeto de estudo visando obter os indutores ideais de celulases (Yang *et al*., 2023).

Em comparação com os indutores sólidos complexos, os solúveis demonstram uma eficiência superior na transferência de calor no fermentador e consomem menos energia.

Adicionalmente, a produção de celulase pode ser diretamente induzida em células através de indutores solúveis. A lactose, apesar de ser considerada um indutor solúvel de mais interesse, resultou em uma menor produção de celulase quando comparada à celulose (Verma *et al*., 2022; Yang *et al*., 2023).

Diversos indutores solúveis eficazes e econômicos têm sido investigados para a produção de celulase. Um exemplo é a MGD (mistura de glicose e dissacarídeo), que contém soforose de glicose gerada pela reação de transglicosilação, sendo muito empregada na fermentação de celulase (Li *et al*., 2016; Li *et al*., 2018; Li *et al*., 2022; Yang *et al*., 2023).

Contudo, a eficácia dos indutores solúveis é limitada em determinadas espécies quando comparada aos indutores insolúveis. Recentemente, foram identificados dois novos indutores, metilcelulose e 2-hidroxietilcelulose, que demonstraram estimular a produção de celulase por *P. oxalicum*. Surpreendentemente, os efeitos desses indutores na amplificação da produção de certas celulases, como a FPase, foram ainda mais pronunciados em comparação com o uso de Avicel e/ou farelo de trigo, até determinado momento. Esses resultados sugerem que a modificação do açúcar pode desempenhar um papel no processo de sinalização para induzir a biossíntese enzimática (Li *et al*., 2020; Yang *et al*., 2023).

3. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho são:

-Levantamento das características e importância das celulases divulgadas nos últimos anos;

-Analisar o potencial na produção de celulase, em fungo filamentoso isolado de solo do Bioma Cerrado.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Levantamento bibliográfico sobre celulase

Foi realizado através da base de dados disponíveis no ‘Sciece Direct’, ‘Web of Science’ e "Periódicos Capes". Foi utilizada combinações das seguintes palavras chave: celulase, filamentous fungi, fungi e solid state fermentation. A sumarização dessa etapa foi incluída no item "Revisão de literatura".

4.2. Microrganismo

Foram selecionados quatro isolados da coleção de microrganismos do Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Socio Economia da Unesp, Campus de Ilha Solteira, sob responsabilidade da Profª. Drª. Heloiza ferreira Alves do Prado. Essa seleção se deu com

base em estudos anteriores realizados com esses isolados. Sendo os isolados P2D19 identificado como *Neossartorya spinosae*, isolado 14.3 identificado como *Gongronella butleri* e os isolados 22.1 e 5.2 que não foram identificados.

4.3 Meio para reativação e manutenção

Os isolados foram transferidos para placas de Petri, contendo Ágar Dextrosado de Batata (PDA – Potato Dextrose Agar). Parte do disco micelial, mantido em criotubos, foi transferido para as placas, de forma asséptico com o auxílio de uma alça de platina. Essas placas foram incubadas na estufa tipo BOD a 30ºC por 96 horas. Após o crescimento das colônias típicas, essas, foram transferidas para tubos contendo meio PDA inclinado para manutenção da cultura e uso nos ensaios.

4.4 Cultivo em Estado sólido (CES)

Para obtenção do extrato enzimático bruto, foi adotado o cultivo em Estado Sólido (CES). Para o CES foi usado farelo de trigo como substrato, o qual foi disponibilizado em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 5 g do substrato. Em seguida, esses frascos foram esterilizados na autoclave a 121ºC, a 1 atm por 20 minutos. Após esterilização o substrato foi umedecido com 10 ml de solução salina, composta por 0,14% de $(NH_4)_2\ SO_4$ (Sulfato de Amônia); 0,20% de $K_2H\ PO_4$ (Fosfato de potássio); 0,02% de $MgSO_4.7H_2O$ (Sulfato de Magnésio hepta-hidratado) e 0,03% de uréia. O inóculo dos isolados foi realizado com 5 discos de 5 mm, os quais foram homogeneizados com o auxílio da alça de platina. Os frascos foram incubados em incubadora tipo BOD a 35ºC por 72 horas. Para obter a solução enzimática bruta, adicionou-se 45 mL de água em cada frasco, os mesmos foram homogeneizados a fim de liberar os micélios e substrato, em seguida foram submetidos à agitação em shaker a 100 ciclos por minuto em temperatura ambiente por 1 hora. Após esse período, o material foi filtrado, usando tecido sintético (voal) e em seguida centrifugado a 10.000 rcf por 10 minutos a 5ºC, resultando em uma solução límpida, que foi utilizada para fins de determinação enzimática. O cultivo foi realizado em triplicata.

4.5 Determinação de atividade enzimática

Para determinação da atividade celulolítica foi adotado o método de açúcar redutor DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico), seguindo o protocolo estabelecido por Miller em 1959.

Para a determinação da atividade de Exoglucanase 450 µl de celulose microcristalina, avicel à 0,5% (Sigma Aldrich), preparada em tampão acetato a 0,1 M em pH 5,5 foi incubada

junto com 50 µl do extrato enzimático bruto por 60 minutos em banho a 50ºC. Em seguida, foi adicionado 500 µl do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a mistura da reação, para parar a reação. A mistura foi incubada em banho de ebulição durante 10 minutos, em seguida foi resfriada em banho de gelo e adicionado 4 mL de água destilada. Após a homogeneização, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A atividade de exoglucanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de glicose por minuto, nas condições de reação, comparado a um diagrama de calibração para o padrão de glicose (0,5 a 4,4 µmol), previamente preparada.

Para a determinação da atividade de Endoglucanase 450 µl de carboximetilcelulose à 0,5% (CMC-Sigma Aldrich), preparada em tampão acetato a 0,1 M em pH 5,5 foi incubada junto com 50 µl do extrato enzimático bruto por 10 minutos em banho a 50ºC. Em seguida, foi adicionado 500 µl do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a mistura da reação, para parar a reação. A mistura foi incubada em banho de ebulição durante 10 minutos, em seguida foi resfriada em banho de gelo e adicionado 4 mL de água destilada. Após a homogeneização, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A atividade de exoglucanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de glicose por minuto, nas condições de reação, comparado a um diagrama de calibração para o padrão de glicose (0,5 a 4,4 µmol), previamente preparada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Reativação dos isolados

Os quatro isolados em estudo após reativação apresentaram crescimento em meio PDA. O crescimento em placas de Petri com PDA está ilustrado na Fig. 6, demonstrando condições de cultivo favoráveis à propagação dos mesmos.

Figura 6 – Aspecto da colônia dos fungos filamentosos. a) P2D19, b) 14.3, c) 22.1, d) 5.2

a) P2D19



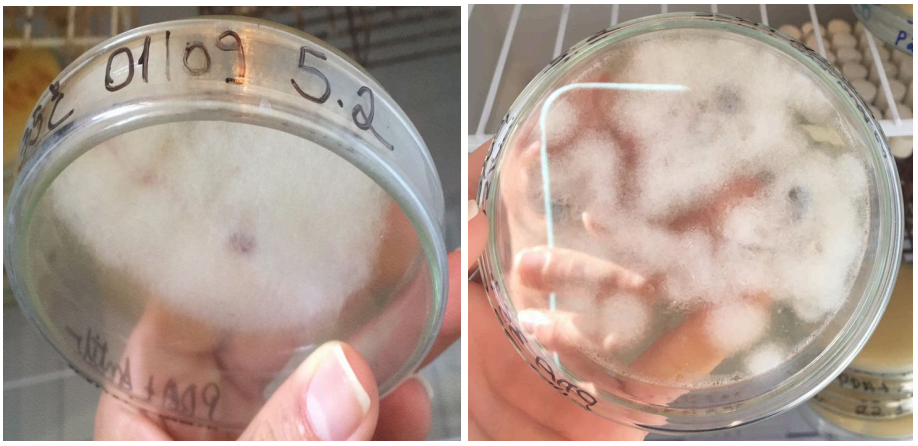
b) 14.3



c) 22.1



d) 5.2



Fonte: Próprio autor, 2023.

5.2 Cultivo em Estado Sólido

Os isolados fúngicos foram submetidos ao cultivo em estado sólido (CES), usando o farelo de trigo como substrato. Os isolados apresentaram crescimento no farelo de trigo (Fig. 7) e em 72 horas de cultivo foi possível a extração das enzimas liberadas pelos fungos.

Figura 7 – Isolados fúngicos sob Cultivo em Estado Sólido utilizando farelo de trigo como substrato, após 72 horas de cultivo. a) P2D19, b) 14.3, c) 22.1, d) 5.2

a) P2D19



b)14.3



c) 22.1



d) 5.2

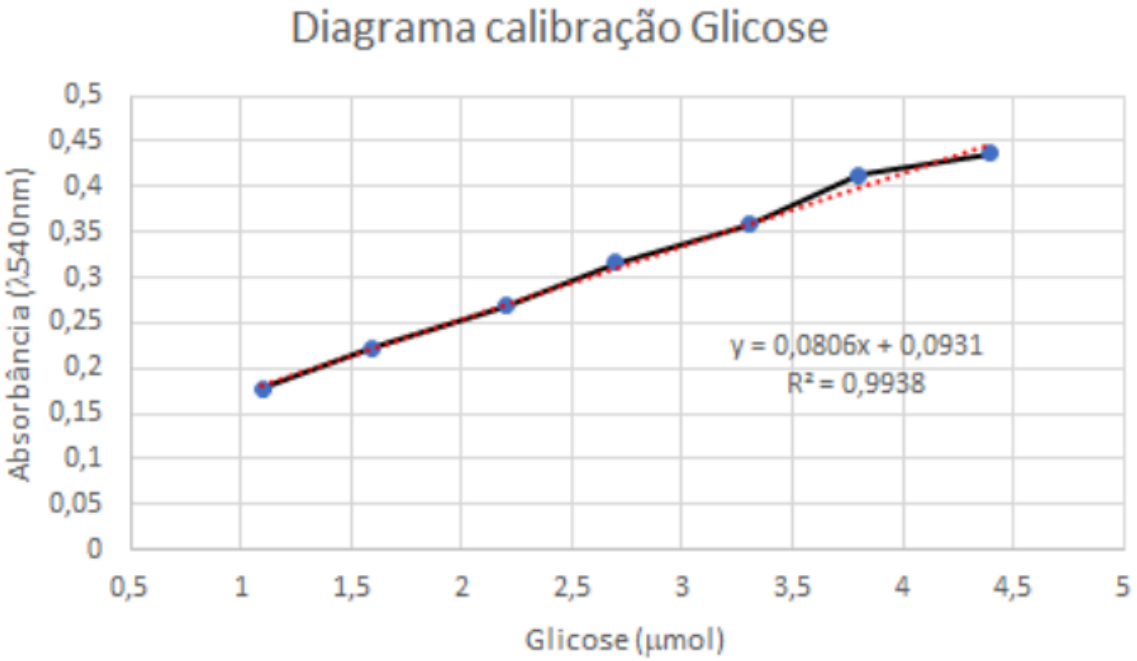


Fonte: Próprio autor, 2023.

5.3 Determinação da atividade celulolítica

Para a indicação de Unidade Internacional (UI) das enzimas, fez-se necessário a elaboração de um diagrama de calibração, usando como padrão glicose a 0,1%. A figura 8 é o diagrama de calibração ajustado para a equação de 1º grau.

Figura 8 – Diagrama de calibração para padrão de glicose, obtido pelo programa Excel.



Fonte: Próprio autor, 2023.

Os resultados das atividades de endoglucanase ou CMCase e de exoglucanase ou avicelase, encontram-se na Tabela 1.

Tabela 2 – Atividades de Endoglucanase e Exoglucanase para os isolados fúngicos, cultivados sob CES, usando farelo de trigo como substrato, após 72 horas de cultivo.

Isolados	**Endoglucanase (CMCase)**		**Exoglucanase (Avicelase)**	
	U mL^{-1}	**U g^{-1} substrato**	**U mL^{-1}**	**U g^{-1} substrato**
P2D19	1,37 ± 0,05	13,7 ± 0,52	0	0
14.3	0,21 ± 0,19	2,061 ± 1,89	0	0
22.1	1,19 ± 0,1	11,85 ± 1,05	1,36 ± 0,70	13,62 ± 7,02
5.2	1,14 ± 1,73	11,44 ± 17,31	0	0

Fonte: Próprio autor, 2023.

Foi observado que todos os isolados apresentaram atividade enzimática para endoglucanase (CMCase), tendo um melhor desempenho com os isolados P2D19 (1,37 ± 0,05

U/mL), 22.1 (1,19 ± 0,1 U/mL) e 5.2 (1,14 ± 1,73 U/mL), o isolado 14.3 (0,21 ± 0,19 U/mL) não apresentou um bom desempenho.

No entanto, para a enzima exoglucanase (avicelase) não apresentou atividade enzimática esperada, apenas o isolado 22.1 (1,36 ± 0,70 U/mL) apresentou atividade enzimática de exoglucanase. Os outros isolados fúngicos não apresentaram valores expressivos de atividade.

A produção de enzimas mostrou depender das espécies de fungos, apresentando também, certas variações. Adicionalmente, a maioria dos fungos demonstrou respostas significativamente distintas em termos de crescimento e produção de enzima CMCase. Tendo o desenvolvimento mais pronunciado nas espécies de P2D19 (*Neossartorya spinosae*), 22.1 e 5.2, e a penetração das hifas entre as partículas foi claramente evidenciada no farelo de trigo.

De acordo com Elisashvili *et al*. (2008) as disparidades observadas na produção de enzimas podem ser atribuídas a diversos fatores, incluindo a compactação do substrato, que reduz a transferência de oxigênio e calor entre as partículas; a composição dos polissacarídeos, como a quantidade de celulose e hemicelulose; a disposição desses polissacarídeos na parede celular vegetal, incluindo interações e tipos de ligações; o quanto de lignina se faz presente nos resíduos e sua interação com a celulose e hemicelulose; e a presença de compostos aromáticos nos materiais lignocelulósicos, que desempenham papel de indutores naturais na síntese e secreção de ligninases.

No estudo conduzido por Cunha *et al*. (2012), o fungo *Aspergillus niger* foi empregado para gerar CMCases a partir de bagaço de cana-de-açúcar como substrato, utilizando fermentação submersa a 32°C por 30 horas, resultando em uma produção de 1,36 U/mL. Nair *et al*. (2008) exploraram 10 cepas de *Aspergillus niger* na produção de CMCase, alcançando uma média de 1,81 U/mL ao utilizar farelo de trigo como substrato em CES. Gomathi *et al*. (2012) também obtiveram resultados semelhantes, registrando uma produção de 1,40 U/mL com *Aspergillus flavus*, utilizando farelo de trigo como substrato durante 72 horas de cultivo. Em comparação com esses estudos, o isolado P2D19 (*Neossartorya spinosae*) apresentou uma atividade de CMCase semelhante, com uma produção de 1,37 U/mL neste experimento.

Com base nas descobertas apresentadas, a pesquisa abordou a produção de enzimas, particularmente a endoglucanase (CMCase) e a exoglucanase (avicelase), por meio de diferentes isolados fúngicos. Os resultados evidenciaram que todos os isolados manifestaram atividade para a CMCase, destacando-se os isolados P2D19 (*Neossartorya spinosae*), 22.1 e

5.2 com desempenho superior, enquanto o isolado 14.3 não atingiu um nível satisfatório de produção. A avicelase, por sua vez, mostrou atividade apenas no isolado 22.1.

A dependência da produção de enzimas em relação às espécies fúngicas foi clara, revelando variações notáveis entre os isolados. Observou-se um crescimento fúngico mais robusto e uma penetração acentuada das hifas entre as partículas em determinadas espécies, especialmente evidenciada no farelo de trigo como substrato.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Aprimorar a eficiência das enzimas celulósicas é uma etapa inevitável no setor industrial. Embora tenha havido um aumento no número de cepas microbianas com alta produtividade de celulase identificadas, ainda é necessário realizar ajustes de engenharia para sua aplicação em escala industrial. À medida que nos aproximamos do rendimento máximo teórico, alcançar melhorias adicionais torna-se mais desafiador. No entanto, os esforços para aprimorar as cepas de produção estão agora direcionados para métodos mais lógicos e sistemáticos.

Em síntese, o estudo proporciona uma compreensão aprofundada da produção de enzimas por diferentes isolados fúngicos, sublinhando a complexidade das interações entre fungos, substratos e fatores ambientais durante o cultivo em estado sólido.

As conclusões deste estudo contribuem para o avanço do conhecimento nessa área e sugerem potenciais aplicações práticas na otimização de processos industriais relacionados à produção de enzimas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADITIYA, H. B. *et al*. **Second generation bioethanol production:** A critical review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 66, p. 631–653, 2016.

BASTOS, V. D. **Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias.** Rio de Janeiro: Ed. BNDES, 2007.

BEHERA, S. S. *et al*. **Solid state fermentation for production of microbial cellulases:** recent advances and improvement strategies. International journal of biological macromolecules, v. 86, p. 656-669, 2016.

BON, E. P. S. *et al*. **Bioprocessos para produção de enzimas**. In.: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. (Org.) Enzimas em biotecnologia, produção, aplicações e mercado. Cap. 5, p. 100-112. Rio de Janeiro: Interciência, 2016.

BOUDET, A. M. *et al*. **Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses.** Trends Plant Science, Oxford, v. 8, p. 576-581, 2003.

BORGES, A. C. P. *et al*. **Energias renováveis:** uma contextualização da biomassa como fonte de energia. REDE-Revista Eletrônica do Prodema, v. 10, n. 2, 2017.

Serviço Bloomberg Professional. **Crise energética à parte, empresas compram quantidades recordes de energia limpa.** Disponível em: <https://www.bloomberg.com.br/blog/crise-energetica-a-parte-empressas-copram-quantidades-recordes-de-energia-limpa/>. Acesso em: dezembro de 2023.

CAO, Y. *et al*. **Effects of cellulase on the modification of cellulose**. Carbohydrate Research, vol. 337, n. 14. pp. 1291–1296. 2002. Disponível em: <www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621502001349>. Acesso em: novembro de 2023.

CASTRO, A. M. *et al*. **Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais**. Química Nova, v. 33, n. 1, p. 181–188. 2010.

CHANDEL, A. K. *et al.* **Comparative analysis of key technologies for cellulosic ethanol production from Brazilian sugarcane bagasse at a commercial scale.** Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr, v. 13, n. 4, p. 994-1014, 2019.

CONAB-SAFRAS. **Acompanhamento da safra brasileira.** Brasília. Safra 2020/21. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>. Acesso em: dezembro de 2023.

CORRÊA, C. B. **Parcerias estratégicas tecnológicas em projetos de etanol celulósico:** oportunidades e desafios para as firmas nacionais. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Geociências. Campinas. 2014.

CUNHA, F. M. *et al*. **Sequential solid-state and submerged cultivation of Aspergillus niger on sugarcane bagasse for the production of cellulase.** Bioresource technology, v. 112, p. 270-274, 2012.

DAYRELL, G. P. *et al*. **Uso Dos Biocombustíveis No Brasil**. Universidade do Estado de Minas Gerais, Ituiutaba, Brasil. 2022.

DIAS, M. O. S. *et al*. **Biorefineries for the production of first and second generation ethanol and electricity from sugarcane.** Applied Energy, v. 109, p. 72–78. 2013.

DURIGAN, G. *et al*. **Manual para recuperação da vegetação de cerrado**. 3º ed. 2011.

ELISASHVILI, V. *et al*. **Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 35, n. 11, p. 1531-1538. 2008.

EMBRAPA: **A Embrapa nos biomas brasileiros**. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/82598/1/a-embrapa-nos-biomasbrasileiros.pdf>. Acesso em: setembro de 2023.

FLORENCIO, C. **Microrganismos produtores de celulases:** seleção de isolados de *trichoderma spp*. 2011. Dissertação (Programa de Pós-graduação em biotecnologia) - Universidade de São Carlos, São Carlos. 2011.

GALINDO, H. M. **Produção e caracterização de exoglucanases e endoglucanases de Mucorales utilizando fermentação sólida**. 57f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2016.

GOMATHI, D. *et al*. **Submerged fermentation of wheat bran by Aspergillus flavus for production and characterization of carboxy methyl cellulase.** Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, v. 2, n. 1, p. S67-S73. 2012.

GRANBIO. **Quem somos.** Online. 2020. Disponível em: <http://www.granbio.com.br/conteudos/conheca-a-granbio/>.

GUPTA, A. *et al*. **Sustainable bio-ethanol production from agro-residues:** A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 41, p. 550–567. 2015.

HARGREAVES, P. I. **Bioprospecção de novas celulases de fungos provenientes da floresta Amazônica e otimização de sua produção sobre celuligninina de bagaço de cana**. 75f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2008.

HAJI ESMAEILI, S. A. *et al*. **First-generation vs. second-generation:** A market incentives analysis for bioethanol supply chains with carbon policies. Applied Energy, v. 277, n. Jul, p. 115606. 2020.

HAWKSWORTH, D. L. *et al*. **Fungal Diversity Revisited:** 2.2 to 3.8 Million Species. Microbiol Spectr. v. 5, n. 4. 2017.

JAMBO, S. A. *et al*. **A review on third generation bioethanol feedstock.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 65, p. 756–769. 2016.

JIAO, J. *et al*. **Ethanol as a vehicle fuel in China:** A review from the perspectives of raw material resource, vehicle, and infrastructure. Journal of Cleaner Production, v. 180, p. 832–845. 2018.

JÚNIOR, G. L. S. **Produção de enzimas microbianas**. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). Biotecnologia industrial-processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgard Blücher Ltda. p.351-362. 2001.

KIRK P. M. *et al*. **Dictionary of the Fungi.** Ed. 16 CABI Publishing. 2008.

LEHNINGER, A. L. *et al*. **Princípios de bioquímica**. 6ª. Ed. p. 839. São Paulo: Sarvier. 2014.

LI, C.X. *et al*. **Weighted gene co-expression network analysis identifies critical genes for the production of cellulase and xylanase in Penicillium oxalicum.** Front Microbiol. 11, 520. 2020.

LI, Y. *et al*. **Overproduction of cellulase by Trichoderma reesei RUT C30 through batch-feeding of synthesized low-cost sugar mixture.** Bioresour Technol. 216, 503–510. 2016.

LI, Y. *et al*. **Efficient preparation of soluble inducer for cellulase production and saccharification of corn stover using in-house generated crude enzymes.** Biochemical Engineering Journal. 178, 108296. 2022.

LI, Y. H. *et al*. **Optimization of cellulolytic enzyme components through engineering Trichoderma reesei and on-site fermentation using the soluble inducer for cellulosic ethanol production from corn stover.** Biotechnol Biofuels. 11, 49. 2018.

LIMA, U. A. *et al*. Coleção de Biotecnologia Industrial. Volume 3. **Processos Fermentativos e Enzimáticos.** 2 ed. Editora Blucher. São Paulo, SP. Brasil. 2019.

LORENZI, B. R. *et al*. **Second generation ethanol in brazil:** policies and sociotechnical networks. Revista Brasileira de Ciências Sociais, v. 34, n. 100. 2019.

LYND, L. R. *et al*. **Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell. concentration in studies of microbial cellulose utilization:** analytical framework and methodological approach. Biotechnology and Bioengineering, v. 77, p. 467 - 475. 2002.

MAIA, L.C. *et al*. **Introdução: os fungos do Brasil.** In: Forzza, R. C. Catálogo de plantas e fungos do Brasil [online]. Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro. v. 1, p. 43-48. Rio de Janeiro. 2010.

MADIGAN, M. T. *et al*. **Microbiologia de Brok.** 14. ed. Porto Alegre. Artmed. 2016.

MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars**. Anal. Chemistry. v. 31, p. 426-428. 1959.

MITCHELL, D. A. *et al*. **A new developments in solid state fermentation II.** Rational approaches to the design operation and scale-up of bioreactors. Process Biochemistry. v. 35, p. 1211-1225. 2000.

MONTEIRO, V. N. *et al*. **Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática**. Revista de Processos Químicos, v.3, n.5, p. 9–23. 2009.

MORALES, M. *et al*. **Life cycle assessment of lignocellulosic bioethanol:** Environmental impacts and energy balance. Renewable & Sustainable Energy Reviews, v. 42, p. 1349- 1361. 2015.

MOREIRA, F. M. *et al*. **Microbiologia e a Bioquímica do solo.** Editora da UFLA. p. 729. 2006.

MUSSATTO, S. I. *et al*. **Technological trends, global market, and challenges of bioethanol production.** Biotechnology Advances, v. 28, n. 6, p. 817-830. 2010.

NAIR, S.G. *et al*. **Fungal xylanase production under solid state and submerged fermentation conditions.** African Journal Microbiology research, v. 2, n. 4, p. 82-86. 2008.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. **Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas.** Top value added chemicals from biomass. v. 1, 76 p. Golden. 2004.

NOGUEIRA, M. A. *et al*. **Produção de micélio externo por fungos micorrízicos arbusculares e crescimento da soja em função de doses de fósforo.** Revista Brasileira Ciência do Solo. v.24, p.329-338. 2000.

ORLANDELLI, R. C. *et al*. **Enzimas De Interesse Industrial:** Produção Por Fungos E Aplicações. SaBios: Rev. Saúde e Biol., v.7, n.3, p.97-109. 2012.

PAUDEL, S. R. *et al*. **Pretreatment of agricultural biomass for anaerobic digestion:** Current state and challenges. Bioresource Technology, v. 245, n. August, p. 1194–1205. 2017.

PEREIRA, C. B. **Avaliação da produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por fungos isolados do Cerrado, Costa Marinha Brasileira e da Antártica, utilizando casca de soja como substrato**. 116f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, Brasília. 2016.

RAÍZEN. **Biocombustíveis:** afinal, quais são as suas vantagens? 2021. Disponível em: <https://www.raizen.com.br/blog/biocombustiveis>. Acesso em: dezembro de 2023.

RANJAN, R. *et al*. **Technological road map of Cellulase:** A comprehensive outlook to structural, computational, and industrial applications. Biochemical Engineering Journal, p. 109020. 2023.

RASTOGI, M. *et al*. **Recent advances in second generation bioethanol production:** An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 80, n. May, p. 330–340. 2017.

ROBAK, K. *et al*. **Review of second generation bioethanol production from residual biomass.** Food technology and biotechnology, v. 56, n. 2, p. 174. 2018.

RUBIN, E. M. **Genomics of cellulosic biofuels.** Nature, v. 454, p. 841– 845. 2008.

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

SALOMÃO, G. S. B. *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.

SÁNCHEZ, L. B. R. *et al*. **Produção de lipase fúngica por fermentação em estado sólido**. J Bioprocess Biotech , v. 2, pág. 1-9. 2015.

SANTOS, C. T. C. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido utilizando meios de baixo custo**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana. 2021.

SANTOS, M. F. R. F. *et al*. **Iniciativas para o uso da biomassa lignocelulósica em biorrefinarias:** a plataforma sucroquímica no mundo e no Brasil. 2013.

SANTOS, J. D. F. *et al*. **Parcerias entre Brasil e Estados Unidos na promoção dos biocombustíveis para o desenvolvimento sustentável.** Espacios Públicos, v. 20, n. 49, p. 43-62. 2022.

SCHMIDELL,W. *et al*. **Biotecnologia industrial.** v. 2. Engenharia bioquímica. São Paulo. Blucher, cap. 13. 2001.

SILVA, R. *et al*. **Aplicação de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos.** Química Nova, v. 32, n. 3, p. 661-671. 2009.

SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose.** 2010. 109 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2010.

SILVEIRA, S. V. *et al*. **Efeito de fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento do abacateiro.** Pesquisa Agropecuária Brasileira. v. 37, n. 11, p. 1597-1604. Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 2002.

SINDHU, R. *et al*. **Biological pretreatment of lignocellulosic biomass - An overview.** Bioresource Technology, v. 199, p. 76–82. 2016.

SOUZA, V. C. *et al*. **Estudos sobre fungos micorrízicos.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. v.10, n.3, p. 612-618. 2006.

SUBRAMANIYAM, R. *et al*. **Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances:** a comparative study. International Journal of Science and Nature, Tamil Nadu, v. 3, n. 3, p. 480-486. 2012.

SULYMAN, A. O. *et al*. **Isolation, purification and characterization of cellulase produced by Aspergillus nigercultured on Arachis hypogaea shells**. Heliyon, v. 6. 2020.

TAKAHASHI, J. A. *et al*. **Fungos filamentosos e química:** velhos conhecidos, novos aliados. Revista virtual de química, v. 9, n. 6, p. 2351-2382. 2017.

VERMA, N. *et al*. **Influence of sugars, sugar alcohols and their combinations on environmentally significant cellulase production under liquid state fermentation.** Nature Environment and Pollution Technology. 21, 127–139. 2022.

VERONEZE, M. L. *et al*. **Production of biogas and biofertilizer using anaerobic reactors with swine manure and glycerin doses.** Journal of cleaner production, 213, 176-184. 2019.

VIDAL, M. F. **Produção e uso de biocombustíveis no Brasil.** Caderno Setorial ETENE. Banco do Nordeste do Brasil. Ano 4, n. 79. Fortaleza. 2019.

VOET, D. *et al*. **Bioquímica**; 4ª Edição. Editora Artmed, Porto Alegre, RS. 2013.

VOHRA, M. *et al*. **Bioethanol production:** Feedstock and current technologies. Journal of Environmental Chemical Engineering, v. 2, n. 1, p. 573–584. 2014.

YANG, J. *et al*. **Fungal strain improvement for efficient cellulase production and lignocellulosic biorefinery:** Current status and future prospects. Bioresource Technology, v. 385, p. 129449. 2023.

YU, Y. *et al*. **Characterization of water-soluble intermediates from slow pyrolysis of cellulose at low temperatures.** Energy Fuels, v. 26, p. 7331-7339. 2012.

ZHANG, Y. H. *et al*. **Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose:** non complexed cellulase systems. Biotechnology and Bioengineering, v. 88, p. 797 - 824. 2004.

ZHAO, X. B. *et al*. **Multi-products co-production improves the economic feasibility of cellulosic ethanol:** A case of Formiline pretreatment-based biorefining. Applied Energy, 250, p. 229-244. 2019.