



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE-UFRN  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Produção de celulases e xilanases por uma nova espécie fúngica -  
*Achaetomium lippiae* URM 7547 - utilizando a fibra de coco verde  
pré-tratada por explosão a vapor**

Beatriz de Azevedo

NATAL - RN  
2022

# Beatriz de Azevedo

Produção de celulases e xilanases por uma nova espécie fúngica - *Achaetomium lippiae* URM 7547 - utilizando a fibra do coco verde pré-tratada por explosão a vapor

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Ferreira de Souza Filho

NATAL - RN  
2022

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN  
Sistema de Bibliotecas - SISBI  
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Central Zila Mamede

Azevedo, Beatriz de.

Produção de celulases e xilanases por uma nova espécie fúngica - *Achaetomium lipppiae* URM 7547 - utilizando a fibra de coco verde pré-tratada por explosão a vapor / Beatriz de Azevedo. - 2022.

101 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação de Engenharia Química. Natal, RN, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos.

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Ferreira de Souza Filho.

1. Celulases - Dissertação. 2. Xilanases - Dissertação. 3. *Achaetomium lipppiae* URM 7547 - Dissertação. 4. Fibra de coco verde - Dissertação. 5. Pré tratamento por explosão a vapor - Dissertação. I. Santos, Everaldo Silvino dos. II. Souza Filho, Pedro Ferreira de. III. Título.

**AZEVEDO, Beatriz de.** Produção de celulasas e xilanases por uma nova espécie fúngica - *Achaetomium lippiae* URM 7547 - utilizando a fibra do coco verde pré-tratada por explosão a vapor. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Área de Concentração: Engenharia Química, Linha de Pesquisa: Processos Químicos, Catalíticos e Biotecnológicos, 2022, Natal/RN, Brasil. 101f.

**RESUMO:** Os microrganismos endófitos, que podem ser bactérias, fungos ou protozoários, são pouco estudados. Estima-se que existam mais de 250.000 diferentes espécies de plantas e um milhão de endofíticos no mundo, o que caracteriza uma média de quatro espécies associadas para cada espécie vegetal. Por estarem dentro da planta, esses microrganismos podem ser uma rica fonte de biomoléculas de interesse industrial, como é o caso da produção de enzimas hemicelulolíticas. Neste contexto, este estudo foi o primeiro a estudar a espécie fúngica endofítica *Achaetomium lippiae* URM 7547, tendo por objetivo avaliar a produção de celulasas e xilanases em fermentação submersa (FSm) utilizando como substrato a fibra da casca de coco verde pré-tratada por explosão a vapor. Inicialmente avaliou-se o potencial de *A. lippiae* URM 7547 em produzir hidrolases (amilase, lipase, protease, celulase, xilanase e pectinase) em meios de cultivo sólido (72 h a 30 °C) com substratos indutores específicos. Como controle, para comparação de resultados, utilizou-se o crescimento do fungo *Thricoderma reesei* CCT 2768 sob mesmas condições de indução. *A. lippiae* URM 7547 apresentou-se como um potencial produtor de amilases, proteases e celulasas, com um índice enzimático (IE) maior que 1,5, assim como o *T. reesei* CCT 2768. Quantificou-se também o rendimento de conversão de substrato em biomassa celular ( $Y_{x/s}$ ) de *A. lippiae* URM 7547 e sua velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) em meio líquido contendo glicose ou xilose em três concentrações e meios nutrientes com fontes de minerais e nitrogênio variadas com o intuito de verificar se o fungo é adepto a cultivos submersos e qual a melhor condição para seu crescimento. Os melhores resultados para o meio líquido contendo glicose foi em 96 h de cultivo no meio contendo peptona e extrato de levedura, com  $Y_{x/s}$  iguais a  $0,062 \pm 0,04 \text{ g.g}^{-1}$ ,  $0,072 \pm 0,04 \text{ g.g}^{-1}$ , e  $0,076 \pm 0,03 \text{ g.g}^{-1}$ , para as concentrações iniciais de 5, 10 e 20  $\text{g.L}^{-1}$  de açúcar, respectivamente. Para o meio contendo xilose, o melhor resultado foi durante 144 h de cultivo, com valores de  $Y_{x/s}$  iguais a  $0,52 \pm 0,08 \text{ g.g}^{-1}$ ,  $0,59 \pm 0,09 \text{ g.g}^{-1}$  e  $0,65 \pm 0,03 \text{ g.g}^{-1}$  para 5, 10 e 20  $\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente, no mesmo meio contendo peptona e extrato de levedura. Por fim, conduziu-se o pré-tratamento da biomassa de coco verde e a FSm para produção de celulasas e xilanases. A caracterização lignocelulósica da fibra de coco verde *in natura* e após o pré-tratamento por explosão a vapor indicou que houve uma diminuição de 14% de extraíveis na fibra pré-tratada em relação à fibra *in natura*, visto esses materiais serem de fácil remoção por solventes. Houve ainda um aumento em 8% no teor de celulose e uma diminuição de 6% de hemicelulose, enquanto a lignina permaneceu estatisticamente igual ( $p > 0,05$ ). Na FSm, as condições de 33 °C, concentração inicial de esporos de  $10^9 \text{ mL}^{-1}$ , e 30,0  $\text{g.L}^{-1}$  de biomassa pré-tratada foram as que levaram a um melhor rendimento com relação às quatro enzimas quantificadas, com atividades enzimáticas ( $\text{U.mL}^{-1}$ ) de  $0,41 \pm 0,06$ ,  $5,94 \pm 0,31$ ,  $0,08 \pm 0,03$  e  $9,12 \pm 0,28$  para FPase, CMCase, celobiase e xilanase, respectivamente. Por fim, *A. lippiae* URM 7547 demonstrou ser um bom produtor de celulasas e xilanases, além de outras enzimas hidrolíticas como é o caso de amilases e proteases, com um ótimo rendimento de crescimento em meios submersos.

**Palavras-chave:** Fungo endofítico, fibra do coco verde, fermentação submersa, celulasas, xilanases, explosão a vapor.

**AZEVEDO, Beatriz de.** Production of cellulases and xylanases by a new fungal species – *Achaetomium lippiae* URM 7547 – using green coconut fiber pre-treated by steam explosion. Graduate Program in Chemical Engineering. Area: Chemical Engineering, research theme: Chemical, Catalytic and Biotechnological Processes, 2022, Natal/RN, Brazil. 101 p.

**ABSTRACT:** Endophytic microorganisms, which can be bacteria, fungi or protozoa, are poorly studied. It is estimated that there are more than 250,000 different species of plants and one million endophytes in the world, which characterizes an average of four associated species for each plant species. Because they are inside the plant, these microorganisms can be a rich source of biomolecules of industrial interest, such as the production of hemicellulolytic enzymes. In this context, this study was the first to study the endophytic fungal species *Achaetomium lippiae* URM 7547, with the objective of evaluating the production of cellulases and xylanases in submerged fermentation (FSm) using the fiber of pre-treated blast-treated green coconut husk as a substrate. Initially, the potential of *A. lippiae* URM 7547 to produce hydrolases (amylase, lipase, protease, cellulase, xylanase and pectinase) in solid culture media (72 h at 30 °C) with specific inducing substrates was evaluated. As a control, for comparison of results, growth of the fungus *Thricoderma reesei* CCT 2768 was used under the same induction conditions. *A. lippiae* URM 7547 presented itself as a potential producer of amylases, proteases and cellulases, with an enzyme index (IE) greater than 1.5, as well as *T. reesei* CCT 2768. The yield of substrate conversion into cell biomass ( $Y_{x/s}$ ) of *A. lippiae* URM 7547 and its maximum growth rate ( $\mu_{max}$ ) in liquid medium containing glucose or xylose in three concentrations and nutrient medium with mineral sources were also quantified. and nitrogen in order to verify if the fungus is adept to submerged crops and what is the best condition for its growth. The best results for the liquid medium containing glucose were at 96 h of culture in the medium containing peptone and yeast extract, with  $Y_{x/s}$  equal to  $0.062 \pm 0.04 \text{ g.g}^{-1}$ ,  $0.072 \pm 0.04 \text{ g.g}^{-1}$ , and  $0.076 \pm 0.03 \text{ g.g}^{-1}$ , for the initial concentrations of 5, 10 and 20  $\text{g.L}^{-1}$  of sugar, respectively. For the medium containing xylose, the best result was during 144 h of cultivation, with  $Y_{x/s}$  values equal to  $0.52 \pm 0.08 \text{ g.g}^{-1}$ ,  $0.59 \pm 0.09 \text{ g.g}^{-1}$  and  $0.65 \pm 0.03 \text{ g.g}^{-1}$  to 5, 10 and 20  $\text{g.L}^{-1}$ , respectively, in the same medium containing peptone and yeast extract. Finally, the pre-treatment of green coconut biomass and FSm were carried out for the production of cellulases and xylanases. The lignocellulosic characterization of green coconut fiber in natura and after pre-treatment by steam explosion indicated that there was a 14% decrease in extractables in the pre-treated fiber in relation to in natura fiber, since these materials are easily removed by solvents. There was also an 8% increase in cellulose content and a 6% decrease in hemicellulose, while lignin remained statistically the same ( $p > 0.05$ ). In FSm, the conditions of 33 °C, initial concentration of  $10^9 \text{ spores.mL}^{-1}$ , and 30.0  $\text{g.L}^{-1}$  of pre-treated biomass were the ones that led to a better yield in relation to the four quantified enzymes, with enzymatic activities ( $\text{U.mL}^{-1}$ ) of  $0.41 \pm 0.06$ ,  $5.94 \pm 0.31$ ,  $0.08 \pm 0.03$  and  $9.12 \pm 0.28$  for FPase, CMCase, cellobiase and xylanase, respectively. Finally, *A. lippiae* URM 7547 proved to be a good producer of cellulases and xylanases, in addition to other hydrolytic enzymes such as amylases and proteases, with an excellent growth performance in submerged media.

**Keywords:** Endophytic fungus, green coconut fiber, submerged fermentation, cellulases, xylanases, steam explosion.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS .....	10
LISTA DE QUADROS.....	11
1 Introdução.....	13
2 Objetivos .....	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 Revisão Bibliográfica .....	19
3.1 Microrganismos endofíticos: Origem e caracterização.....	19
3.1.1 Bioativos produzidos por fungos endofíticos.....	21
3.1.2 Gêneros <i>Chaetomium</i> e <i>Achaetomium</i> .....	23
3.2 Biomassa lignocelulósica .....	25
3.2.1 Celulose .....	27
3.2.2 Hemicelulose.....	27
3.2.3 Lignina .....	29
3.3 Pré-tratamentos de biomassa lignocelulósica.....	30
3.3.1 Pré-tratamento por explosão a vapor .....	32
3.4 Produção de celulasas e xilanasas por via microbiana .....	34
3.4.1 Celulasas.....	34
3.4.2 Hemicelulasas .....	37
3.5 Estrutura, composição e relevância econômica do coco ( <i>Cocos nucifera l.</i> )..	40
4 Material e Métodos.....	44
4.1 Microrganismo e manutenção .....	44
4.1.1 Repique em sabugo de milho .....	45
4.2 Determinação do potencial do <i>A. lippii</i> na produção de enzimas hidrolíticas	46
4.2.1 Meios para indução enzimática .....	46
4.2.2 Cálculo do Índice Enzimático (IE) .....	47
4.3 Avaliação inicial do crescimento do <i>A. lippii</i> URM-7547 em meio líquido.	47
4.3.1 Determinação da massa celular seca .....	49
4.3.2 Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) e fator de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}$ ).....	49
4.4 Obtenção e Preparo da Matéria-Prima.....	50

4.5	Pré-tratamento com explosão a vapor .....	50
4.6	Caracterização lignocelulósica .....	51
4.6.1	Umidade .....	51
4.6.2	Cinzas .....	52
4.6.3	Extraíveis .....	52
4.6.4	Determinação de polissacarídeos e lignina .....	53
4.6.4.1	Lignina .....	53
4.6.4.2	Determinação de concentração de celulose e hemicelulose .....	54
4.7	Cultivos submersos para a produção de celulases e xilanases por <i>A. lipppiae</i> URM-7547 utilizando como substrato a fibra de coco pré-tratada por explosão a vapor	55
4.7.1	Preparo do inóculo .....	55
4.7.2	Avaliação da produção de celulases e xilanase por <i>A. lipppiae</i> URM-7547 utilizando como substrato a fibra de coco pré-tratada por explosão a vapor.....	56
4.8	Determinação das Atividades Enzimáticas .....	57
4.8.1	Celulases Totais (FPase).....	58
4.8.2	Endoglucanase (CMCase) .....	59
4.8.3	Celobiase .....	59
4.8.4	Xilanase .....	60
4.9	Análise estatística.....	61
5	Resultados e discussão .....	63
5.1	Avaliação do potencial do <i>Achaetomium lipppiae</i> URM-7547 na produção de enzimas hidrolíticas .....	63
5.1.1	Produção de enzimas hidrolíticas em meio sólido.....	63
5.2	Avaliação dos parâmetros cinéticos do <i>A. lipppiae</i> URM-7547 em meio líquido	66
5.3	Caracterização lignocelulósica .....	74
5.4	Avaliação da produção de celulases e xilanase da fermentação submersa (FSm)	77
6	Conclusões.....	84
	Referências .....	87

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formas de transmissão da planta hospedeira pelo fungo endofítico. ....	20
Figura 2 - Classificação do novo fungo endofítico <i>Achaetomium lippiae</i> . ....	24
Figura 3 - Imagens microscópicas do <i>Achaetomium lippiae</i> , do micélio ao esporo. ....	25
Figura 4 - Estrutura do material lignocelulósico. ....	26
Figura 5 – Representação esquemática da molécula de celulose. ....	27
Figura 6 – Representação esquemática da hemicelulose. ....	28
Figura 7 – Representação esquemática da lignina. ....	29
Figura 8 - Biomassa lignocelulósica sujeita ao pré-tratamento. ....	30
Figura 9 – Ação das celulasas sobre a molécula de celulose. ....	36
Figura 10-Representação sistemática da ação das xilanases. ....	38
Figura 11 - Efeito de diferentes resíduos agrícolas na produção de xilanase por <i>C. globosum</i> . ....	39
Figura 12 - Efeito de diferentes valores de pH na produção da xilanase bruta (U/mL). ..	39
Figura 13 – Ilustração da estrutura do coco. ....	41
Figura 14 – Aspecto macroscópico de <i>A. lippiae</i> URM 7547 após cultivo em meio BDA a 30 °C. ....	44
Figura 15 - Incubação do <i>A. lippiae</i> URM 7547 em sabugo de milho a 30 °C. A) Primeiro dia de incubação. B) Esporos crescidos após cinco dias de incubação. ....	45
Figura 17 – Imagem microscópica do <i>Achaetomium lippiae</i> URM – 7547 na câmara de Neubauer. ....	55
Figura 17 – Cultivo do <i>A. lippiae</i> URM 7547 em placas de Petri para avaliação do índice enzimático. a) amilase, b) lipase, c) protease, d) celulase, e) xilanase e f) pectinase. ....	64
Figura 18 – Cultivo do <i>T. reesei</i> CCT-2768 em placas de Petri para avaliação do índice enzimático. a) amilase, b) lipase, c) protease, d) celulase, e) xilanase e f) pectinase. ....	64
Figura 19 – Crescimento de biomassa celular em meio salino (tipo 3) a 30 °C contendo glicose (a) e xilose (b) em 120 h de cinética. ....	67
Figura 20 - Concentrações de substrato (S) e de biomassa celular (X) de <i>A. lippiae</i> URM-7547, em função do tempo de cultivo com meios salinos diferentes e açúcares na concentração inicial de 5g/L. A) Glicose B) Xilose ....	68
Figura 21 - Concentrações de substrato (S) e de biomassa celular (X) de <i>A. lippiae</i> URM-7547, em função do tempo de cultivo com meios salinos diferentes e açúcares na concentração inicial de 10 g/L. A) Glicose B) Xilose ....	68
Figura 22 - Concentrações de substrato (S) e de biomassa celular (X) de <i>A. lippiae</i> URM-7547, em função do tempo de cultivo com meios salinos diferentes e açúcares na concentração inicial de 20 g/L. A) Glicose B) Xilose ....	68
Figura 23 - Fibra de coco verde in natura (a) e após pré-tratamento com explosão a vapor (b). ....	74
Figura 24 – Perfis cinéticos de produção de FPase pelo fungo <i>A. lippiae</i> URM-7547 em fermentação submersa utilizando como substrato fibra de coco verde pré-tratada em explosão a vapor. ....	77

Figura 25 – Perfis cinéticos de produção de CMCase pelo fungo <i>A. lippliae</i> URM-7547 em fermentação submersa utilizando como substrato fibra de coco verde pré-tratada em explosão a vapor.....	78
Figura 26 – Perfis cinéticos de produção de celobiase pelo fungo <i>A. lippliae</i> URM-7547 em fermentação submersa utilizando como substrato fibra de coco verde pré-tratada em explosão a vapor.....	78
Figura 27 – Perfis cinéticos de produção de xilanase pelo fungo <i>A. lippliae</i> URM-7547 em fermentação submersa utilizando como substrato fibra de coco verde pré-tratada em explosão a vapor.....	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Meios para incubação do <i>A. lipppiae</i> URM-7547 a 30 °C usados nos experimentos. ....	48
Tabela 2 – Experimentos para definição do melhor meio de cultivo líquido para produção (biomassa) do fungo <i>A. lipppiae</i> URM-7547. ....	48
Tabela 3-Componentes precursores da celulose (C) e hemicelulose (H) e seus respectivos valores de conversão. ....	54
Tabela 5 - Ensaio para a produção de celulasas e xilanase por <i>A. lipppiae</i> URM-7547 utilizando como substrato a fibra de coco pré-tratada por explosão a vapor .....	57
Tabela 5 - Produção de enzimas hidrolíticas avaliados pelo Índice Enzimático.....	65
Tabela 6 – Valores de $X_{máx}$ , $S_{Xmáx}$ , $\mu_{máx}$ e $Y_{x/s}$ , obtidos nos experimentos para avaliação do meio de cultivo e concentração de glicose. ....	70
Tabela 7 – Valores de $X_{máx}$ , $S_{Xmáx}$ , $\mu_{máx}$ e $Y_{x/s}$ , obtidos nos experimentos para avaliação do meio de cultivo e concentração de xilose.....	73
Tabela 8 – Composição química da fibra da casca do coco verde <i>in natura</i> e pré-tratada por explosão a vapor (10 min a 210 °C). Valores em base seca, exceto a umidade. ....	75
Tabela 9 – Atividade enzimática máxima de FPase, CMCase, celobiase e xilanase produzida por <i>A. lipppiae</i> URM-7547 em cultivo submerso variando-se as condições iniciais de temperatura (°C), concentração de inóculo (esporos/mL) e concentração de substrato (g/L). ....	80

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos e suas plantas hospedeiras. ....	21
Quadro 2 - Exemplos de enzimas produzidas por fungos endofíticos com aplicação industrial.....	23
Quadro 3 - Vantagens e desvantagens dos principais métodos de pré-tratamento.....	32

---

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUÇÃO**

---

# 1 Introdução

*Neste capítulo são abordados os aspectos gerais relacionados a este trabalho, introduzindo a importância da temática proposta nesta dissertação, considerando um contexto científico e tecnológico.*

A produção de enzimas a partir de microrganismos possui ampla aplicação industrial e sua demanda aumenta a cada dia, pois essas biomoléculas são mais seletivas e eficientes do que os catalisadores químicos. Elas podem atuar como catalisadoras em processos bioquímicos, na decomposição de moléculas complexas em unidades menores, na degradação de matéria orgânica para origem de novos produtos, na deterioração de alimentos, na indústria de fármacos, dentre outros (RIGO *et al.*, 2021; QUEIROZ *et al.*, 2020).

O mercado global de enzimas industriais foi estimado em cerca de US\$ 2 bilhões em 2004, em 2010 o valor estimado subiu para US\$ 3,3 bilhões, enquanto em 2017 alcançou os US\$ 7 bilhões, devendo chegar a 10,5 bilhões dólares em 2024, o que representa uma taxa de crescimento anual de 5,7 % de 2018 a 2024 (CERQUEIRA, 2021; BCC Research, 2018). Em 2021, com o desaquecimento da economia devido à pandemia de coronavírus, a estimativa foi de US\$ 6,32 bilhões, sendo liderado pelo segmento de alimentos com cerca de US\$ 1,89 bilhões, segundo a BCC Research – Market Forecasting (OLIVEIRA *et al.*, 2021; BCC Research, 2020).

Segundo Araújo *et al.*, (2021), as enzimas são preferidas como biocatalisadoras em processos industriais devido ao seu alto grau de especificidade, seletividade e parâmetros operacionais robustos. No entanto, são compostos caros e isso estimula a bioprospecção por novas espécies produtoras, bem como a investigação de estratégias de cultivo e produção para obter novas enzimas com especificidades diversas e que possam ser produzidas a um custo menor. Destaca-se que as lignocelulósicas (celulases, xilanases e ligninases), lipases, pectinases e proteases estão entre as principais hidrolases com aplicação industrial (OLIVEIRA, 2019a).

O rápido crescimento dos microrganismos e da facilidade de manipulação genética despertou, em segmentos industriais e comerciais, o desenvolvimento de pesquisas de produção enzimática por vias microbianas. Dentre fungos e bactérias produtores de enzimas, destacam-

se os filamentosos de podridão branca, com uma receita de produção, na última década, de US\$ 8 bilhões (FRAGA *et al.*, 2021). Em 2017, estimou-se que cerca de 70% da participação no mercado enzimático foi detida por microrganismos fúngicos, com destaque, segundo Rigo *et al.*, (2021), para cepas mutantes de *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* e *Penicillium sp.* O aumento da demanda por enzimas se deve a sua ampla variedade de usos na indústria de alimentos, rações, farmacêutica, têxtil e de biocombustíveis, na produção, principalmente, de etanol de segunda geração.

Provenientes das interações metabólicas que ocorrem entre o fungo e a espécie vegetal, por estarem presentes em seu interior, os fungos endofíticos filamentosos se destacam pela quantidade de produtos naturais que fornecem propriedades bioativas e metabólitos secundários (KUSARI *et al.*, 2012). Assim, as espécies fúngicas endofíticas apresentam-se com potencial elevado para produção de biocompostos, destacando-se a produção de substâncias com potencial farmacológico, agrícola e enzimático (FELIX, 2019).

Segundo Salazar *et al.*, (2019), os resíduos agroindustriais se destacam como substratos ideais para a fermentação microbiana, devido a sua riqueza orgânica, baixo custo e ampla disponibilidade. Resíduos agrícolas vindos da produção de arroz, trigo, água de coco, sementes oleaginosas e grãos estão entre os mais abundantes subprodutos no mundo. Além disso, seu uso apresenta um melhor balanço energético e um menor impacto ambiental do que substratos puros (RIGO *et al.*, 2021).

Dentre as aplicações das enzimas lignocelulolíticas destaca-se, pela relevância, a produção de etanol de segunda geração. O etanol de primeira geração, produto de destaque no mercado nacional sendo produzido ao se utilizar o caldo da cana-de-açúcar ou o melaço, gera como resíduo a parte fibrosa da cana-de-açúcar constituída por polímeros como celulose e hemicelulose. Este resíduo, bem como outras partes da própria cana-de-açúcar como as folhas e também outras biomassas lignocelulósicas, pode ser utilizado na produção do etanol de segunda geração (TAVARES, 2019). Nesse contexto, um dos resíduos que o grupo de Engenharia de Bioprocessos do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) vem estudando para a produção de celulases e de etanol de segunda geração é a fibra de coco. Destaca-se ainda que o Brasil é o quarto maior produtor de coco verde do mundo, produzindo mais de 2 bilhões de unidades por ano (FAO, 2020). Embora importantes produtos sejam disponibilizados no mercado para a sociedade, como a água-de-coco e o leite de coco, surge o problema da destinação final da casca, havendo uma elevada produção de resíduos decorrente desta atividade. Assim, a utilização desses

## Introdução

materiais para a produção de produtos com maior valor agregado, como enzimas, tem sua importância. Além disso, destaca-se que, para produção de etanol de segunda geração, um dos fatores fundamentais para que o mesmo seja viável comercialmente baseia-se na redução do custo de produção das enzimas lignocelulolíticas (NOGUEIRA, 2017; TAVARES, 2019; SILVA *et al.*, 2019).

Assim, diante da constante busca por novas soluções para produzir enzimas lignocelulolíticas, o presente estudo avaliou o potencial do novo fungo endofítico *Achaetomium lippiae* URM-7547 quanto à capacidade de crescimento em meio submerso e de produzir celulases e xilanases usando como substrato a fibra da casca do coco verde pré-tratada por explosão a vapor.

A presente dissertação está dividida em sete capítulos. O atual capítulo consiste na introdução, no qual apresenta a importância do estudo e sua motivação. O capítulo 2 apresenta os objetivos geral e específicos da pesquisa. O Capítulo 3 refere-se à revisão bibliográfica, na qual abordam-se os aspectos teóricos relacionados ao tema proposto. O Capítulo 4 aborda a metodologia experimental utilizada. No Capítulo 5, apresentam-se os resultados e a discussão destes. No Capítulo 6, são apresentadas as principais conclusões do estudo. Finalizando, no Capítulo 7, são relacionadas todas as referências consultadas e citadas para elaboração dessa dissertação.

---

## **CAPÍTULO II**

### **OBJETIVOS**

---

## 2 Objetivos

*Neste capítulo são abordados os objetivos gerais e específicos desta dissertação.*

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de produção de celulasas e xilanases por cultivo submerso de novo fungo endofítico *Achaetomium lippiae* URM-7547 utilizando como substrato a fibra da casca do coco verde pré-tratada por explosão a vapor.

### 2.2 Objetivos específicos

- Identificar o potencial de *A. lippiae* URM 7547 na produção das enzimas hidrolíticas (amilase, lipase, protease, celulase, xilanase e pectinase) através da indução em meio sólido e comparar com a cepa já conhecida *Trichoderma reesei* CCT 2768;
- Avaliar a cinética de crescimento em meio líquido de *A. lippiae* URM 7547 em função do meio salino e da concentração de açúcares (glicose e xilose) em termos da produção de biomassa, consumo de açúcar e variação do pH;
- Investigar o efeito do pré-tratamento por explosão a vapor sobre a fibra da casca do coco verde através da quantificação dos teores de umidade, cinzas, extrativos, celulose, hemicelulose e lignina;
- Avaliar as melhores condições para produção das enzimas lignocelulolíticas (celulasas totais (FPase), endoglucanase (CMCase), celobiase e xilanase) com o novo fungo endofítico *A. lippiae* URM 7547, em cultivo submerso, usando a fibra de coco verde pré-tratada por explosão a vapor como substrato, variando-se a temperatura (°C), concentração inicial de esporos (esporos/mL) e concentração fibra de coco pré-tratada (g/L).

---

**CAPÍTULO III**  
**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

## 3 Revisão Bibliográfica

*Neste capítulo, são abordados os principais aspectos teóricos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho, baseando-se em diferentes fontes de pesquisa.*

### 3.1 Microrganismos endofíticos: Origem e caracterização

O termo endófito, originalmente descrito por De Bary em 1866, refere-se a qualquer microrganismo, bactérias e ou fungos, que habita os tecidos internos de plantas sem causar danos aos hospedeiros. Estes, por sua vez, distinguem-se dos epifíticos que vivem na superfície (CHAPLA *et al.*, 2018). A diferença entre microrganismos endofíticos, epifíticos e fitopatógenos (aqueles que causam doenças em plantas) é apenas didática, havendo entre eles um gradiente de interação que os separam. Os microrganismos endofíticos foram isolados pela primeira vez em 1904 em Darnel, na Alemanha (BOAS, 2020), mas apenas no fim da década de 1970 que começaram a adquirir importância científica. Por mais que tenham uma relação de aparente neutralidade com a planta foi verificado que eles apresentam uma série de benefícios e interações simbióticas com o hospedeiro, como a produção de substância que promovem o crescimento da planta, as protege de ataque de insetos, defendem contra patógenos, doenças e herbívoros, além de induzir à produção de substâncias bioativas (TORRES *et al.*, 2019). Além da simbiose, os endofíticos podem agir com mutualismo, havendo benefícios para ele e seu hospedeiro (HARDOIM *et al.*, 2015).

Segundo Compant *et al.* (2021), os endófitos podem ser transmitidos logo na primeira fase de desenvolvimento da planta, através das sementes durante a fecundação, sendo a presença da microbiota na raiz indispensável para as primeiras colonizações (Figura 1). Nas outras fases de desenvolvimento da planta, os endófitos utilizam outras partes de entrada para colonizar e penetrar os diferentes tecidos vegetais como, por exemplo, fissuras presentes no sistema radicular, caules fragmentados ou quebrados, estômatos e haustórios (SAIKKONEM *et al.*, 2004).

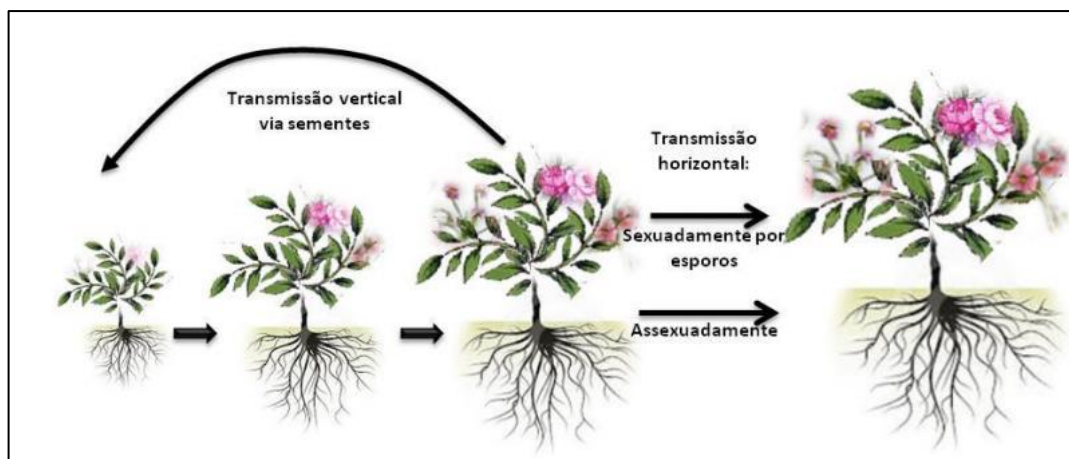


Figura 1 - Formas de transmissão da planta hospedeira pelo fungo endófito.  
Fonte: Hardoim *et al.*, (2015).

Os endófitos são fontes inesgotáveis de potencialidades para diferentes setores industriais. Por se manterem durante todo o ciclo de vida da planta, muitos fungos endófitos já foram isolados de diferentes espécies vegetais e, sua diversidade e frequência nos hospedeiros pode variar com fatores como umidade, distribuição geográfica, altura da planta, idade, dentre outros (NAIR & PADMAVATHY, 2014). Esses microrganismos podem ser usados para diversos fins, como na área farmacêutica e medicina na produção de antibióticos e novos fármacos, na indústria de enzimas, alimentos, etanol, agricultura e pecuária (citação).

Fungos e bactérias podem ser encontrados dentro da classe de microrganismos endófitos. Porém, os fungos são os mais comumente isolados por produzirem metabólitos secundários em maiores quantidades (SOUZA, 2019). Segundo Souza (2019) fungos endófitos, em resposta a estímulos ambientais e das plantas, podem ter vários papéis funcionais, além disso, formam relações simbióticas com seus hospedeiros que podem trazer como vantagem para o fungo o fornecimento de nutrientes e compostos necessários ao longo do ciclo de vida. Exemplos de fungos endófitos isolados de folhas, raízes, ramos e galhos são *Chaetomium globosum*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium oxysporum* e *Cladosporium cladosporioides* isolados do arroz (*Oryza sativa* L), *Trichoderma* spp., *Pestalotiopsis* spp. e *Fusarium* spp. isolados do cacau (*Theobroma cacao* L.) (MONTEIRO *et al.*, 2017; FÉLIX, 2019) e *Achateomium lippiae* isolado de *Lippia gracilis* (VIANA *et al.*, 2017).

### 3.1.1 Bioativos produzidos por fungos endofíticos

Um grupo de microrganismos que tem se destacado nas últimas décadas pela produção de metabólitos bioativos é o dos endófitos, especialmente os fungos filamentosos, que representam uma importante fonte genética para a biotecnologia. Esses microrganismos têm despertado o interesse da comunidade científica, devido à produção de metabólitos primários e secundários com aplicações biotecnológicas na indústria alimentícia, química e farmacêutica (LÓCIO *et al.*, 2019). O Quadro 1 apresenta alguns exemplos de metabólitos produzidos por fungos isolados de diferentes hospedeiros.

**Quadro 1** - Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos e suas plantas hospedeiras.

Fonte: adaptado de ZHAO *et al.*, 2011.

<b>Fungo Endofítico</b>	<b>Planta Hospedeira</b>	<b>Metabólito Secundário</b>
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Huperzia serrata</i>	Huperzina A
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Catharanthus roseus</i>	Vinblastina
<i>Alternaria tenuissima</i>	<i>Vaccinium</i> sp.	Flavonoides
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Davidia involucrata</i>	Flavonoides
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Ginkgo biloba</i>	Flavonoides
<i>Botryosphaeria parva</i>	<i>Nothapodytes nimmoniana</i>	Camptotecina
<i>Cephalosporium</i> sp.	<i>Paris polyphylla</i> var. <i>yunnanensis</i>	Diosgenin
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Hypericum perforatum</i>	Hipericina, Emodina
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Vincristina
<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Taxus chinensis</i>	Paclitaxel
<i>Penicillium</i> sp	<i>Diphylleia sinensis</i>	Podofilotoxina
<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Iris germanica</i>	Alfa-irone, Beta-irone

Tem sido demonstrado que novas moléculas produzidas por endofíticos e seus extratos contendo atividades biológicas ocorrem em número consideravelmente mais elevadas do que as produzidas por microrganismos do solo (51% e 80% maior, respectivamente) (YANG *et al.*, 2012; SOUZA, 2019). O primeiro caso de metabólito secundário produzido por um endófito foi relatado com a descoberta do composto anticancerígeno paclitaxel (taxol), encontrado e extraído somente da planta *Taxus brevifolia* (LEDWITCH *et al.*, 2013), até que STIERLE *et al.*, (1993) isolaram este composto de um endofítico desta planta, o fungo *Taxomyces*

*andreanae*. Em seguida o mesmo ocorreu com compostos anticancerígenos (podofilotoxina), inseticidas (azadiractina) e antidepressivos (hiperina e emodina).

Diversos metabólitos secundários de fungos vem sendo aplicados em alguns dos mais importantes produtos da indústria farmacêutica, a exemplo de agentes antibacterianos como os das classes das penicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas, agentes imunossupressores como a ciclosporina e rapamicina a partir de *Streptomyces* sp., redutores de colesterol como a mevastatina e lovastatina a partir de *Penicillium* sp. e anti-helmínticos e antiparasitários, como ivermectinas a partir de *Streptomyces* sp. (FERNANDES *et al.*, 2019; FELIX, 2019; BOAS *et al.*, 2020). Dentre os maiores produtores de bioativos e metabólitos primários/secundários estão os fungos do gênero *Penicillium*, se destacando com uma produção 73% maior quando comparado com outros microrganismos. Dentre os compostos produzidos, encontram-se antibióticos (D'ELIA *et al.*, 2021), micotoxinas (PRESTES *et al.*, 2019), antioxidantes (TELES *et al.*, 2020), anticancerígenos (GOES *et al.*, 2021), inseticidas (MORAIS, 2019) e enzimas (BRITO, 2018; OLIVEIRA JR *et al.*, 2018.a; GOMES *et al.*, 2020; SIMÕES *et al.*, 2021). Outros exemplos de fungos endofíticos com importante destaque na agricultura e demais áreas são os do gênero *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Chaetomium*, os quais são bastante estudados em laboratórios, estufas e campos (AZEVEDO *et al.*, 2017).

Considerando que os fungos endofíticos ainda são um nicho de microrganismos em potencial, podem ser considerados fontes de atividades biocatalíticas, da mesma forma que tem sido para produtos naturais bioativos. (LISBOA, 2015). Na relação simbiótica entre endófito e planta hospedeira está a produção de enzimas extracelulares, como proteases, lipases, celulasas, xilanasas, amilases, dentre outras, que podem ser aplicadas em diferentes áreas. Estas enzimas apresentam grande importância para indústrias no processamento de alimentos (SILVA *et al.*, 2020), bebidas (SILVA, 2018), produção de etanol de segunda geração (OLIVEIRA *et al.*, 2020; NOGUEIRA, 2017), formulação de medicamentos (FUGANHOLI, 2020) e indústria têxtil (MARROQUES *et al.*, 2020). Alguns exemplos também estão destacados no Quadro 2.

**Quadro 2** - Exemplos de enzimas produzidas por fungos endofíticos com aplicação industrial

Fonte: Por Autora

<b>Fungo Endofítico</b>	<b>Planta Hospedeira</b>	<b>Enzima</b>	<b>Referências</b>
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Eremophila longifolia</i>	Quitase	SOBRINHO (2020)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Davidia involucrata</i>	Celulases	OLIVEIRA JR (2018.B)
<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Acrostichum aureum</i>	Lipase	FRANÇA (2020)
<i>Discosia</i> sp.	<i>C. inophyllum</i>	Proteases	DABA <i>et al.</i> , (2018)
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Glinus lotoides</i>	Celulases	OMORI (2018)
<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Glycine max</i> (L.) Merrill	Amilases	ANTONIOLLI <i>et al.</i> , (2018)
<i>Xylaria</i> sp.	<i>Coleus aromaticus</i>	Lacase	CARVALHO (2021)
<i>Penicillium</i> sp.	<i>Centella asiatica</i>	Celulases	SANTOS <i>et al.</i> , (2021)
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Theobroma cacao</i> L	Proteases	MENEZES <i>et al.</i> , (2016)
<i>Bjerkandera</i> sp.	<i>Drimys winteri</i>	Fenoloxidase	OSES <i>et al.</i> , (2006)

Segundo Lisboa (2015) as enzimas são formadas por longas cadeias de aminoácidos ligadas através de ligações peptídicas. São proteínas especializadas em catalisar reações biológicas, atuando de modo seletivo, rápido e em condições brandas de reação. A aplicação das enzimas microbianas como catalisadoras em processos industriais mostra-se vantajosa, pois são específicas, naturais e geralmente não apresentam toxicidade, sendo características importantes para a nova indústria e seus aspectos de “química verde” com menos resíduos sólidos gerados e efluentes líquidos lançados ao meio ambiente (OLIVEIRA, 2019.b).

Nesse aspecto, os ensaios enzimáticos com grandes coleções de microrganismos tornam-se indispensáveis para a descoberta de novos biocatalisadores mais eficientes com a utilização de enzimas microbianas (ISHIZAWA, 2018).

### 3.1.2 Gêneros *Chaetomium* e *Achaetomium*

A família *Chaetomiaceae* engloba os fungos do gênero *Achaetomium* por estes terem grande semelhanças morfológicas ao gênero *Chaetomium* (RODRIGUEZ *et al.*, 2004) e possuírem poucas espécies descobertas, como: *Achaetomium luteum*, *Achaetomium strumarium*, *Achaetomium umbonatum*, *Achaetomium globosum* e o recentemente isolado, *Achateomium lippiae* (VIANA, 2017), conforme apresenta a Figura 2.

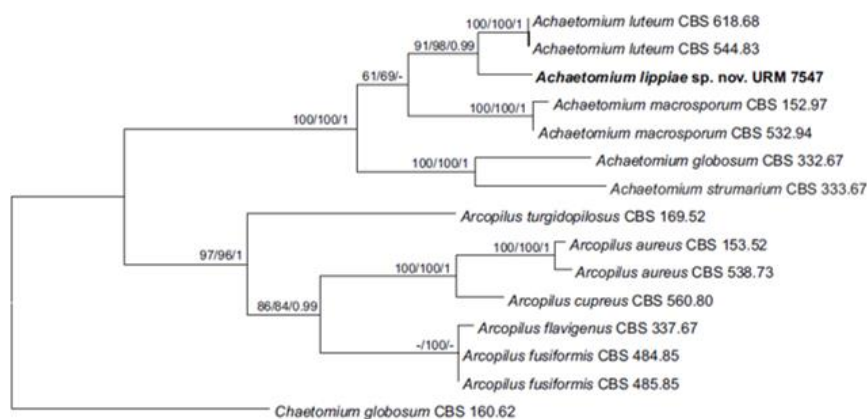


Figura 2 - Classificação do novo fungo endofítico *Achaetomium lippiae*.

Fonte: Viana *et al.* (2017).

Os representantes do gênero *Achaetomium* têm ótimo desenvolvimento em uma ampla faixa de temperaturas (30-55 °C) e de pressão osmótica, sendo encontrados, principalmente, nas regiões áridas e semiáridas. Eles estão presentes no solo, no ar e até em substratos lignocelulósicos por serem, em sua maioria, saprófitos de vegetais e de matéria orgânica em geral (WANG *et al.*, 2016). Os gêneros *Achaetomium* e *Chaetomium* apresentam diferentes propriedades como efeito citotóxico, ação enzimática, anti-reumatóide e antitumoral, destacando-se que algumas enzimas como xilanases, celulasas, xantonases e outros compostos como achaetomisinas e antraquinonas são comumente produzidas por esse gênero (FATIMA *et al.*, 2016; VIANA, 2017).

O fungo *Achaetomium lippiae* recebe esse nome por causa da sua planta hospedeira (*Lippia gracilis* Schauer), da qual foi isolado como endófito. Segundo Viana *et al.* (2017) as características morfológicas e filogenéticas do *Achaetomium lippiae* demonstram que ele é uma linhagem monofilética da família *Chaetomiceae*, *Sordariales*, *Sordariomycetes*, e está intimamente relacionado com o *Achaetomium luteum*. Suas colônias apresentam uma cor creme amarelada com flobose na parte superior da placa e na inferior, o fungo tem uma cor amarelada com o centro marrom pálido. A Figura 3 apresenta algumas imagens desse fungo ao microscópio (VIANA *et al.*, 2017).

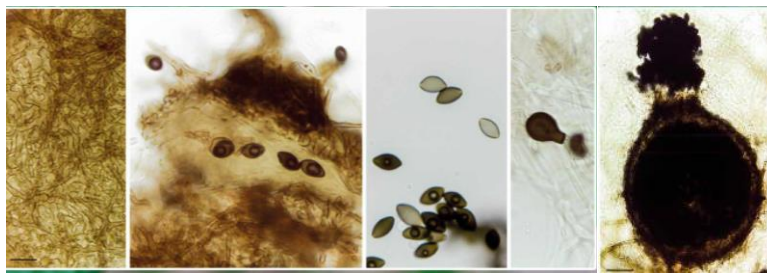


Figura 3 - Imagens microscópicas do *Chaetomium lippiae*, do micélio ao esporo.  
Fonte: Viana *et al.* (2017)

### 3.2 Biomassa lignocelulósica

As matérias-primas lignocelulósicas são formadas, em sua maioria, pelos materiais agroindustriais, pelos resíduos agroindustriais, resíduos urbanos e madeiras, sendo a biomassa renovável mais abundante encontrada na natureza (RODRIGUES, 2020). Elas são categorizadas em cinco classes principais: subprodutos e resíduos agrícolas (palhas, fibras e bagaços); subprodutos florestais e resíduos de madeira (ramos, raízes, cascas, cavacos de madeira); resíduos da indústria de madeira (serragem, cavacos de madeira, resíduos de madeira); subprodutos da indústria de papel e celulose e de sementes oleaginosas; e materiais lignocelulósicos a base de gramíneas, folhas, plantas, flores, peles e cascas de frutas (NAKAEMA, 2021).

Devido às suas características morfológicas e químicas, há uma dificuldade de converter a biomassa lignocelulósica em insumos químicos. Elas são constituídas de fibras de celulose envolvidas em uma matriz amorfa de polioses e lignina. Essa matriz torna esses materiais rígidos e pouco reativos, agindo como uma barreira natural ao ataque de microrganismos e/ou enzimas (TEIXEIRA *et al.*, 2018). A composição química da biomassa lignocelulósica geralmente contém 35-50% de celulose, seguido de 20-35% de hemicelulose, 10-25% de lignina e uma pequena quantidade de cinzas e extraíveis (ALVES, 2018). As proporções entre esses componentes podem variar dependendo da espécie e da camada da parede em questão, pois em termos de ultraestrutura, a parede de uma célula vegetal pode ser dividida em diversas camadas: parede primária, parede secundária externa, parede secundária média e parede secundária interna (SILVA, 2019b; CARVALHO *et al.*, 2009). Sua forma é apresentada em uma estrutura cristalina, mostrada na Figura 4, altamente estável que deve ser rompida mediante pré-tratamentos para fornecer açúcares fermentescíveis. A compreensão da complexidade estrutural desses materiais requer o conhecimento das características e propriedades de cada um dos seus componentes (NOGUEIRA, 2017).

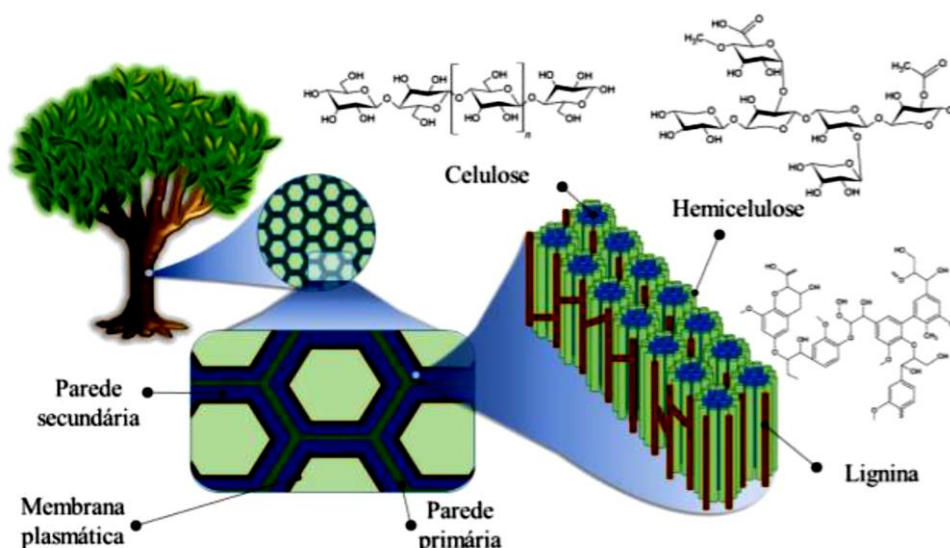


Figura 4 - Estrutura do material lignocelulósico.

Fonte: Adaptado de Nogueira (2021).

As fontes de energia renováveis inserem-se nas formas de produção energética em que suas fontes são capazes de se manterem disponíveis durante um longo prazo com baixo custo, contando com recursos que se regeneram ou se mantem ativos permanentemente (MOURA *et al.*, 2020). As biomassas lignocelulósicas desempenham um papel fundamental no contexto energético, ambiental e socioeconômico, sendo vista como umas das possibilidades presentes e futuras de geração de energia. A energia oriunda de resíduos lignocelulósicos se insere perfeitamente dentro da abordagem relacionada às considerações econômicas, sendo muito pesquisada especialmente na área de produção de biocombustíveis, como o bioetanol de 2ª geração, biogás, produtos químicos e biofertilizantes (KARIMI *et al.*, 2020; EICHLER *et al.*, 2015). A expectativa em produzir biocombustíveis decorrentes da maior fonte de carbono existente no planeta (complexo lignocelulósico) instigou grandes investimentos nas indústrias emergentes de biocombustíveis (FIGUEIREDO *et al.*, 2018).

No entanto, as características inerentes à biomassa lignocelulósica, tais como as propriedades químicas e estruturais, faz com ela se torne resistente à biodegradação (recalcitrância), fazendo com que a conversão rentável da biomassa lignocelulósica em biocombustíveis seja altamente desafiadora, instigando pesquisas na área de produção enzimática lignocelulolíticas, responsáveis por separar esse material complexo, lignina, celulose e hemicelulose, apresentados nos subcapítulos seguintes, em açúcares fermentescíveis de cadeias mais simples (CAVALCANTE *et al.*, 2018).

### 3.2.1 Celulose

A celulose é um homopolissacarídeo linear, composto por centenas de moléculas de glicose (Figura 5) unidas por ligações  $\beta$ -1,4-D-glicosídicas que se encontram imersas em uma matriz complexa, protegida pela rede de hemicelulose e lignina. É o constituinte estrutural das células vegetais, representando 35 a 50% da massa seca das mesmas, sendo considerado o polímero mais abundante na terra (CROCHE, 2018).

Destaca-se que duas unidades de D-glicose na celulose são chamadas de celobiose (NOGUEIRA, 2017). Salienta-se, ainda, que as pontes de hidrogênio entre as camadas de polissacarídeos contribuem para a resistência da celulose à degradação por hidrólise ácida, alcalina e/ou enzimática, o que confere a cristalinidade à celulose (OLIVEIRA, 2018c). A natureza cristalina da celulose aumenta sua resistência à degradação biológica (KARIMI & TAHERZADEH, 2020), entretanto, existem regiões amorfas na celulose que facilitam o ataque das enzimas (CROCHE, 2018). Assim, a hidrólise completa da celulose gera glicose, que é um açúcar de interesse industrial que pode ser utilizado em diversas áreas, desde processos químicos, quanto bioquímicos, como produção de bioetanol, por exemplo.

Algumas enzimas podem atuar sobre os componentes da celulose de forma isolada. Entre elas, podem ser mencionadas as celulases, que são divididas em endo-1,4- $\beta$ -glucanases (hidrolisam ligações glicosídicas ao acaso, gerando oligômeros) e celobiohidrolases (hidrolisam os oligômeros gerados pelas endo-1,4- $\beta$ -glucanases, liberando moléculas de celobiose). Um grupo finalizador da hidrólise é composto pelas 1,4- $\beta$ -glicosidases que hidrolisam a celobiose a glicose (OGEDA & PETRI, 2010).

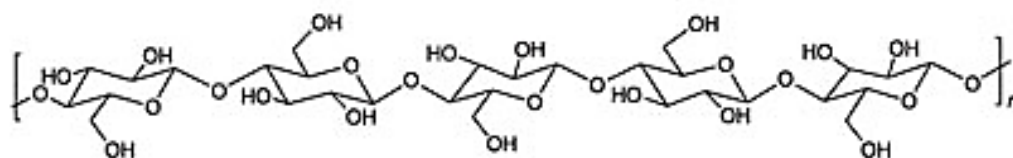


Figura 5 – Representação esquemática da molécula de celulose.

Fonte: Adaptado de Nogueira (2017)

### 3.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolímero formado por cadeias ramificadas de açúcares como pentoses (arabinose e xilose), hexoses (glicose, manose e galactose) e ácidos urônicos

(glucurônico, galacturônico) (OLIVEIRA JR, 2018), cujas formas estruturais estão apresentadas na Figura 6. Encontram-se intercaladas entre as microfibrilas da celulose, proporcionando elasticidade e impedindo que as microfibrilas se toquem, estabilizando a parede celular através de pontes de hidrogênio com a celulose e ligações covalentes com a lignina (SUN *et al.*, 2014).

Além das diferenças na composição química, a hemicelulose também difere da estrutura da celulose pelo tamanho da cadeia, que é muito menor, contendo de 50-300 unidades de açúcares, pela presença de ramificações nas moléculas principais da cadeia, e possui uma menor resistência à hidrólise quando comparada com a celulose por ser mais solúvel (NAKAEMA, 2021).

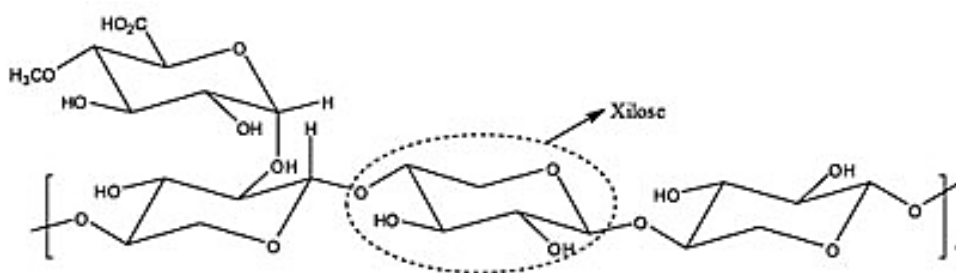


Figura 6 – Representação esquemática da hemicelulose.  
Fonte: Adaptado de Rodrigues & Camargo (2008).

A xilana é um dos principais constituintes da hemicelulose. É um polímero linear de unidades de  $\beta$ -D-xilopiranosil ligadas por ligações  $\beta$ -1,4-D-glicosídicas. Na natureza, a cadeia principal desse polissacarídeo pode ser adicionada de unidades de 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucuronopiranosil, grupos acetil,  $\alpha$ -L-arabinofuranosil, e outros em proporções variáveis (ALVES, 2018).

Ao hidrolisar a hemicelulose, tem-se como produto uma mistura de açúcares, sendo a xilose o que ocorre em maior concentração. Na indústria, esse açúcar tem sido usado na produção de solventes utilizados na purificação de óleos animais, minerais e vegetais, produção de ácido láctico e xilitol (SILVA, 2019c).

### 3.2.3 Lignina

A palavra lignina vem do latim *lignum*, que significa madeira, sendo a mesma responsável pela resistência mecânica, além de proteção contra microrganismos nas plantas vasculares. A lignina não apresenta uma estrutura definida, ou seja, são amorfas bem como são moléculas complexas cujo polímero é formado principalmente por unidades aromáticas de fenilpropano que é considerada uma substância incrustante (SOARES *et al.*, 2019).

Segundo Nakaema (2021), a lignina é uma complexa macromolécula tridimensional constituída de unidades fenilpropanóides que se liga à hemicelulose e envolve parcialmente os polissacarídeos e as microfibrilas de celulose na parede celular de plantas.

Sua distribuição constitui o fator responsável pela recalcitrância dos materiais lignocelulósicos à degradação enzimática, limitando a acessibilidade da enzima, tornando-se um dos principais problemas para o processo de conversão da biomassa lignocelulósica, uma vez que, devido ao reduzido tamanho dos capilares da biomassa, limita os sítios de ataques enzimáticos e impede a entrada de enzimas de maior massa molecular, restringindo o ataque à superfície externa (CROCHE, 2018). A Figura 7 ilustra uma das formas que a lignina pode apresentar.

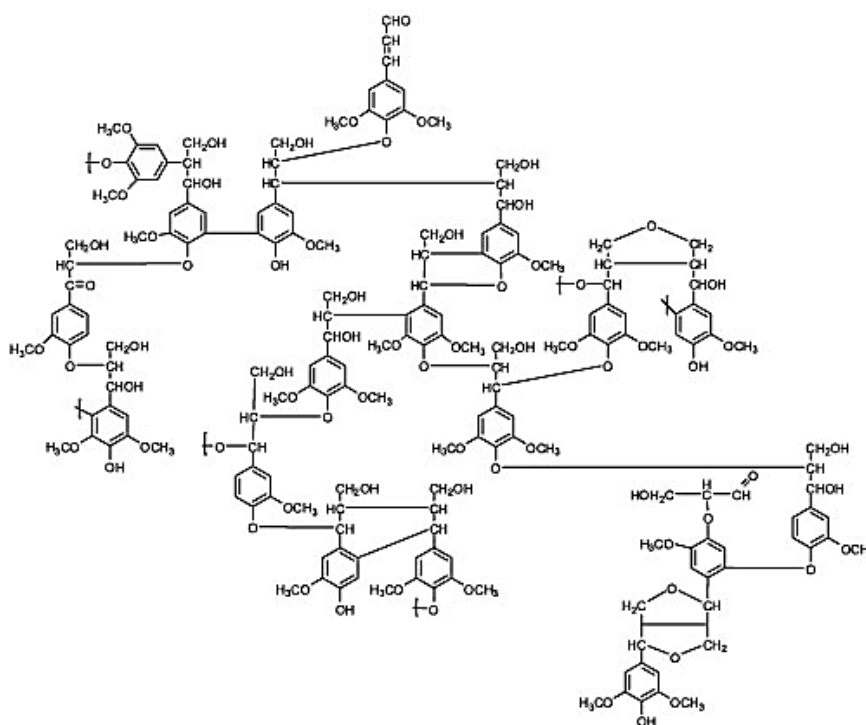


Figura 7 – Representação esquemática da lignina.  
Fonte: Adaptado de Pérez *et al.*, (2002).

### 3.3 Pré-tratamentos de biomassa lignocelulósica

O pré-tratamento da biomassa vegetal lignocelulósica representa a primeira etapa para a produção de enzimas e, posterior, a produção de bioetanol de segunda geração. Ele representa cerca de 20% dos custos de processo total para obtenção deste biocombustível e influencia diretamente as etapas posteriores de sua produção. Assim, o pré-tratamento está diretamente atrelado à etapa de preparação da biomassa lignocelulósica, à eficiência da etapa de hidrólise e à necessidade de tratamento das frações líquidas devido à geração de inibidores que afetam as etapas da fermentação alcoólica (RABELO, 2019).

Os principais objetivos de se realizar um pré-tratamento são: produzir sólidos digeríveis que aumentarão os rendimentos de açúcares durante a hidrólise enzimática (quando o objetivo final for a produção de biocombustíveis); minimizar a formação de inibidores para as etapas subsequentes; recuperar a lignina para convertê-la em moléculas que tenham valor agregado; ser rentável; minimizar a produção de resíduos tóxicos e perigosos através da lavagem e remoção de extraíveis; e, dependendo do pré-tratamento, há uma remoção parcial ou total da lignina ou hemicelulose (FERREIRA, 2018; ROSATELLA & AFONSO, 2015; LEE *et al.*, 2014).

Ao se pré-tratar um material lignocelulósico, ocorre uma diminuição da recalcitrância presente na biomassa, o que facilita a hidrólise enzimática com o fracionamento do complexo lignocelulósico em celulose, hemicelulose e lignina e o aumento da área superficial e da porosidade da celulose (Figura 8). Assim, o pré-tratamento desfaz a rigidez macroscópica da biomassa e diminui as barreiras físicas ao transporte de massa (FERREIRA, 2018).

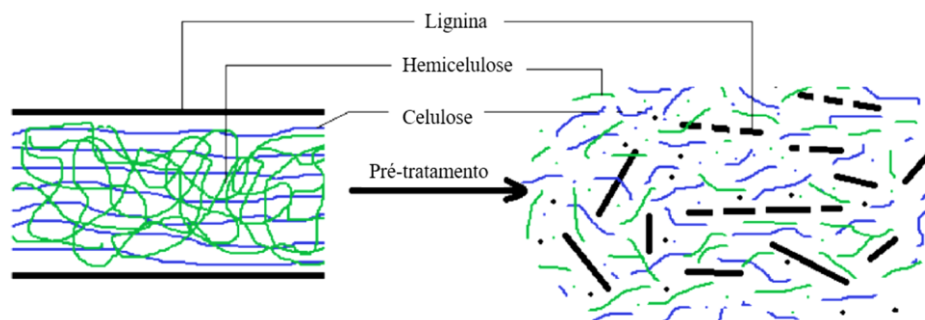


Figura 8 - Biomassa lignocelulósica sujeita ao pré-tratamento  
Fonte: Adaptado de Sharma et al., (2019).

Durante os processos de pré-tratamento são gerados diversos tipos de compostos que podem atuar como inibidores das enzimas na hidrólise e de leveduras na fermentação alcoólica. Os tipos e a concentração desses inibidores dependem da composição da biomassa e das condições de operação de cada tipo de pré-tratamento. Dentre estes inibidores estão os compostos fenólicos, gerados a partir da degradação da lignina, e os furanos, produtos de degradação dos açúcares (RIBEIRO, 2020).

As propriedades fundamentais que devem ser consideradas para o desenvolvimento de um processo de pré-tratamento são: característica da biomassa utilizada; custos moderados da operação; alto rendimento na recuperação de açúcares provenientes da hemicelulose; abertura da fibra lignocelulolítica, produzindo substratos com alto teor celulósico e acessibilidade para hidrólise enzimática alternando as variáveis de carga enzimática, teor de sólidos e baixo tempo de reação; e biomassa seca com baixo teor de umidade para a redução da carga energética empregada no processo (MOOD *et al.*, 2013).

Existem quatro tipos de pré-tratamento e são classificados em: pré-tratamentos físicos (moagem, microondas e extrusão) com uso de altas temperaturas, altas pressões e/ou rápida depressurização e os mecânicos; os químicos (ácido, básico, organossolv), com uso de reações químicas que desorganizam as ligações e interações químicas da matriz lignocelulósica; físico-químicos, que combinam tratamentos físicos e químicos, tais como explosão a vapor, explosão da fibra com amônia (AFEX) e o hidrotérmico; e biológicos (via microbiana), com o uso de microrganismos e/ou biomoléculas. (NOGUEIRA, 2021; RIBEIRO *et al.*, 2019; MOOD *et al.*, 2013). O Quadro 3 relaciona os principais métodos de pré-tratamento e suas vantagens e desvantagens.

Dentre eles, o pré-tratamento por explosão a vapor, é um dos tipos mais rentáveis nos processos de conversão da biomassa e está sendo amplamente estudado (ZHUANG *et al.*, 2016). Este método utiliza vapor d'água a alta pressão e alta temperatura para causar o rompimento da hemicelulose, tornando a celulose mais acessível às enzimas durante a hidrólise. Quando submetida a altas pressões e temperaturas, a água aumenta seu grau de ionização e os íons hidroxila gerados atuam como catalisadores da hidrólise da hemicelulose (GUILHERME, 2014; SOUZA, 2016).

Quadro 3 - Vantagens e desvantagens dos principais métodos de pré-tratamento.

Fonte: Adaptado de Ferreira (2018).

<b>Classificação</b>	<b>Método</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Físico	Moagem	Aumento da área superficial; Diminuição da cristalinidade	Alto custo energético; não remove lignina
Químico	Ácido	Solubilização de hemiceluloses a aumento da acessibilidade da celulose; Redução moderada de lignina	Corrosão; toxicidade dos reagentes; formação de inibidores à fermentação; necessidade de um eficiente sistema de recuperação do ácido
	Alcalino	Condições operacionais amenas; não exige reatores complexos; solubilização de lignina e grupos acetil	Alguns tratamentos exigem longos tempos de residência (dias); necessidade de neutralização da biomassa tratada; não gera compostos tóxicos; não inibe a fermentação
Físico-Químico	Explosão a vapor	Aumento da área superficial com solubilização de hemicelulose; remoção moderada de lignina e não utiliza solventes tóxicos.	Geração de componentes tóxicos; alta inibição à fermentação
Biológico	Microbiano (por fungos)	Aumento da área superficial; redução da cristalinidade; alta remoção de lignina; sem requerimento de reagentes e necessidade de reciclagem	Elevado tempo de processo; necessidade de grande espaço para o processo; necessidade contínua de controle do crescimento dos microrganismos

### 3.3.1 Pré-tratamento por explosão a vapor

O pré-tratamento por explosão a vapor atua tanto quimicamente quanto fisicamente. A reação ocorre à medida que o vapor saturado entra em contato direto e penetra o material

lignocelulósico e dentro dele se condensa em água líquida. Após a reação, segue-se uma descompressão explosiva, onde a água é rapidamente evaporada, causando assim a destruição da estrutura da biomassa. O processo causa uma hidrólise parcial de hemiceluloses e lignina, e o material é desfibrado com facilidade, diminuindo o tamanho das partículas e aumentando sua área superficial de contato, reduzindo a resistência da parede celular à sacarificação, o que resulta em maior acessibilidade das enzimas nessas estruturas, facilitando a hidrólise e fermentação subsequente (RIBEIRO *et al.*, 2019; PITARELLO *et al.*, 2013). Entre as variáveis operacionais e os fatores que afetam este tipo de pré-tratamento estão a temperatura, o tempo de residência no reator e o teor de umidade na biomassa, sendo que este último afeta diretamente o rendimento do processo (PITARELLO *et al.*, 2013).

O método de explosão a vapor se destaca em termos de viabilidade econômica pois se utiliza apenas água quente sob pressão e não agrega, a essa metodologia, reagente químicos como ácidos ou bases, o que traz grande vantagem para a proteção do meio ambiente (OLIVEIRA, 2020); pode ser realizado com ou sem a presença de catalisadores (KARP *et al.*, 2013); não necessita de reatores resistentes a corrosão para o processo; e ocorre a hidrólise de grande parte da hemicelulose presente no material (RIBEIRO, 2020). Além disso, a escolha da condição utilizada justifica-se nas limitações de temperatura e pressões do reator presente no equipamento (BARBOSA *et al.*, 2020). A desvantagem e principal desafio desse pré-tratamento é a produção de inibidores dos processos enzimáticos e fermentativos, porém se fazem presentes em um percentual menor quando comparados a outros processos (MARTINS, 2018).

No pré-tratamento hidrotérmico, a hidrólise das ligações mais termolábeis da lignina é favorecida, o que leva à formação de novas ligações e à fragmentação de partes da lignina, liberando os compostos fenólicos. Os compostos fenólicos consistem de um anel aromático, que possuem ligação com grupos do tipo hidroxila, carboxila, metoxila e outras estruturas cíclicas não aromáticas (PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 2000). O tipo de composto fenólico e a concentração dos fenólicos totais podem variar com o tipo de biomassa e o tipo de pré-tratamento, bem como da carga de sólidos utilizada no pré-tratamento e na hidrólise enzimática (RIBEIRO, 2020).

Tendo em vista que estes compostos inibidores alteram significativamente o desempenho dos fungos nos processos fermentativos e das enzimas na hidrólise, mesmo em baixas concentrações, se fazem necessários métodos para a sua remoção, sendo o primeiro deles, a lavagem com água corrente da biomassa pré-tratada até a estabilização do pH, de modo a aumentar o rendimento geral do processo de conversão da biomassa vegetal em biorrefinarias (RIBEIRO, 2020).

### 3.4 Produção de celulases e xilanases por via microbiana

Segundo Ramadan *et al.* (2014), a tecnologia enzimática é um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para sínteses de compostos de alto valor agregado pois os biocatalisadores apresentam menor impacto ambiental e menor consumo energético comparados com os catalisadores químicos por serem biodegradáveis. Ademais, suas propriedades, como alta especificidade e ação rápida, permitem que os processos na indústria possam ser executados com melhores rendimentos, redução na geração de resíduos e reações mais suaves (ADRIO & DEMAIN, 2014). As características, propriedades e desempenho das enzimas dependem de sua estrutura tridimensional e das condições externas como pH, temperatura e força iônica do meio (SILVA, 2013). O uso de microrganismo como fonte de obtenção de enzimas vem sendo cada vez mais utilizado em escala industrial (DENTI, 2021).

Segundo Denti (2021), as enzimas são classificadas de acordo com suas propriedades catalíticas e divididas em seis grandes classes: 1. Oxidorredutases; 2. Transferases; 3. Hidrolases; 4. Liases; 5. Isomerases e 6. Ligases. Dentre as enzimas mais vendidas no mundo estão as hidrolases (classe 3), devido a suas aplicações em diversas indústrias, que catalisam a quebra do substrato na presença de moléculas de água (HAMIN-NETO, 2012).

As hidrolases não só englobam diferentes enzimas, como carboidrases, lipases e peptidases (HAMIN-NETO, 2012), mas também há as responsáveis pela despolimerização dos materiais lignocelulósicos que são divididas em grandes grupos tais como exemplo: celulases e hemicelulases (SANTOS *et al.*, 2015).

Os microrganismos mais importantes utilizados pela indústria de enzimas são os fungos. Desses, os principais produtores de celulases são: *Trichoderma reesei*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma lignorum*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium iiriensis*, *Aspergillus* sp., *Schizophyllum* sp., *Chaetominum/Achaetomium* sp. e *Humicola* sp. Tais fungos excretam celulases de alta atividade no meio de cultura (SILVA, 2016).

#### 3.4.1 Celulases

As celulases são as enzimas responsáveis pela hidrólise da celulose, convertendo esse material insolúvel em açúcares menores. Estas enzimas atuam em sinergia para a liberação de

açúcares, dos quais a glicose é o que desperta maior interesse industrial (TEIXEIRA *et al.*, 2018). Contudo, são necessárias três classes de celulases trabalhando sinergicamente para a realização da hidrólise da celulose, que são as endoglucanases (1,4- $\beta$ -D-glucanohidrolase), exoglucanases (1,4- $\beta$ -D-glucano-celobiohidrolase) e celobiase ( $\beta$ -D-glucosidase) (DUDEK *et al.*, 2017) e a divisão desses grupos corresponde ao mecanismo de ação que elas realizam (GERVÁSIO, 2017).

As endoglucanases são as responsáveis por iniciar o processo de hidrólise, no qual atacam regiões de baixa cristalinidade das fibras de celulose, criando novas cadeias com terminais livres (ROSA, 2014). Elas atuam na região amorfa da cadeia de celulose rompendo-a internamente e de forma aleatória, agindo nas ligações  $\beta$ -1,4 presentes na região central da molécula, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização como produto (GRACIOLI, 2018). A atividade catalítica pode ser medida através da diminuição da viscosidade do meio decorrente da diminuição de massa molar média de celulose ou derivados de celulose (OGEDA & PETRI, 2010).

As exoglucanases (ou também chamadas de celobiohidrolases) atuam nas extremidades reductoras e não reductoras da molécula de celulose cristalina, produzindo uma redução lenta e gradual do seu grau de polimerização, liberando D-celobiose, que é posteriormente hidrolisado em glicose por  $\beta$ -glucosidases (NASCIMENTO *et al.*, 2018). Em alguns casos foi observado que essas enzimas rompem o substrato, aumentando as regiões intersticiais, o que conseqüentemente aumenta a taxa de hidrólise (CASCIATORI, 2015). Essas enzimas não atuam sobre celulose solúvel por haver impedimento estereoquímico causado pelos grupos substituintes, como o carboximetil da carboximetilcelulose (CMC) (NASCIMENTO *et al.*, 2018).

As celobiasas catalisam a hidrólise da celobiose gerada pelas celobiohidrolases e endoglucanases em glicose. Essas enzimas não são consideradas celulases autênticas pelo fato de não atuarem diretamente na cadeia celulósica, e sim no substrato solúvel. Porém, para que haja eficiência da hidrólise enzimática da celulose, elas são de extrema importância haja vista que atuam removendo a celobiose do meio reacional (PAZ-CEDEÑO, 2017).

A Figura 9 representa sistematicamente a ação do grupo de enzimas pertencentes ao sistema celulolítico, demonstrando a ação de cada uma separadamente e a importância que cada uma tem na hidrólise.

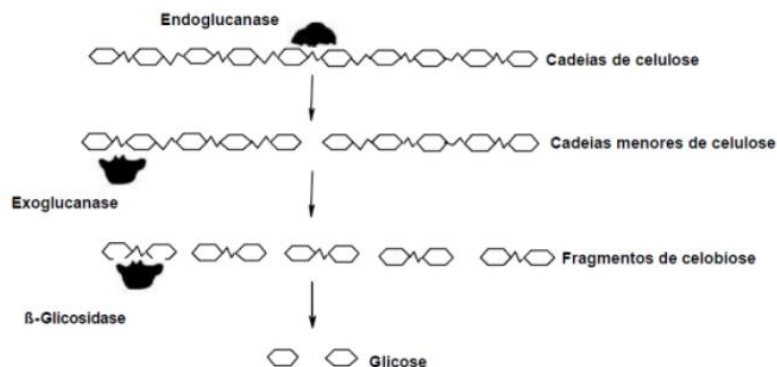


Figura 9 – Ação das celulases sobre a molécula de celulose

Fonte: Adaptado de Nascimento *et al.* (2018)

As celulases têm uma grande importância em aplicações industriais, como no processamento de alimentos e sucos, na indústria de papel de celulose, na biorremediação de poluentes industriais, na indústria de lavanderia e detergentes para limpeza de tecidos, na indústria farmacêutica, quando agem na extração de compostos produzidos pelas plantas, e na produção de bioetanol (SILVA, 2020). No ramo alimentício, as celulases são usadas principalmente na extração de componentes do chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes e do amido da batata doce (OLIVEIRA, 2009).

Entretanto, o principal gargalo para a aplicação abrangente da celulase na produção de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos é o alto custo de produção da enzima. Para solucionar este problema algumas estratégias podem ser usadas como o uso de microrganismos com altas taxas de produção das enzimas e a utilização de processos fermentativos com menor custo, como os que usam substratos agroindustriais (ZANCHETTA, 2012).

Os estudos mais recentes da literatura estão utilizando o gênero *Achaetomium/Chaetomium* para produção de enzimas termotolerantes por ser, na maioria dos casos, termoestáveis (HUA *et al.*, 2018).

A busca por baratear cada vez mais os custos da produção de bioetanol fez Hua *et al.*, (2018) estudarem e clonarem um novo gene codificador de endoglucanase (cTendo7) a partir do fungo termofílico *Chaetomium thermophilum*, que foi expresso de forma heteróloga em *Pichia pastoris*. A enzima CTendo7 recombinante foi purificada por cromatografia utilizando metal imobilizado  $Ni^{2+}$  e posteriormente caracterizada. CTendo7 pertence à família 7 de glicosídeo hidrolase, e exibiu atividade considerável contra carboximetilcelulose sódica (CMC-Na) e xilano de 1,91 UI/mg e 3,05 UI/mg na condição ótima de reação de 55 °C, pH 5,0, respectivamente. A enzima purificada apresentou uma termoestabilidade relativamente boa. As

atividades residuais de endoglucanase e xilanase foram de 74,3% e 66,2% após uma pré-incubação de 60 minutos a 70 °C. A geração de oligossacarídeos solúveis a partir de lignocelulose é uma etapa crítica na produção de bioetanol, e vale ressaltar que CTendo7 produziu celo-oligossacarídeos e xilo-oligossacarídeos a partir da sacarificação enzimática contínua de CMC-Na e xilana, respectivamente.

A hidrólise enzimática é considerada uma estratégia eficiente e ambientalmente adequada para a degradação de resíduos orgânicos. Comparadas às celulases mesofílicas, as celulases termoestáveis com atividade considerável são mais vantajosas na hidrólise de papel usado, principalmente em termos de sua participação na ação sinérgica. Li *et al.*, (2018) investigaram o efeito sinérgico de dois tipos diferentes de celulases termoestáveis, a endoglucanase CTendo45, e a celobiohidrolase CtCel6, em cinco tipos comuns de resíduos de papel por meio do *Chaetomium thermophilum*. Este estudo fornece uma visão inicial sobre um efeito sinérgico satisfatório de celulases termoestáveis de *C. thermophilum* para a hidrólise de diferentes materiais de papel, o que fornece uma combinação potencial de enzimas para aplicações industriais, incluindo gerenciamento de resíduos ambientalmente amigável e produção de etanol celulósico.

Nesse contexto, no presente estudo, avalia-se o potencial de um fungo identificado recentemente, o *A. lipppiae* URM 7547, como potencial produtor de celulases e xilanases visando sua aplicação na produção de etanol de segunda geração.

### 3.4.2 Hemicelulases

As hemicelulases atuam na hidrólise da hemicelulose que, assim como a celulose, está entre os grupos de polissacarídeos mais abundantes na natureza. Essas hidrolases são formadas por vários grupos, sendo os dois principais chamados de endo- $\beta$ -1,4-xilanase e  $\beta$ -xilosidade (ZANCHETTA, 2012).

As endoxilanases atacam o esqueleto estrutural da molécula, reduzindo o grau de polimerização do substrato ao clivarem as ligações glicosídicas na cadeia principal da xilana, transformando-a em pequenos fragmentos de xilotriose e xilobiose (TEIXEIRA *et al.*, 2018).

A  $\beta$ -xilosidade hidrolisa a xilobiose e xilotriose, produtos das endoxilanases, em xilose por remoções sucessivas de D-xilose a partir da terminação não redutora. Ela faz parte da maioria dos sistemas xilanolíticos microbianos e quando purificada mostra maior atividade em direção à xilobiose, nenhuma atividade em relação à xilana e com relação ao

xilooligossacarídeos (XOS) geralmente sua atividade diminui com o aumento do comprimento da cadeia (TORRE, 2017). A Figura 10 representa sistematicamente a ação das hemicelulases.

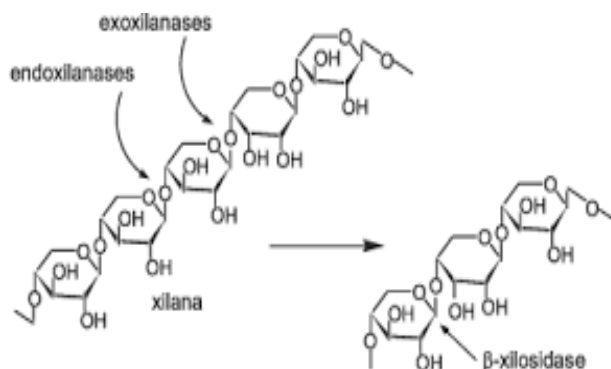


Figura 10-Representação sistêmica da ação das xilanases.

Fonte: Adaptado de Mingote (2015).

As enzimas xilanolíticas são produzidas por uma variedade de microrganismos, no entanto, os fungos são os produtores principais. Atualmente, a produção de xilanase em escala industrial é dominada por espécies de *Trichoderma* e *Aspergillus* (CARMO, 2011). A importância das xilanases está relacionada com seu potencial de aplicação na indústria. Os seus produtos, advindos da hidrólise enzimática, desempenham uma série de funções na indústria alimentícia e farmacêutica. Elas também são usadas na indústria de panificação, cervejaria e na produção de bioetanol (LEONEL, 2021).

A produção de xilanase pode ser utilizada para aplicações industriais e fins comerciais, incluindo branqueamento, sem cloro, da polpa de madeira antes da fabricação de papel; aditivos alimentares em aves e farinha de trigo para aumentar a qualidade dos produtos de panificação e melhorar o manuseio da massa; para a extração de café, extração de amido e óleos vegetais; além da produção de xilitol (Atalla *et al.*, 2020). A Figura 11 apresenta um gráfico de produção de xilanase por cultivo submerso (33 °C, pH 5,0) por *Chaetomium globosum* utilizando diferentes resíduos agrícolas.

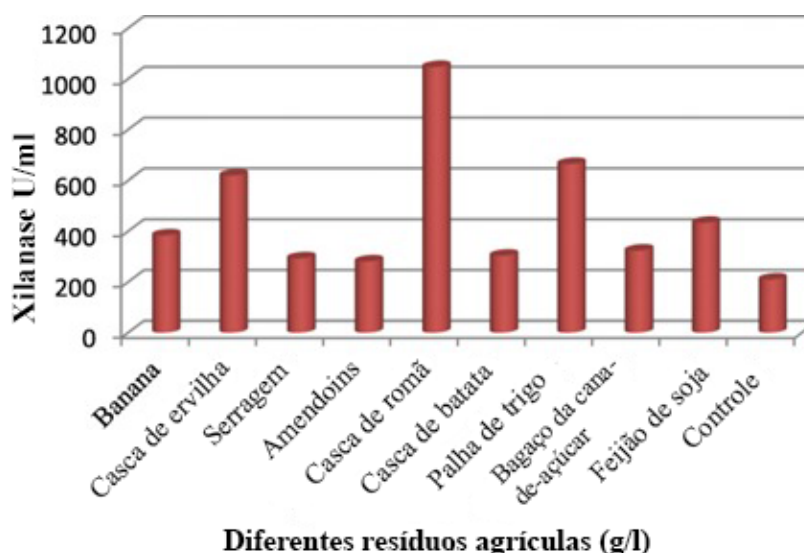


Figura 11 - Efeito de diferentes resíduos agrícolas na produção de xilanase por *C. globosum*

Fonte: Adaptado de Atalla *et al.*, (2020).

Atalla *et al.* (2020), em seu estudo de produção de xilanase por *C. globosum*, observaram que a variável pH tem forte influência sobre o gênero *Chaetomium* durante o processo de produção enzimática. A Figura 12 apresenta o gráfico de Atividade xilanolítica em (U/mL) versus valores de pH.

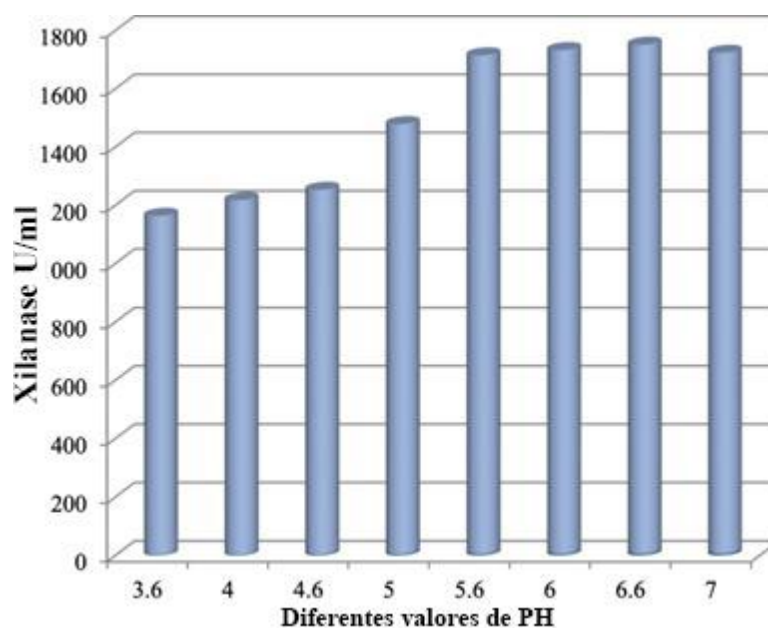


Figura 12 - Efeito de diferentes valores de pH na produção da xilanase bruta (U/mL).

FONTE: Adaptado de Atalla *et al.*, (2020).

Segundo Yu *et al.*, (2021), as xilanases têm ganhado cada vez mais atenção nos últimos anos devido a suas diversas aplicações em diferentes indústrias, incluindo alimentos, rações, papel e celulose, biocombustível e têxtil. Até o momento, um grande número de xilanases foram identificadas e caracterizadas a partir de vários microrganismos. Considerando que, relativamente menos xilanases foram relatadas de microrganismos termofílicos, Yu *et al.*, (2021) resolveram produzi-las em uma cinética otimizada por meio de códons a partir de cepas de microrganismos termófilos e após isso, testar sua termoestabilidade. Os fungos utilizados no estudo foram o *Achaetomium sp. Xz-8*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Malbranchea cinnamomea*, *Streptomyces thermovulgaris*, *Penicillium pinophilum C1*, e *Thermotoga naphhophila* RKU-10. Notou-se que, o gênero *Achaetomium* é um bom produtor xilanolítico e, para algumas cepas, ele apresenta-se como um fungo termofílico.

### **3.5 Estrutura, composição e relevância econômica do coco (*Cocos nucifera* L.)**

O coco, cujo nome científico é *Cocos nucifera l.* é original da Índia, mas sua planta já está presente em mais de 90 países, incluindo o Brasil. O coqueiro chegou ao Brasil, vindo de Cabo Verde, em meados de 1553 chegando ao estado da Bahia e expandindo-se primeiramente pelo litoral nordestino, onde se encontram os principais produtores atuais (CINTRA *et al.*, 2009).

No cenário mundial, o Brasil é o quarto maior produtor de coco, produzindo cerca de 3 milhões de toneladas (5% da produção mundial). A América do Sul é responsável por mais de 80% da produção, sendo 82,28% da área total plantada e 69,25% do valor total do coco produzido da região Nordeste (NOGUEIRA, 2017; SILVA, 2016).

Rico em nutrientes, o coco tem um enorme apelo comercial, desde a sua água até suas fibras e bagaço. Sendo a água do coco verde a mais utilizada e explorada pelo setor industrial, sua casca, que corresponde a 80-85% do peso bruto da fruta, acaba sendo descartada em grandes quantidades diariamente, causando sérios problemas ambientais (GERVÁSIO, 2017).

A indústria de coco verde pode ser desde a envasadora da água de coco ou de processamento deste produto para extração da polpa. Essas indústrias originam-se na produção agrícola e terminam no mercado consumidor. Podem também atingir o mercado consumidor de bares, restaurantes e quiosques, onde sua água é comercializada *in natura* sendo distribuída em garrafas ou outros recipientes (OLIVEIRA, 2016).

O coco verde é formado pelo mesocarpo fibroso e endosperma, conforme apresentado na Figura 13. Sua casca/mesocarpo representa em torno de 57% do fruto e na maioria das vezes é descartada. As fibras do mesocarpo são constituídas basicamente por celulose, lignina, hemicelulose, pectina e minerais. Suas características são a facilidade de modificação por agentes químicos, baixa densidade, a boa flexibilidade no processamento, além de ser biodegradável (SILVA, 2016).

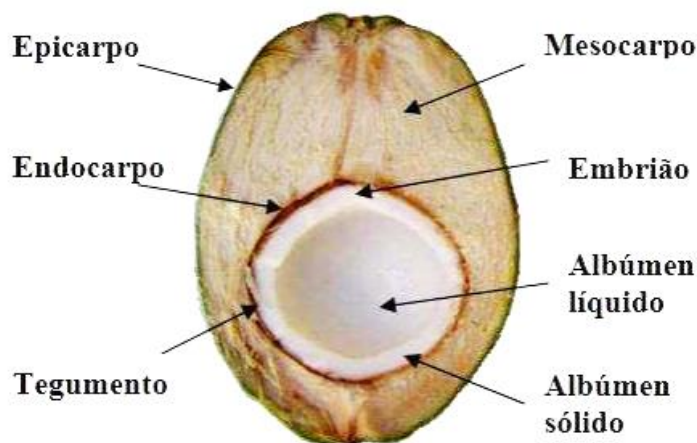


Figura 13 – Ilustração da estrutura do coco.  
Fonte: Adaptado de Silva (2016).

Poucos estudos têm sido realizados visando a utilização potencial da casca de coco na agricultura de campo, a maioria são experimentos realizados em casas de vegetação. Uma possível explicação pode ser o fato de alguns pesquisadores acreditarem que esse subproduto poderia inibir o crescimento de alguns vegetais, causando prejuízos. Porém, a casca possui várias aplicações como: substrato agrícola, para artesanato, jardinagem e, por possuir grande quantidade de material lignocelulósico, atualmente está sendo bastante estudada na área de biotecnologia para produção de enzimas e obtenção de bioetanol de 2ª geração, por exemplo (NASCIMENTO, 2018).

Nesse aspecto, a expressiva quantidade de resíduos gerados no processamento do coco tem motivado o desenvolvimento de alternativas e pesquisas que possibilitam o reaproveitamento dos resíduos sólidos com o objetivo de agregar valor a estes rejeitos, por meio da fabricação de novos materiais (NOGUEIRA, 2017; MATTOS *et al.*, 2021), minimizando seu impacto no meio ambiente.

Vários são os estudos na literatura que utilizam a fibra da casca do coco verde para obtenções de produtos biotecnológicos e de uso energético, como substratos em fermentações semissólidas (SANTOS *et al.*, 2018b) e submersas (GAETE *et al.*, 2020) para produções de

enzimas lignocelulolíticas, estudos sobre produção de enzimas celulolíticas em resíduos de coco verde deslignificado e hidrólises enzimáticas (BEZERRA *et al.*, 2021; PUTRINO *et al.*, 2020; NOGUEIRA *et al.*, 2021b), produção de etanol de segunda geração (NOGUEIRA *et al.*, 2021b), utilização na indústria alimentícia e farmacêutica como na produção de sorvetes probióticos (HANAFI *et al.*, 2022), na indústria de construção civil com produção de telhados verdes (ALMEIDA *et al.*, 2021), produção de antioxidantes (ADELOYE *et al.*, 2020) e na produção de etanol 2G e ramnolipídeos (PADILHA *et al.*, 2019).

---

**CAPÍTULO IV**  
**MATERIAL E MÉTODOS**

---

## 4 Material e Métodos

A seguir, são apresentadas as principais metodologias bem como os reagentes, materiais e equipamentos utilizados na parte experimental desta pesquisa.

### 4.1 Microrganismo e manutenção

O microrganismo utilizado foi o novo fungo endofítico *Achaetomium lippiae* identificado por Vianna *et al.*, (2017) e depositado na micoteca da Universidade Federal de Pernambuco sob o código URM-7547. *A. lippiae* URM 7547 foi cultivado seguindo a metodologia descrita por Viana *et al.* (2017) em placa de Petri contendo o meio Ágar Batata Dextrose (BDA) (Figura 14), sendo incubado em estufa tipo BOD (*Biochemical Oxygen Demand*, TE-371, Tecnal®) por 7 dias a 30 °C. Antes da inoculação da placa, tanto a placa quanto o meio foram esterilizados em autoclave, onde foram mantidos a 121 °C por 15 minutos. Após esse período, as placas contendo o fungo foram mantidas na geladeira por, no máximo, 90 dias, como forma de retardar o crescimento.

Também foi utilizado o fungo *Trichoderma reesei* CCT 2768 como controle e sua manutenção dele seguiu os mesmos protocolos utilizados para *A. lippiae* URM 7547.



Figura 14 – Aspecto macroscópico de *A. lippiae* URM 7547 após cultivo em meio BDA a 30 °C.

Fonte: Autora

#### 4.1.1 Repique em sabugo de milho

O repique foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Guilherme *et al.* (2008). O sabugo de milho utilizado foi seco a 65 °C por 24 horas em estufa com circulação de ar (Marconi, MA-035), processado em moinho (Willye, TE-680, Tecnal®) e peneirado em malha #20.

Para inoculação do microrganismo, transferiu-se 10,0 mL de solução de Tween 80 a 0,5% (v/v) para as Placas de Petri contendo os esporos e, com o auxílio de uma alça de platina, raspou-se a superfície do meio. Transferiu-se 1,0 mL da solução de Tween 80 com esporos para um meio, estéril em *Erlenmeyers* contendo 4,6 g de sabugo de milho umedecido com 6 mL de solução nutritiva composta (0,19 mL de fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), em uma concentração de 200 g.L<sup>-1</sup>; 0,025 mL de uma mistura contendo 40 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) e 46 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de ferro (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O); e 50 mL de solução peptonada, em uma concentração de 56 g.L<sup>-1</sup>). Os esporos foram incubados por cinco dias em BOD (TE-371, Tecnal®) a 30 °C, conforme a Figura 15.a.

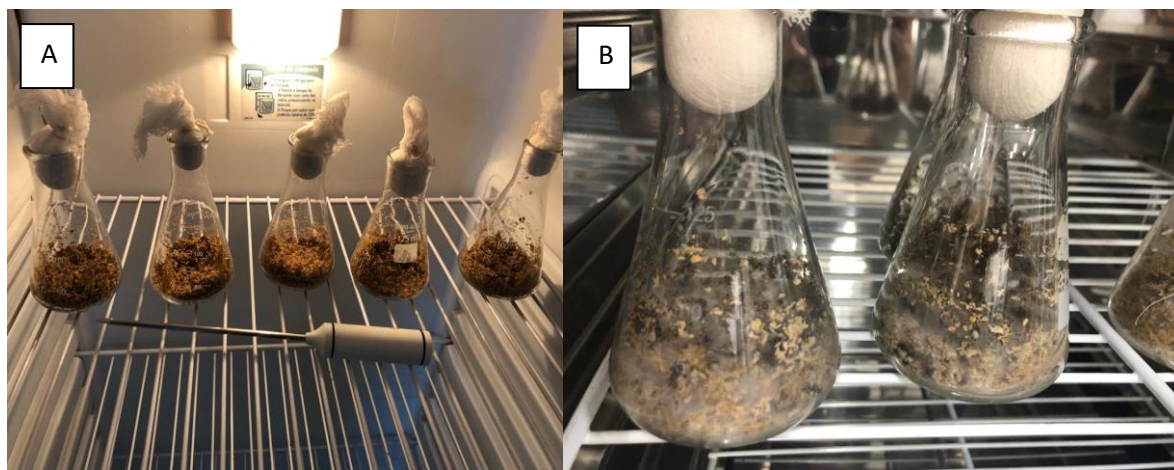


Figura 15 - Incubação do *A. lippliae* URM 7547 em sabugo de milho a 30 °C. A) Primeiro dia de incubação. B) Esporos crescidos após cinco dias de incubação.

Fonte: Autora

Após o período de cultivo dos fungos microrganismo, os *Erlenmeyers* (Figura 15.b) foram mantidos sob refrigeração por período máximo de até 3 meses e utilizados para obtenção dos inóculos nos ensaios da fermentação submersa.

## 4.2 Determinação do potencial do *A. lipppiae* na produção de enzimas hidrolíticas

Avaliou-se o potencial do fungo *A. lipppiae* URM 7547 para produzir enzimas hidrolíticas quando crescido em meio ágar. A produção das enzimas extracelulares amilase, lipase, protease, celulase, xilanase e pectinase por *A. lipppiae* URM 7547 foram avaliadas, de acordo com Fernandes (2009), por formação de halo e comparadas com o fungo *Trichoderma reesei* CCT-2768.

### 4.2.1 Meios para indução enzimática

As suspensões de esporos do novo fungo endofítico filamentosos *A. lipppiae* URM-7547 e de *T. reesei* CCT-2768 foram obtidas adicionando-se solução de Tween 80 0,5% (v/v) às placas estoques contendo o respectivo fungo crescido em meio Ágar Peptona Dextrose. Uma gota de suspensão foi transferida para o centro das novas placas contendo como fonte de carbono o substrato (amido, carboximetilcelulose, xilana, pectina cítrica, Tween 20 ou leite desnatado) cuja expressão da enzima associada pretendia-se avaliar. Para amilase, celulase, xilanase e pectinase, o meio foi preparado em solução salina (em g/L): NaNO<sub>3</sub> (2,0), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,0), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,5), KCl (0,5), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,01), dissolvendo-se ágar bacteriológico (18,0 g/L) e a fonte correspondente de carbono em (g/L): amido solúvel (10,0), carboximetilcelulose (10,0), xilana *Beechwood* (5,0), ou pectina cítrica (10,0), respectivamente, pH 5,0. Para lipase, o meio continha, (em g/L): peptona (10,0), NaCl (5,0), CaCl<sub>2</sub> (0,1) e ágar (20,0), pH 6,0. Após esterilização em autoclave (121 °C, 15 min), Tween 20, também autoclavado, foi adicionado para atingir uma concentração de 1,0% (v/v). O meio para indução de protease foi preparado em tampão citrato fosfato (100,0 mM, pH 5,0), contendo ágar (18,0 g/L), gelatina (10,0 g/L) e leite desnatado em pó (10,0 g/L). As placas foram preparadas em triplicata. A inoculação ocorreu com a transferência cuidadosa de uma gota de suspensão de esporos para o centro da placa e os fungos foram mantidos a 30 °C, durante 72 h, em estufa bacteriológica.

Ao final desse período, as placas para determinação da amilase foram coradas com solução de iodo 2,0%. As placas de celulase, xilanase e pectinase foram tingidas usando uma solução 0,1% (m/v) de vermelho congo, mantendo-se em contato por 30 min e, posteriormente,

lavadas com solução de NaOH (1,0 N). Para lipase e protease, o uso de soluções reveladoras não foi necessário.

#### 4.2.2 Cálculo do Índice Enzimático (IE)

O IE foi calculado para verificar a capacidade do fungo em produzir as enzimas, sendo esse a razão entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia, de acordo com as Equações (1) e (2), conforme Fernandes (2009):

$$IE = \frac{\text{Diâmetro do halo}}{\text{Diâmetro da colônia}} \quad (1)$$

$$IE = \sqrt{\frac{\text{Área da região de degradação}}{\text{Área da colônia}}} \quad (2)$$

Maiores valores de IE indicam maior atividade enzimática extracelular. O programa ImageJ (versão 1.52a, *National Institute of Health*, EUA) foi utilizado para obtenção das áreas das regiões de crescimento fúngico e do halo de degradação, que se relacionam com o IE de acordo com a Eq. (1). Os dados foram processados utilizando-se o programa Statistica® (versão 7.0, StatSoft. Ink, Tulsa, OK, EUA).

#### 4.3 Avaliação inicial do crescimento do *A. lipppiae* URM-7547 em meio líquido

Antes de se avaliar a produção das enzimas em cultivos submersos, foram avaliados o melhor meio salino (conforme ilustrado na Tabela 1) e a concentração de açúcar (glicose ou xilose, respectivamente) que proporcionassem, dentro das condições avaliadas, o máximo fator de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}$ ). Os experimentos (de A a I) foram realizados em triplicata, totalizando 27 ensaios, conforme Tabela 2. Destaca-se que os experimentos com glicose serão identificados como A<sub>G</sub>, B<sub>G</sub>, etc. e os com xilose A<sub>X</sub>, B<sub>X</sub>, etc.

Tabela 1 – Meios para incubação do *A. lipppiae* URM-7547 a 30 °C usados nos experimentos.

	Meio 1 (g/L)	Meio 2 (g/L)	Meio 3 (g/L)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0	2,0	2,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	2,0	2,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,4	1,4	1,4
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,3	0,3	0,3
Ureia	0,3	0,3	0,3
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,005	0,005	-
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,0016	0,0016	-
ZnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,0014	0,0014	-
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0037	0,0037	-
CaCl <sub>2</sub>	0,3	0,3	0,3
Peptona	-	-	0,75
Extrato de levedura	-	-	0,25

Tabela 2 – Experimentos para definição do melhor meio de cultivo líquido para produção (biomassa) do fungo *A. lipppiae* URM-7547.

Experimentos*	Meio Salino	Concentração
		de açúcar (g/L)
A	1	5,0
B	1	10,0
C	1	20,0
D	2	5,0
E	2	10,0
F	2	20,0
G	3	5,0
H	3	10,0
I	3	20,0

Destaca-se que, para esse estudo cinético, acompanhou-se a evolução do cultivo durante 10 dias (240 h) a temperatura de 30 °C e 150 rpm em Erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL de meio salino a uma determinada concentração de açúcar (pH inicial 5,0). Foi adicionado ao

meio 1,0 mL de suspensão de esporos com uma concentração de  $10^7$  esporos/mL. Ao longo do cultivo, erlenmeyers foram retirados a cada 24 h para quantificar o pH, a concentração de biomassa seca em papel de filtro e as concentrações de açúcares em g/L, o que permitiu estimar a máxima velocidade específica de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) e o fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ).

#### 4.3.1 Determinação da massa celular seca

A estimativa de crescimento do *A. lippliae* URM-7547 foi realizada pela quantificação do peso seco da biomassa fúngica durante o cultivo em meio líquido, após secagem a 100 °C até peso constante. A biomassa foi separada do meio através de filtração em papel de filtro Whatman nº7, previamente tarado, e lavada com 50mL de água destilada. O meio líquido separado da biomassa foi guardado em tubos falcons estéreis para quantificação de açúcares por CLAE.

A biomassa fúngica, em g/L, foi calculada conforme Equação (3):

$$X \text{ (g/L)} = \frac{m_f - m_p}{V_s} \quad (3)$$

Onde:

X = concentração de células, em g/L;

$m_f$  = Massa final da biomassa em gramas após secagem a 100°C em 24 h;

$m_p$  = Massa do papel de filtro seco em gramas;

$V_s$  = Volume do sobrenadante (L).

#### 4.3.2 Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) e fator de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}$ )

A velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) foi calculada, seguindo Schmidell Netto *et al.* (2001), pelas Equações 4 e 5, e seu valor máximo ( $\mu_{\text{máx}}$ ) foi reportado.

$$\int_{X_{i-1}}^{X_i} \frac{1}{X} dX = \mu \int_{t_{i-1}}^{t_i} dt \quad (4)$$

$$\mu = \frac{\ln(X_i/X_{i-1})}{(t_i - t_{i-1})} \quad (5)$$

$X_{i-1}$  e  $t_{i-1}$  representam a concentração de biomassa e o tempo de cinética anteriores aos de  $X_i$  e  $t_i$ , respectivamente. O  $\mu_{\text{máx}}$  foi reportado após os cálculos de cada  $\mu$ . O fator de conversão de substrato ( $Y_{X/S}$ ) em biomassa foi definido por Schmidell Netto *et al.* (2001) e reportado por Vaz (2008) pela Equação (6):

$$Y_{X/S} = \frac{X_{\text{Máx}} - X_0}{S_0 - S_{X\text{máx}}} \quad (6)$$

$X_{\text{máx}}$  e  $S_{X\text{máx}}$  representam a concentração de biomassa máxima e a concentração de substrato na qual essa concentração máxima de biomassa é obtida, respectivamente.  $X_0$  e  $S_0$  representam a concentração inicial de biomassa e a concentração de substrato, respectivamente.

#### 4.4 Obtenção e Preparo da Matéria-Prima

O coco verde foi coletado como resíduo da Aquacoco, empresa de água de coco localizada em Maxaranguape, Rio Grande do Norte, Brasil (Coordenadas geográficas: -5.5201119166154085, -35.257452458331095). As fibras das cascas do coco verde foram selecionadas e levadas ao Laboratório de Engenharia Bioquímica da UFRN (LEB). No laboratório, as fibras foram lavadas com água da torneira para remoção de compostos residuais e secas a 65 °C por 72 horas em estufa de circulação de ar (Marconi, MA-035), moídas em moinho (Willye, TE-680, Tecnal®), peneiradas com malha #20 e armazenadas em recipientes plásticos.

#### 4.5 Pré-tratamento com explosão a vapor

O pré-tratamento foi realizado utilizando um reator de explosão (14 L, 219 x 280 x 8 mm, Up Control, Brasil). A metodologia e variáveis de operação (210 °C e 10 minutos de

reação) utilizadas foram descritas por Ribeiro *et al.* (2019). A biomassa foi adicionada úmida ao reator para um maior rendimento.

Após a explosão, a biomassa foi retirada, filtrada, lavada até o pH da água de lavagem estabilizar em neutro e seca a 60 °C em estufa de circulação de ar (Marconi, MA-035) durante 24 horas. O substrato seco foi submetido a caracterização lignocelulósica, para posteriormente ser utilizado nos cultivos submersos.

## 4.6 Caracterização lignocelulósica

Os substratos *in natura* e pré-tratado via explosão a vapor foram caracterizados quimicamente em termos de teor de umidade, cinzas, extraíveis, celulose, hemicelulose e lignina.

### 4.6.1 Umidade

De acordo com Sluiter *et al.* (2005), foram pesados 2,0 g de pó da fibra da casca do coco verde em cápsulas de porcelana previamente taradas. Em seguida, o material foi colocado em estufa por 24 horas a 105 °C. Após esse período, as amostras foram colocadas em dessecador até atingirem temperatura ambiente e pesadas novamente.

A umidade foi determinada em triplicata e calculada conforme a Equação (7):

$$\text{UMIDADE (\%)} = 1 - \frac{M_{\text{seca}}}{M_{\text{úmida}}} \times 100 \quad (7)$$

Onde:

$M_{\text{seca}}$  (g) = massa seca do material constante obtida pela diferença entre a massa do conjunto depois da estufa e a massa da cápsula;

$M_{\text{úmida}}$  (g) = massa úmida obtida pela diferença entre a massa do conjunto antes de ser levado para estufa e a massa da cápsula.

#### 4.6.2 Cinzas

Foram pesados 2,0 g do pó da fibra da casca do coco verde em cadinho de porcelana. O material foi gradativamente aquecido em mufla até 300 °C e, posteriormente, calcinado a 800 °C por duas horas (SLUITER *et al.*, 2005).

Por diferença de massa, o teor de cinzas totais foi determinado de acordo com a Equação (8):

$$\text{CINZAS (\%)} = \frac{M_{\text{cadinho+cinzas}} - M_{\text{cadinho}}}{M_a} \times 100 \quad (8)$$

Onde:

$M_{\text{cadinho}}$  (g) = massa do cadinho antes da calcinação da amostra;

$M_{\text{cadinho+cinzas}}$  (g) = massa do cadinho com as cinzas após a calcinação;

$M_a$  (g) = massa da amostra seca (base seca) antes da calcinação.

#### 4.6.3 Extraíveis

Foram pesados 2,0 g de material e logo em seguida, foram submetidos a um tratamento em um aparelho Soxhlet, utilizando os reagentes água deionizada e álcool etílico 95% em sequência a temperaturas de 120 e 80 °C, respectivamente, por 24 horas cada, utilizando um volume de reagentes de 70,0 mL (SLUITER *et al.*, 2005).

Após o processo extrativo, o tubo contendo o material foi mantido em estufa a 105 °C durante 24 horas e, em seguida, pesado. A porcentagem de extrativos foi calculada conforme a Equação (9):

$$\text{EXTRATIVOS (\%)} = \frac{M_{\text{tubo+extraiveis}} - M_{\text{tubo}}}{M_{\text{seca}}} \times 100 \quad (9)$$

Onde:

$M_{\text{tubo+extraiveis}}$  (g) = massa do tubo Soxhlet com extraíveis após a extração;

$M_{\text{tubo}}$  (g) = massa do tubo Soxhlet antes da extração;

$M_{\text{seca}}$  (g) = massa da fibra inicial em base seca.

#### 4.6.4 Determinação de polissacarídeos e lignina

A determinação dos teores de lignina, celulose e hemicelulose seguiu a metodologia descrita por Sluiter *et al.*, 2008. Foram pesados 0,3 g de material isento de extraíveis e transferido para um Erlenmeyer de 125 mL em que foram adicionados 3,0 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (72%) em banho-maria a 30 ± 3 °C durante 1 h, usando um bastão de vidro para agitar a mistura a cada 10 min. A reação foi interrompida com adição de 84,0 g de água deionizada, agitando-se cuidadosamente a mistura. Em seguida, a solução foi autoclavada a 121 °C e 1,0 atm durante 1 h. Os ensaios foram realizados em triplicata. Após o tratamento térmico, o material hidrolisado foi filtrado utilizando-se papel filtro seco e previamente tarado. O hidrolisado foi armazenado em microtubos e estocados em geladeira, para a realização das análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

A fração sólida contida no papel filtro foi lavada com 100,0 mL de água deionizada e seca a 105 °C por 24 horas para uso na determinação de lignina insolúvel presente no material (SLUITER *et al.*, 2008).

##### 4.6.4.1 Lignina

Para determinar o teor de lignina insolúvel do material retido no papel de filtro após a hidrólise ácida, foi transferido o resíduo com o papel de filtro seco para um cadinho de porcelana previamente tarado e foi calcinada a amostra. A temperatura de calcinação foi elevada lentamente até 300 °C para evitar a expansão do material no interior da mufla e, posteriormente, mantida a 800 °C por mais duas horas. Após esse período, o cadinho foi transferido cuidadosamente para um dessecador, onde foi mantido até atingir a temperatura ambiente. Então, foi quantificada a massa do cadinho juntamente com o material calcinado (SLUITER *et al.*, 2008).

O teor de lignina na amostra foi calculado de acordo com a Equação (10):

$$\text{LIGNINA (\%)} = \frac{(M_{\text{Sólido+ppf}} - M_{\text{ppf}}) - M_{\text{cadinho+cinzas}} - M_{\text{cadinho}}}{M_{\text{material\_inicial}}} \times 100 \quad (10)$$

Onde:

$M_{\text{sólidos+ppf}}$  (g) = massa dos sólidos com papel filtro (seca) após lavagem;

$M_{\text{ppf}}$  (g) = massa do papel filtro tarado para filtração;

$M_{\text{cad+cinzas}}$  (g) = massa do cadinho com cinzas após a calcinação;

$M_{\text{cad}}$  (g) = massa do cadinho tarado antes da calcinação;

$M_{\text{material inicial}}$  (g) = massa da fibra (seca) utilizada para fazer hidrólise ácida.

#### 4.6.4.2 Determinação de concentração de celulose e hemicelulose

A determinação dos teores de celulose e de hemicelulose depende das concentrações de carboidratos e de ácidos orgânicos presentes no hidrolisado. Fatores de conversão são usados para converter as massas destes compostos em massa de celulose e hemicelulose (Tabela 3). Estes fatores se baseiam na estequiometria de conversão dos referidos componentes em suas moléculas precursoras: celulose e hemicelulose (SLUITER *et al.*, 2008).

Tabela 3-Componentes precursores da celulose (C) e hemicelulose (H) e seus respectivos valores de conversão.

Componente	Fator de conversão
Celobiose (C)	0,95
Glicose (C)	0,90
Ácido Fórmico (C)	3,09
HMF (C)	1,29
Xilose (H)	0,88
Arabinose (H)	0,88
Ácido Acético (H)	0,72
Furfural (H)	1,37

Para análise dos carboidratos por CLAE, a coluna utilizada foi uma Shim-pack SCR-101H (300 x 7,8 mm), a fase móvel é uma solução de ácido sulfúrico 5,0 mM, temperatura de 65 °C, tempo de corrida de 60 min, sob fluxo de 0,6 mL/min.

Na determinação dos ácidos orgânicos, como HMF e furfural, usou-se a coluna Shim-Pack SCR-101H (300 x 7,8 mm), utilizando-se como fase móvel ácido acético (AA) 1,0% e acetonitrila (ACN) a 25°C e fluxo de 0,6 mL/min em gradiente: AA 100% - ACN 30% (0-5 min); ACN 30% - 70% (5-10 min); ACN 70% - 100% (10-15 min); ACN 100% - AA 100% (15-25 min).

A fim de determinar a concentração de celulose e hemicelulose, soma-se a quantidade de açúcares corrigidas com seus fatores de conversão expressos na Tabela 3.

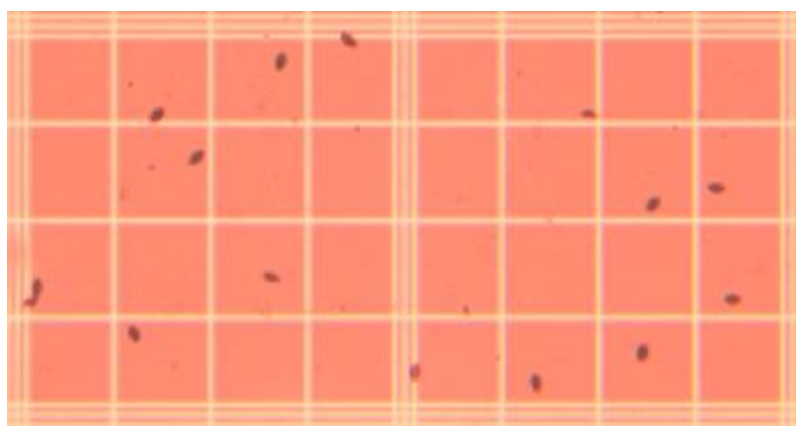
As concentrações de cada componente são obtidas através de curvas de calibração que correlacionam concentrações dos padrões preparados com as respectivas áreas dos cromatogramas.

#### **4.7 Cultivos submersos para a produção de celulases e xilanases por *A. lippiae* URM-7547 utilizando como substrato a fibra de coco pré-tratada por explosão a vapor**

##### **4.7.1 Preparo do inóculo**

O preparo do inóculo para os cultivos submersos foi realizado adicionando-se 40,0 mL de uma solução de Tween 80 a 0,5% (v/v) em Erlenmeyers contendo os esporos do *A. lippiae* URM-7547 crescidos em sabugo de milho. Logo em seguida, a mistura foi agitada e os esporos transferidos para um tubo Falcon estéril de 50 mL com auxílio de gaze e algodão estéril para a contagem de esporos.

A quantificação dos esporos presente na suspensão foi realizada através da metodologia descrita por Carvalho *et al.*, (2008). Transferiu-se, com o auxílio de uma micropipeta, 0,1  $\mu$ L da suspensão de esporos para a Câmara de Neubauer espelhada para a leitura no microscópio óptico (Olympus, Modelo BX51), conforme Figura 16.



**Figura 16** – Imagem microscópica do *Achaetomium lippiae* URM – 7547 na câmara de Neubauer.  
Fonte: A autora.

A concentração de esporos na suspensão foi encontrada a partir da Equação (11):

$$C_{\text{esporos}} \left( \frac{\text{esporos}}{\text{mL}} \right) = E \times 10^4 \times F_D \quad (11)$$

Onde:

E = Quantidade média de esporos contadas;  $C_{\text{esporos}}$  = Concentração de esporos na suspensão;

$10^4$  = transformação do volume de 0,1  $\mu\text{L}$  para mL;

$F_D$  = Fator de diluição para contagem na Câmara de Neubauer;

O volume de suspensão de esporos que foi adicionado ao meio de cultivo e foi ajustado conforme a Equação (12):

$$V_{\text{suspensão}} \text{ (mL)} = \frac{C_{\text{inóculo}}}{C_{\text{Esporos}}} \quad (12)$$

sendo:

$C_{\text{inóculo}}$  = Concentração de inóculo desejada para o cultivo.

#### **4.7.2 Avaliação da produção de celulasas e xilanase por *A. lipppiae* URM-7547 utilizando como substrato a fibra de coco pré-tratada por explosão a vapor**

Os cultivos submersos para produção das enzimas foram realizados usando o meio salino que forneceu um melhor  $Y_{x/s}$  indicado no item 4.4 deste estudo. Conforme ensaios de J a Q (Tabela 5), avaliou-se a influência da temperatura do cultivo, da concentração do inóculo e da concentração de substrato pré-tratado por explosão a vapor (210 °C, 10 minutos) nas atividades de celulasas (FPase, endo- $\beta$ -1,4-glucanase (CMCase) e  $\beta$ -glicosidase (celobiase)) e de endo- $\beta$ -1,4-xilanase.

Tabela 4 - Ensaio para a produção de celulasas e xilanase por *A. lipppiae* URM-7547 utilizando como substrato a fibra de coco pré-tratada por explosão a vapor

<b>Ensaio</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Concentração do inóculo (esporos/mL)</b>	<b>Substrato (fibra de coco pré-tratada) (g/L)</b>
<b>J</b>	28,0	1,0x10 <sup>5</sup>	10,0
<b>K</b>	28,0	1,0x10 <sup>5</sup>	30,0
<b>L</b>	28,0	1,0x10 <sup>9</sup>	10,0
<b>M</b>	28,0	1,0x10 <sup>9</sup>	30,0
<b>N</b>	33,0	1,0x10 <sup>5</sup>	10,0
<b>O</b>	33,0	1,0x10 <sup>5</sup>	30,0
<b>P</b>	33,0	1,0x10 <sup>9</sup>	10,0
<b>Q</b>	33,0	1,0x10 <sup>9</sup>	30,0

Os meios de inóculos foram feitos em triplicata e compostos por solução salina e substrato (fibra da casca de coco verde pré-tratado). Eles foram colocados em Erlenmeyers de 250 mL e autoclavados à 121 °C por 15 minutos.

O ensaio para a produção enzimática seguiu a metodologia descrita por Domingues *et al.* (2000). Dessa forma, foram inoculados um volume de uma suspensão de esporos em 100 mL do meio. A fermentação foi conduzida em triplicata por um período de 240 h e 150 rpm de agitação. O extrato enzimático foi obtido após filtração em papel de filtro Whatman.

Foi realizado também, para controle de dados, um ensaio para produção de FPase e CMCase com as mesmas condições do Ensaio Q, utilizando a fibra de coco verde *in natura*.

#### **4.8 Determinação das Atividades Enzimáticas**

O extrato enzimático após filtração, foi analisado com relação às atividades de celulasas totais (FPase), endoglucanase (CMCase), celobiase e xilanase para avaliar o potencial do *A. lipppiae* URM-7547 na produção enzimática.

#### 4.8.1 Celulases Totais (FPase)

A atividade de FPase foi analisada seguindo o procedimento descrito por Ghose (1987) e dosagem dos açúcares redutores pela metodologia de Miller (1959) modificada.

A mistura reacional contendo 0,5 mL de extrato enzimático, 1,0 mL de solução tampão citrato de sódio (50,0 mM, pH 4,8) e fita de papel de filtro Whatman n° 1 medindo 1,0 x 6,0 cm foi incubada a 50 °C por 60 minutos. Após o tempo de incubação e imersão em banho de gelo, 0,5 mL da mistura reacional foi transferida para tubos contendo 0,5 mL de solução de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), levando-o em seguida à fervura em banho-maria por exatos 5 minutos. Logo após, os tubos de ensaio foram resfriados em banho de gelo e 4,0 mL de água destilada foram adicionados a cada tubo. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (ThermoSpectronic – GENESYS 10uV) em comprimento de onda de 540 nm e a concentração foi convertida em concentração de glicose a partir da curva de calibração usando glicose como padrão com uma faixa de concentração de glicose de 0,89 a 22,30  $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A atividade de FPase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1,0  $\mu\text{mol}$  de glicose por minuto.

O tempo zero para determinação da concentração inicial de açúcares redutores no sobrenadante foi preparado adicionando-se 0,5 mL da solução enzimática em tubos contendo 1,0 mL da solução de tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8) e, após agitação, foi transferido 0,5 mL dessa solução obtida para tubos contendo 0,5 mL do reagente DNS, seguido de fervura e leitura, realizadas semelhantemente à metodologia de Miller (1959). O branco, utilizado para zerar o espectrofotômetro, consistiu na mistura de 0,5 mL de tampão citrato (50 mM, pH 4,8) e 0,5 mL de DNS.

A atividade enzimática de celulases totais foi expressa em U/mL e calculada seguindo a Equação (13).

$$\text{Atividade Enzimática (U/mL)} = \frac{\Delta_{AR} F_D V 10^6}{MM_{Glicose} t V_S 10^3} \quad (13)$$

Onde:

$F_D$  = fator de diluição do extrato enzimático;

$10^3$  = fator de conversão de L para mL;

$10^6$  = fator de conversão de mol para  $\mu\text{mol}$ ;

MM = massa molar da glicose (180 g/mol);

t = tempo de reação em minutos;

V = volume total da mistura reacional (mL);

V<sub>s</sub> = volume de sobrenadante (mL).

$\Delta_{AR}$  = variação das leituras de açúcares redutores nos tubos com substrato da amostra e do tempo zero (g/L).

#### **4.8.2 Endoglucanase (CMCase)**

A atividade celulolítica de CMCase foi analisada seguindo o procedimento descrito em Ghose (1987), que se baseia na capacidade do extrato enzimático em liberar açúcares redutores na presença de carboximetilcelulose (CMC) devido à hidrólise da celulose em glicose.

Para a análise, foi colocado em um tubo de ensaio 0,5 mL do extrato enzimático com 0,5 mL de uma solução de CMC a 4,0% (m/v), preparada em tampão citrato de sódio (50,0 mM, pH 4,8), a uma temperatura de 50 °C em banho-maria por exatos 10 minutos. Após o tempo de incubação e imersão em banho de gelo, 0,5 mL da mistura reacional foi transferida para tubos contendo 0,5 mL de solução de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), levando-os em seguida à fervura em banho-maria por exatos 5 minutos. Logo após, os tubos de ensaio foram resfriados em banho de gelo e 4,0 mL de água destilada foram adicionados a cada um. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (ThermoSpectronic – GENESYS 10uV) em comprimento de onda de 540 nm e a concentração foi convertida em concentração de glicose a partir da curva de calibração usando glicose como padrão com uma faixa de concentração de glicose de 0,89 a 22,30  $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar o equivalente a 1,0  $\mu\text{mol}$  de glicose, por minuto.

A atividade enzimática de carboximetilcelulase foi expressa em U/mL e foi calculada seguindo a Equação (13).

#### **4.8.3 Celobiase**

A atividade de celobiase foi analisada seguindo o procedimento descrito por Ghose (1987) e dosagem dos açúcares redutores pela metodologia de Miller (1959).

Para a análise, foi colocado em um tubo de ensaio 1,0 mL do extrato enzimático com 1,0 mL de uma solução de celobiose (15,0 mM), preparada em tampão citrato de sódio (50,0

mM, pH 4,8) a uma temperatura de 50 °C em banho-maria por exatos 30 minutos. A determinação da concentração de glicose foi feita através do uso de um kit de análise de concentração de glicose baseado na reação das enzimas glicose oxidase e peroxidase. Neste processo, a glicose é transformada em glucônico e peróxido de hidrogênio pela ação da glicose oxidase. O peróxido de hidrogênio formado, em combinação com 4-aminoantipirina e fenol, é transformado, pela ação da peroxidase, em quinonaimina, composto que apresenta coloração. Ao final da reação, cada mol de glicose é transformado em um mol de quinonaimina. Para tal, 10,0 µL da mistura reacional foram pipetados em tubos de ensaio contendo 1,0 mL do reagente de glicose oxidase e peroxidase (BioSystems®). Os tubos foram incubados durante 10 minutos à temperatura ambiente (25 °C), tempo no qual ocorreu a reação enzimática. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (ThermoSpectronic – GENESYS 10uV) em comprimento de onda de 500 nm e a concentração foi convertida usando como referência a absorvância de uma solução padrão de glicose (1,0 g/L). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar o equivalente a 1,0 µmol de glicose, por minuto.

A atividade enzimática de celobiase foi expressa em U/mL e foi calculada seguindo a Equação (13).

#### **4.8.4 Xilanase**

A atividade enzimática de xilanase quantificada foi a de Endo-β-1,4-xilanase seguindo o procedimento descrito por Ghose (1987) e dosagem dos açúcares redutores pela metodologia de Miller (1959). Foram adicionados 100,0 µL do extrato enzimático em 900,0 µL da solução de atividade constituída de uma solução tampão citrato de sódio (50,0 mM, pH 4,8) contendo 1,0% (m/v) de xilana como substrato. A mistura foi incubada por 5 minutos a temperatura de 50 °C e a reação foi interrompida pela adição 1,0 mL do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). A concentração dos açúcares redutores foi quantificada de acordo com o método do DNS descrito por Miller (1959). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (ThermoSpectronic – GENESYS 10uV) a 540 nm e a concentração foi convertida em concentração de xilose a partir da curva analítica.

## **4.9 Análise estatística**

A existência de diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos resultados obtidos nos experimentos foi determinada no software Statistica v.10, através de Análise de variância (ANOVA) seguida de pós teste de Tukey, para comparação das médias obtidas nas triplicatas. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

---

**CAPÍTULO V**  
**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

## 5 Resultados e discussão

### 5.1 Avaliação do potencial do *Achaetomium lippiae* URM-7547 na produção de enzimas hidrolíticas

#### 5.1.1 Produção de enzimas hidrolíticas em meio sólido

Objetivando-se observar o potencial de produção enzimática por *Achaetomium lippiae* URM 7547 de celulasas e xilanases, fez-se necessário um teste inicial com produção de enzimas hidrolíticas (amilase, lipase, protease, celulase, xilanase e pectinase) em meio sólido utilizando placas de Petri.

O crescimento de *A. lippiae* e a indução da produção de enzimas foi realizada utilizando diferente substratos. Para cada enzima tinha-se um indutor, sendo amido, carboximetilcelulose, xilana, pectina cítrica, Tween 20 e leite desnatado para a amilase, celulase, xilanase, pectinase, lipase e protease, respectivamente. Para comparação de dados, utilizou-se também, pela mesma metodologia, *Trichoderma reesei* CCT 2768.

O crescimento micelial e formação de halo foram observados por meio de adição de corantes indicadores às placas de Petri. Utilizou-se o iodo como indicador de amido e o vermelho congo como indicador para as celulasas, xilanases e pectinases. Para lipases e proteases, não se fez o uso de corante, pois o halo apresentou-se de forma translúcida.

As Figuras 17 e 18 apresentam as placas de Petri ao final do cultivo (72 h a 30 °C) em meio sólido de *A. lippiae* URM-7547 e *T. reesei* CCT-2768, respectivamente.

Nas Figuras 17a e 18a é possível observar que na região onde a amilase produzida pelo fungo degradou o amido formou-se um halo claro, e no restante da placa, uma coloração azul intensa devido à interação do iodo com o amido presente. Para a lipase (Figura 17b e 18b), a zona clara ao redor da colônia, devido à formação dos sais de ácidos graxos pela ação enzimática, não foi observada. Para a protease (Figura 17c e 18c), observou-se um halo translúcido ao redor das colônias devido às alterações químicas resultantes da ação da enzima produzida.

Nas placas das Figuras 17d, 18d, 17e, 18e, 17f e 18f, coloridas com vermelho congo, para avaliação de celulase, xilanase e pectinase, observou-se a formação de um halo ao redor da

região de crescimento micelial. Nos casos da xilanase e pectinase, o micélio apresentou comportamento hidrofóbico, não absorvendo o corante.

Observou-se, também, que o formato do crescimento micelial e a coloração para o *A. lipppiae* URM-7547 e para o *T. reesei* CCT-2768 são diferentes, isso se deve à diferença nas suas classificações e taxonomias dentro das famílias fúngicas, o que não impede que ambos consigam um nível satisfatório na produção de enzimas hidrolíticas.

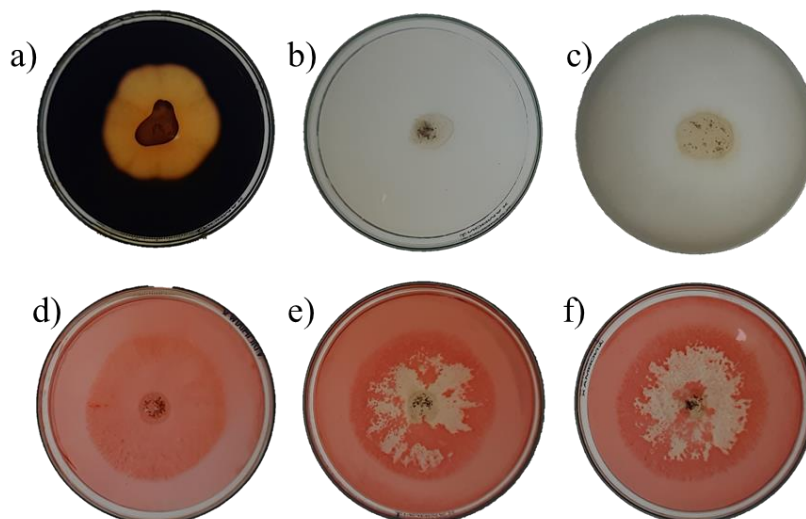


Figura 17 – Cultivo do *A. lipppiae* URM 7547 em placas de Petri para avaliação do índice enzimático. a) amilase, b) lipase, c) protease, d) celulase, e) xilanase e f) pectinase.  
Fonte: A autora.

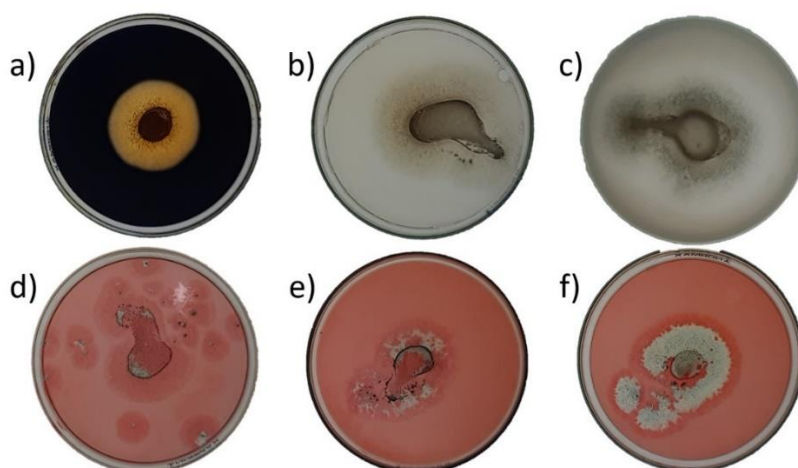


Figura 18 – Cultivo do *T. reesei* CCT-2768 em placas de Petri para avaliação do índice enzimático. a) amilase, b) lipase, c) protease, d) celulase, e) xilanase e f) pectinase.  
Fonte: A autora

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos de índice enzimático (IE). A comparação de resultados e avaliação das médias, com o teste de Tukey, se deu entre colunas, para uma mesma enzima.

Tabela 5 - Produção de enzimas hidrolíticas avaliados pelo Índice Enzimático.  
Fonte: A autora.

Fungo	Amilase	Lipase	Protease	Celulase	Xilanase	Pectinase
<i>A. lippii</i> e	2,70 ± 0,30 <sup>a</sup>	1,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	2,59 ± 0,26 <sup>c</sup>	3,68 ± 0,58 <sup>e</sup>	1,21 ± 0,04 <sup>g</sup>	1,30 ± 0,02 <sup>i</sup>
<i>T. reesei</i>	2,51 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	1,43 ± 0,13 <sup>d</sup>	1,82 ± 0,11 <sup>f</sup>	1,11 ± 0,01 <sup>h</sup>	1,17 ± 0,01 <sup>j</sup>

\*As letras sobrescritas representam os resultados do Teste de Tukey. Resultados significativamente iguais possuem a mesma letra ( $p > 0,05$ ).

\*\*\*O comparativo de dados foi realizado para cada coluna entre mesma enzima.

Para a indução de amilase e lipase, houve uma semelhança nos valores quantificados entre os fungos. Na indução de celulase, protease, xilanase e pectinase o *A. lippii*e URM-7547 foi significativamente superior, conforme o teste de Tukey, apresentando valores de IE de  $3,68 \pm 0,58$ ,  $2,59 \pm 0,26$ ,  $1,21 \pm 0,04$  e  $1,30 \pm 0,02$ , respectivamente, contra  $1,82 \pm 0,11$ ,  $1,43 \pm 0,13$ ,  $1,11 \pm 0,01$  e  $1,17 \pm 0,01$  do *T. reesei* CCT-2768, respectivamente.

Apesar dos fungos *A. lippii*e URM-7547 e *T. reesei* CCT-2768 terem apresentado atividade para lipase, não houve formação de um halo, indicando que a secreção de lipases foi suficiente apenas para suportar o crescimento fúngico, resultando em um IE = 1,0. Estatisticamente, o IE da amilase foi igual para ambos os fungos ( $p = 0,475$ ).

Santos *et al.* (2018a) utilizaram a técnica de plaqueamento direto para isolamento dos microrganismos de frutas em decomposição, obtendo 02 isolados, (identificados como A1 e A2) e avaliaram o potencial de produção de protease, amilase e celulase, e obtiveram valores idênticos de IE, sendo eles de 9,2, 6,0, e 4,8, respectivamente. Coelho *et al.* (2018) estudaram a produção de enzimas amilolíticas por 36 fungos isolados da compostagem e obtiveram como melhor resultado uma IE de 4,1.

Oliveira (2020) avaliou a o potencial de produção de enzimas celulolíticas através de IE de 6 espécies fúngicas para, em seguida, utilizar os que obtiveram melhores resultados em cultivo submerso. Os melhores resultados de IE para celulases foram de 2,32, 1,73 e 1,50, sendo o primeiro resultado de uma linhagem controle (CMIB-064) do fungo endofítico *Mucor* sp.

Jesus *et al.* (2018) avaliaram o potencial enzimático de 85 fungos endofíticos isolados de folhas de *Dipteryx alata*, e obtiveram resultados positivos para produção de amilase e lipases com os melhores resultados de atividades enzimáticas medidas pelo IE de 2,35 e 1,27, respectivamente, com o *Aspergillus* sp. Dentre os fungos endofíticos estudados estavam cepas

de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Cladosporium* sp. Ressalta-se o valor semelhante ao obtido pelo *A. lipppiae* URM-7547 para amilase e lipase de  $2,70 \pm 0,30$  e  $1,00 \pm 0,00$ , respectivamente.

Analisando o perfil enzimático de celulases, amilases e lipases de 42 cepas de rizóbios isolados do semiárido, Menezes *et al.* (2016) obtiveram os maiores resultados para IE de 2,615 para celulase (isolado L56), 5,197 de amilase (isolado L46) e 2,810 para lipase (isolado L74). O melhor valor de celulase foi menor que o produzido pelo *A. lipppiae* URM-7547.

Araújo *et al.* (2016) isolaram 25 fungos filamentosos com diferentes características da fermentação do cacau em Tucumã/PA, mas somente 4 apresentaram um IE satisfatório para produção de celulases, sendo eles de 3,0; 3,7; 2,1 e 4,0 dos fungos FF04, FF11, FF13 e FF18, respectivamente. O valor da produção de celulase pelo *A. lipppiae* URM-7547 de IE igual a  $3,68 \pm 0,58$  foi semelhante ao reportado por Araújo *et al.* (2016).

Fernandes (2009) utilizou 31 fungos isolados de alimentos e obteve como melhores resultados valores de IE de 4,25; 5,83 e 2,61 para amilase (*Penicillium verrucosum*), celulase (*Penicillium crustosum*), e protease (*Cladosporium cladosporioides*), respectivamente. Destaca-se o valor do potencial para produção de protease do *A. lipppiae* URM-7547 de 2,59, bem próximo ao obtido por Fernandes (2009). Ainda de acordo com esse autor, valores de  $IE \geq 2,0$  indicam que o fungo é um produtor potencial da enzima em meio sólido. Portanto, o *A. lipppiae* pode ser considerado um bom produtor de amilase, protease e celulase e pode ser utilizado na obtenção de enzimas hemicelulolíticas que propõe o objetivo geral deste trabalho.

## 5.2 Avaliação dos parâmetros cinéticos do *A. lipppiae* URM-7547 em meio líquido

O fungo *A. lipppiae* URM 7547 foi isolado, em um estudo anterior, por Viana (2017) com a ajuda do grupo pertencente ao LEB-UFRN e, foi citado na literatura em um único artigo (VIANA *et al.*, 2017), no qual trata somente sobre seu isolamento, sem informações sobre parâmetros cinéticos de crescimento. Dessa forma, fez-se necessário realizar um estudo prévio para avaliar algumas variáveis cinéticas antes do cultivo submerso exposto no item 4.4.

As variáveis utilizadas foram a composição do meio nutriente salino (1, 2 e 3), variando-se a fonte de nitrogênio e concentração de glicose e xilose presentes, como fonte principal de carbono. A cinética seguiu conforme metodologia apresentada no item 3.3.

As Figuras 19a e 19b apresentam o crescimento da biomassa celular em meio líquido contendo glicose e xilose, respectivamente, após 120 h de cultivo.

Avaliou-se a quantidade máxima de biomassa produzida ( $X_{m\acute{a}x}$ ), a concentração de substrato presente ao longo do cultivo no tempo de  $X_{m\acute{a}x}$  ( $S_{X_{m\acute{a}x}}$ ), o fator de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{x/s}$ ), a velocidade máxima de crescimento do *A. lippliae* URM-7547 durante a cinética ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ), e o pH ao final do cultivo.

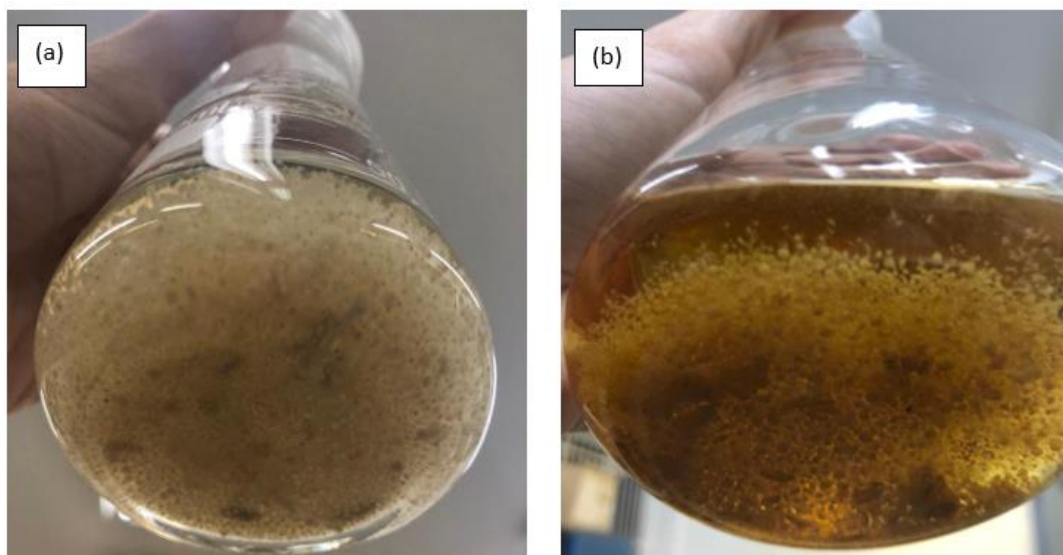


Figura 19 – Crescimento de biomassa celular em meio salino (tipo 3) a 30 °C contendo glicose (a) e xilose (b) em 120 h de cinética.

Fonte: A autora.

As Figuras 20, 21 e 22 apresentam os perfis cinéticos de biomassa celular em  $g.L^{-1}$  ( $X$ ) e substrato ( $S$ ). Com base nas Figuras 20a, 21a e 22a, que correspondem ao cultivo que utilizou como substrato principal a glicose, tem-se que  $X_{m\acute{a}x}$  foi alcançada na faixa de tempo de 96-120 h de cinética, diferentemente da  $X_{m\acute{a}x}$  obtida em um tempo de 144 h nos ensaios que utilizaram como fonte de carbono a xilose (Figuras 20b, 21b e 22b).

Nota-se também que os melhores meios salinos foram os 2 e 3, ambos semelhantes no perfil cinético e valores quantitativos  $X$  e  $S$ , tendo o meio 3 se sobressaído aos demais.

Resultados e discussão

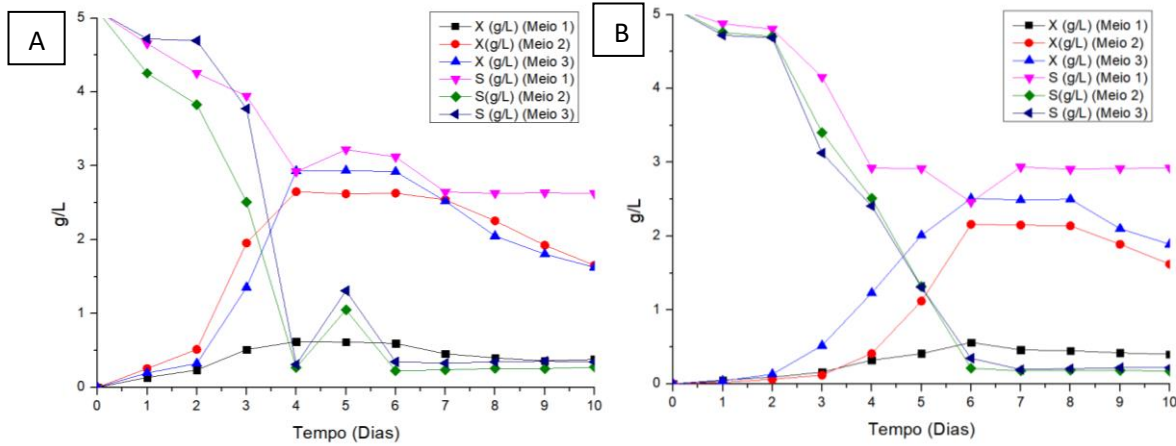


Figura 20 - Concentrações de substrato (S) e de biomassa celular (X) de *A. lipipiae* URM-7547, em função do tempo de cultivo com meios salinos diferentes e açúcares na concentração inicial de 5 g/L. A) Glicose B) Xilose

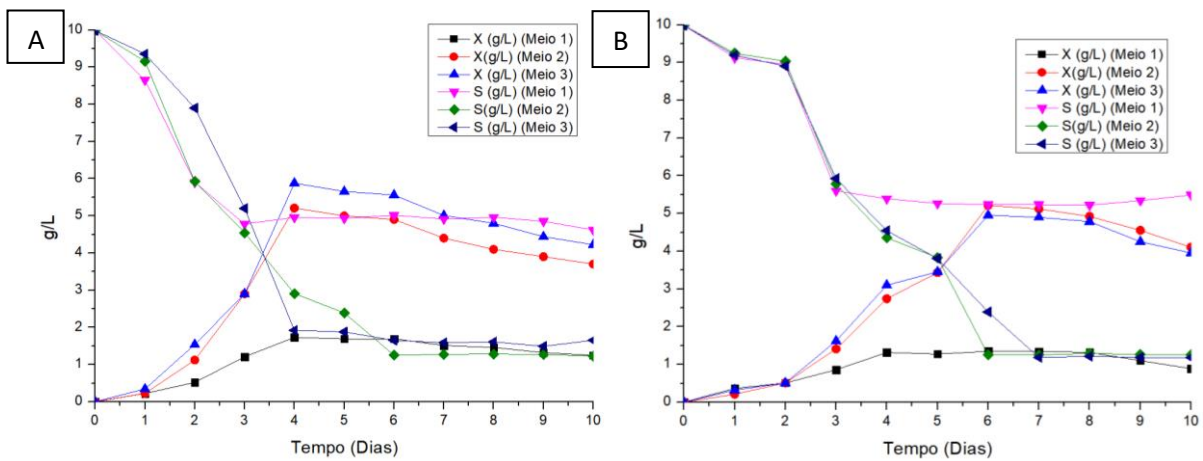


Figura 21 - Concentrações de substrato (S) e de biomassa celular (X) de *A. lipipiae* URM-7547, em função do tempo de cultivo com meios salinos diferentes e açúcares na concentração inicial de 10 g/L. A) Glicose B) Xilose

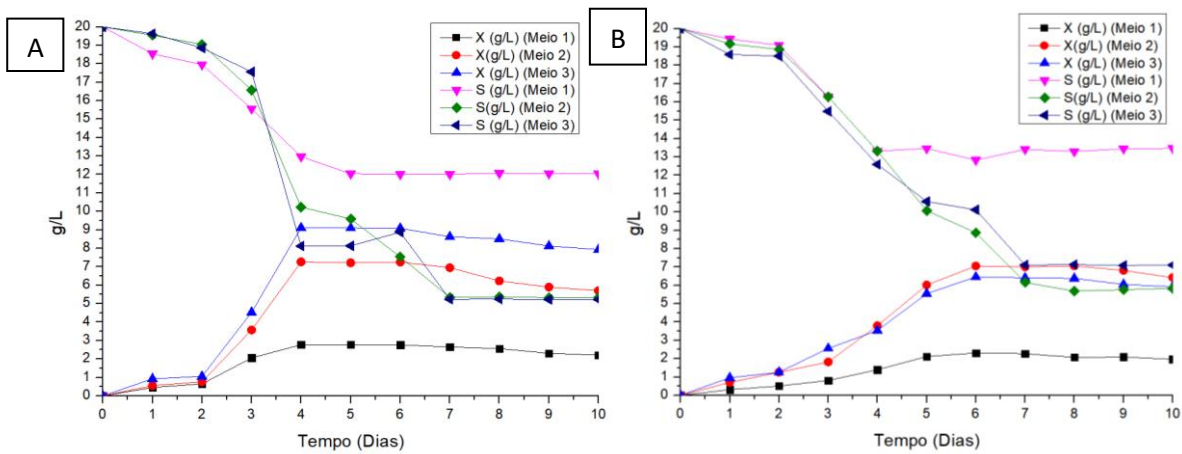


Figura 22 - Concentrações de substrato (S) e de biomassa celular (X) de *A. lipipiae* URM-7547, em função do tempo de cultivo com meios salinos diferentes e açúcares na concentração inicial de 20 g/L. A) Glicose B) Xilose

Segundo Schmidell Netto *et al.* (2001), não se pode afirmar que um estudo cinético do processo tenha sido realizado somente com a apresentação de valores iniciais e finais de X e S, é necessário traçar um perfil gráfico de crescimento celular e consumo de substrato e o conhecimento de valores intermediários, que permitam definir os perfis das curvas ou a forma matemática destas, para uma análise adequada do fenômeno sob o ponto de vista cinético.

Assim, conforme Schmidell Netto *et al.* (2001), tais perfis representam o ponto de partida para a descrição quantitativa de uma fermentação como, por exemplo, a identificação da duração do processo, geralmente baseada no instante em que X é máximo ( $X_{m\acute{a}x}$ ).

Avaliando-se as Figuras 20, 21 e 22, percebe-se as fases do crescimento fúngico. Schmidell Netto *et al.*, (2001), explica que, geralmente ocorrem 6 fases de crescimento para microrganismos filamentosos, como é o caso do *A. lipppiae* URM 7547, sendo elas lag, transição, linear, desaceleração, estacionário e declínio (lise); os diferenciando de bactérias que, além das seis fases, apresentam uma fase logarítmica antes da linear.

Observa-se nas Figuras 20a, 21a e 22a, que corresponde ao cultivo utilizando glicose como fonte de carbono, uma diferença nos tempos de cada fase comparando-os com os das Figuras 20b, 21b e 22b, referentes ao cultivo com xilose.

Para as Figuras 20a, 21a e 22a, a fase lag ocorre até  $t = 24h$ , de transição em  $24 h < t < 48 h$ , linear ocorre em  $48 h < t < 96 h$  alcançando seu  $X_{m\acute{a}x}$ , a desaceleração ocorre próximo às 96h, a estacionária em  $120 h < t < 144 h$  e, após 144 h, ocorre o declínio. Já para os perfis apresentados nas Figuras 20b, 21b e 22b com cultivo com xilose, a fase lag ocorre em  $0 < t < 24 h$ , de transição em  $24 h < t < 48 h$ , linear ocorre em  $48 h < t < 144 h$  alcançando seu  $X_{m\acute{a}x}$  mais tardiamente que no cultivo com glicose, a desaceleração ocorre em  $144 h < t < 168 h$ , a estacionária em  $168 h < t < 192 h$  e após 192 h ocorre o declínio.

Para um melhor comparativo de resultados, as Tabelas 6 e 7 apresentam uma análise mais detalhada e as diferenças estatísticas significativas entre as médias dos resultados obtidos nos experimentos, utilizando o teste de Tukey, para avaliação de parâmetros cinéticos do *A. lipppiae* URM 7547 em crescimento em meio líquido.

Tabela 6 – Valores de  $X_{m\acute{a}x}$ ,  $S_{Xm\acute{a}x}$ ,  $\mu_{m\acute{a}x}$  e  $Y_{x/s}$ , obtidos nos experimentos para avaliação do meio de cultivo e concentração de glicose.

Ensaio	Meio	[Glicose] <sup>0</sup> (g/L)	$X_{m\acute{a}x}$ (g.L <sup>-1</sup> )	$S_{Xm\acute{a}x}$ (g.L <sup>-1</sup> )	$Y_{x/s}$ (g.g <sup>-1</sup> )	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h <sup>-1</sup> )	pH final
A <sub>G</sub>	1	5,0	0,61±0,13 <sup>a</sup>	2,92±0,11 <sup>i</sup>	0,29±0,04 <sup>p</sup>	0,032±0,003 <sup>s</sup>	2,73±0,08 <sup>x</sup>
B <sub>G</sub>	1	10,0	1,75±0,08 <sup>b</sup>	4,95±0,15 <sup>j</sup>	0,34±0,06 <sup>p</sup>	0,035±0,002 <sup>s</sup>	2,51±0,11 <sup>x</sup>
C <sub>G</sub>	1	20,0	2,77±0,07 <sup>c</sup>	12,96±0,08 <sup>k</sup>	0,39±0,03 <sup>p</sup>	0,039±0,003 <sup>t</sup>	2,64±0,07 <sup>x</sup>
D <sub>G</sub>	2	5,0	2,65±0,09 <sup>c</sup>	0,27±0,04 <sup>l</sup>	0,56±0,03 <sup>q</sup>	0,055±0,002 <sup>u</sup>	4,71±0,09 <sup>y</sup>
E <sub>G</sub>	2	10,0	5,21±0,07 <sup>d</sup>	2,91±0,05 <sup>j</sup>	0,73±0,06 <sup>r</sup>	0,060±0,003 <sup>v</sup>	4,23±0,12 <sup>z</sup>
F <sub>G</sub>	2	20,0	7,26±0,06 <sup>e</sup>	10,23±0,12 <sup>m</sup>	0,74±0,05 <sup>r</sup>	0,065±0,002 <sup>v</sup>	4,56±0,08 <sup>y</sup>
G <sub>G</sub>	3	5,0	2,93±0,08 <sup>f</sup>	0,31±0,09 <sup>l</sup>	0,62±0,04 <sup>q</sup>	0,059±0,003 <sup>u</sup>	4,85±0,06 <sup>y</sup>
H <sub>G</sub>	3	10,0	5,88±0,11 <sup>g</sup>	1,92±0,07 <sup>n</sup>	0,72±0,04 <sup>r</sup>	0,066±0,003 <sup>v,w</sup>	4,74±0,08 <sup>y</sup>
I <sub>G</sub>	3	20,0	9,11±0,07 <sup>h</sup>	8,12±0,09 <sup>o</sup>	0,76±0,03 <sup>r</sup>	0,071±0,004 <sup>w</sup>	4,69±0,07 <sup>y</sup>

\*[Glicose]<sup>0</sup> – Concentração inicial de glicose.

\*\*As letras sobrescritas representam os resultados do teste de Tukey. Resultados significativamente iguais ( $p > 0,05$ ) possuem a mesma letra.

\*\*\*O comparativo de dados foi realizado para cada coluna entre mesma variável ( $X_{m\acute{a}x}$ ,  $S_{Xm\acute{a}x}$ ,  $Y_{x/s}$  e  $\mu_{m\acute{a}x}$ ).

Para a concentração inicial de 5,0 g/L de glicose, o percentual de consumo de açúcar foi significativamente semelhante ( $p > 0,05$ ) para os meios 2 e 3, sendo ele de aproximadamente 93%, e, para o meio 1, diferente ( $p < 0,05$ ) e abaixo dos demais, com valor de 41,6% de substrato consumido em relação à quantidade inicial. Nota-se ainda que, o meio 1 foi o que apresentou o menor percentual de consumo de S nas três concentrações de açúcar estudadas, tornando-o o menos favorável para o crescimento do *A. lipppiae* URM 7547.

Conforme a Tabela 6, o meio 3 apresentou, nas concentrações de 10,0 e 20,0 g/L de [glicose]<sup>0</sup>, um consumo de 80,8% e 59,4%, respectivamente, em relação à quantidade de substrato (S) inicial, sendo superiores ( $p < 0,05$ ) ao meio 1, que apresentou percentuais de 50,5% e 35,2%; e ao meio 2 com percentuais de 70,9% e 48,8%, sob mesmas condições.

Os maiores percentuais de consumo de açúcares (S) foram nos ensaios H e I; e possibilitaram um maior crescimento na concentração de biomassa celular ( $X_{m\acute{a}x}$ ). Logo, admite-se que, para o *A. lipppiae* URM 7547, ambas as variáveis (X e S) se equivalem em termos de relevância como variáveis cinéticas.

Com relação ao rendimento de consumo de substrato por crescimento celular ( $Y_{x/s}$ ) tem-se que os ensaios E<sub>G</sub>, F<sub>G</sub>, H<sub>G</sub> e I<sub>G</sub> foram os melhores e apresentaram resultados significativamente equivalentes ( $p > 0,05$ ) de  $0,73 \pm 0,06$ ,  $0,74 \pm 0,05$ ,  $0,72 \pm 0,04$  e  $0,76 \pm 0,03$  g.g<sup>-1</sup>, respectivamente; seguidos pelos ensaios D<sub>G</sub> e G<sub>G</sub> ( $p > 0,05$ ) com resultados de  $0,56 \pm 0,03$  e  $0,62 \pm 0,04$  g.g<sup>-1</sup>. Os menores rendimentos foram para o meio 1, ensaios A, B e C, com valores de  $0,29 \pm 0,04$ ,  $0,34 \pm 0,06$  e  $0,39 \pm 0,03$  g.g<sup>-1</sup>, respectivamente.

As melhores velocidades máximas de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) do *A. lippiae* URM 7547 foram adquiridas ao longo dos ensaios H e I ( $p > 0,05$ ), com valores de  $0,066 \pm 0,003$  e  $0,071 \pm 0,004$   $\text{h}^{-1}$ , respectivamente; E e F ( $p > 0,05$ ), com valores obtidos de  $\mu_{\text{máx}}$  de  $0,060 \pm 0,003$  e  $0,065 \pm 0,002$   $\text{h}^{-1}$ , respectivamente, sendo o Ensaio F, também, significativamente igual ao ensaio H.

Os melhores resultados obtidos pelo meio 3 deve-se ao fato de o mesmo apresentar duas fontes de nitrogênio, peptona e extrato de levedura, a mais que os meios 1 e 2.

Ressalta-se, ainda, que ao se observar os resultados, considerando mesmo meio salino, tem-se que o  $Y_{x/s}$  e a  $\mu_{\text{máx}}$  aumentaram à medida que se aumentou a concentração de glicose, assim o crescimento do *A. lippiae* URM 7547 está limitada à concentração de substrato e fonte de carbono presente, conforme modelo clássico de Monod. Provavelmente, um fator também limitante de crescimento do fungo *A. lippiae* URM 7547 seja o oxigênio presente, por ele ser endofítico e viver sob condições de aeração amenas, contudo, não houve nenhuma variável nos ensaios que envolvesse tal constatação.

O meio 1, composto por apenas um fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), apresentou uma baixa tamponação, obtendo um pH final médio de  $2,63 \pm 0,09$  e, dentre os demais meios (2 e 3), compostos com uma combinação de dois fosfatos de potássio, foi o que o *A. lippiae* URM-7547 menos se adequou, proporcionando resultados menores de conversão de substrato em células.

Abdel-Azeem *et al.* (2016) explicaram que por mais que espécies fúngicas filamentosas se adequem mais do que bactérias em diferentes condições de meio, temperatura e pH, o gênero *Chaetomium/Achaetomium* apresenta dificuldade para crescimento e multiplicação em meios ácidos ( $\text{pH} < 4,0$ ). Além disso, conforme Schmidell Netto *et al.* (2001), um determinado valor de pH é considerado melhor que um outro, ao se ter o  $Y_{x/s}$  (fator de conversão de substrato em biomassa) maior no primeiro que no segundo caso. Logo, avaliando-se o valor de  $Y_{x/s}$  nos três meios, conclui-se que o resultado insatisfatório para o meio 1 está associado diretamente à redução do pH durante o cultivo.

Marchioro (2018), ao testar a influência de substrato e pH inicial sobre a produção microbiana do fungo endofítico *Lasiodiplodia theobromae*, em melaço de soja, encontrou como melhor resultado de conversão de substrato em biomassa o valor de  $0,50 \text{ g.g}^{-1}$  em condições de  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de melaço de soja e pH 4,0, 96 horas e  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Valor semelhante aos encontrados neste trabalho para o *A. lippiae* URM 7547. Reginatto *et al.* (2015) utilizaram o fungo endofítico *Aspergillus fumigatus* para quantificar parâmetros cinéticos em um meio contendo inóculo vegetativo e obteve, em 120 h e  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , um  $\mu_{\text{máx}}$  de  $0,09 \text{ h}^{-1}$  e  $0,76 \text{ g.g}^{-1}$  de fator de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{x/s}$ ). Benevides *et al.* (2015), ao avaliarem o potencial da utilização de frutas típicas do semiárido potiguar como fonte de substrato na

fermentação alcoólica, reportaram como parâmetros cinéticos para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* um  $\mu_{\text{máx}}$  de 0,063 h<sup>-1</sup> para polpa de melão, 0,044 h<sup>-1</sup> para polpa + entrecasca e 0,055 h<sup>-1</sup> para polpa + casca.

Bacchin *et al.* (2010) quantificaram indiretamente o crescimento do *Aspergillus niger* em meio salino descrito por Mandels (1976) idêntico ao meio A deste estudo com 30,0 g/L de glicose e obtiveram resultados de  $\mu_{\text{máx}}$  igual a 0,034 h<sup>-1</sup> e  $Y_{x/s}$  de 0,29 g.g<sup>-1</sup>, valores bem semelhantes aos reportados na Tabela 6 para o meio 1.

Gern (2005) avaliou meios de cultivo para produção de biomassa e polissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* DSM-183,3, fungo de podridão branca, em cultivos submersos e relatou como melhores resultados um  $Y_{x/s}$  igual de 0,63 ± 0,06 g.g<sup>-1</sup> e  $\mu_{\text{máx}}$  igual a 0,042 ± 0,003 h<sup>-1</sup> em meio contendo extrato de trigo como substrato. A velocidade encontrada foi inferior para o melhor meio do presente estudo e pode estar atrelada ao fato de que o substrato era uma biomassa lignocelulósica sem açúcares livres, dificultando a ação do microrganismo, diminuindo sua velocidade de crescimento, além de *A. lippii* URM 7547 ser um fungo fastidioso.

Cunha *et al.* (2003), ao realizarem um estudo experimental e modelagem do crescimento de fungos filamentosos termorresistentes em sucos tropicais, quantificaram a velocidade de crescimento dos fungos *Neosartorya fischeri* e *Byssoschlamys nivea* em suco de abacaxi a 30 °C e reportaram, valores de  $\mu_{\text{máx}}$  iguais a 0,05 ± 0,02 h<sup>-1</sup> e 0,09 ± 0,01 h<sup>-1</sup> para os dois fungos, respectivamente.

A Tabela 7 apresenta os resultados referentes ao cultivo utilizando a xilose. Fez-se necessário o uso da xilose para entender os parâmetros cinéticos envolvidos em seu consumo e a adaptação de *A. lippii* URM-7547 na presença de tal açúcar.

Tabela 7 – Valores de  $X_{m\acute{a}x}$ ,  $S_{Xm\acute{a}x}$ ,  $\mu_{m\acute{a}x}$  e  $Y_{x/s}$ , obtidos nos experimentos para avaliação do meio de cultivo e concentração de xilose.

Ensaio	Meios	[Xilose] <sup>0</sup> (g/L)	$X_{m\acute{a}x}$ (g.L <sup>-1</sup> )	$S_{Xm\acute{a}x}$ (g.L <sup>-1</sup> )	$Y_{x/s}$ (g.g <sup>-1</sup> )	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h <sup>-1</sup> )	pH final
A <sub>x</sub>	1	5,0	0,56±0,03 <sup>a</sup>	2,46±0,11 <sup>i</sup>	0,22±0,03 <sup>p</sup>	0,018 ± 0,003 <sup>s</sup>	2,31 ± 0,06 <sup>w</sup>
B <sub>x</sub>	1	10,0	1,34 ± 0,08 <sup>b</sup>	5,23 ± 0,15 <sup>j</sup>	0,28 ± 0,04 <sup>p</sup>	0,021 ± 0,002 <sup>s</sup>	2,42 ± 0,05 <sup>w</sup>
C <sub>x</sub>	1	20,0	2,30 ± 0,07 <sup>c</sup>	12,83 ± 0,08 <sup>k</sup>	0,32 ± 0,04 <sup>p</sup>	0,034 ± 0,003 <sup>t</sup>	2,23 ± 0,06 <sup>x</sup>
D <sub>x</sub>	2	5,0	2,16 ± 0,09 <sup>c</sup>	0,21 ± 0,06 <sup>l</sup>	0,45 ± 0,06 <sup>q</sup>	0,038 ± 0,004 <sup>t</sup>	4,47 ± 0,18 <sup>y</sup>
E <sub>x</sub>	2	10,0	4,82 ± 0,07 <sup>d</sup>	1,18 ± 0,05 <sup>m</sup>	0,54 ± 0,06 <sup>q</sup>	0,042 ± 0,003 <sup>t</sup>	4,69 ± 0,09 <sup>y</sup>
F <sub>x</sub>	2	20,0	7,05±0,06 <sup>e</sup>	8,87 ±0,12 <sup>n</sup>	0,63±0,08 <sup>r</sup>	0,046 ± 0,003 <sup>u</sup>	4,38 ± 0,14 <sup>y</sup>
G <sub>x</sub>	3	5,0	2,51 ± 0,08 <sup>c</sup>	0,35 ± 0,09 <sup>l</sup>	0,52 ± 0,08 <sup>q</sup>	0,042 ± 0,003 <sup>t</sup>	4,76 ± 0,11 <sup>y</sup>
H <sub>x</sub>	3	10,0	5,26 ± 0,11 <sup>f</sup>	1,22 ± 0,07 <sup>m</sup>	0,59 ± 0,09 <sup>q</sup>	0,048±0,002 <sup>u</sup>	4,62 ± 0,06 <sup>y</sup>
I <sub>x</sub>	3	20,0	6,45 ± 0,07 <sup>g</sup>	10,12 ± 0,09 <sup>o</sup>	0,65 ± 0,03 <sup>r</sup>	0,059 ± 0,004 <sup>v</sup>	4,43 ± 0,05 <sup>y</sup>

\*[Xilose]<sup>0</sup> – Concentração inicial de xilose.

\*\*As letras sobrescritas representam os resultados do teste de Tukey. Resultados significativamente iguais ( $p > 0,05$ ) possuem a mesma letra.

\*\*\*O comparativo de dados foi realizado para cada coluna entre mesma variável ( $X_{m\acute{a}x}$ ,  $S_{Xm\acute{a}x}$ ,  $Y_{x/s}$  e  $\mu_{m\acute{a}x}$ ).

Em relação ao percentual de consumo de substrato (Tabela 7) ao longo da cinética, o meio 3 apresentou percentuais de 93%, 87,8% e 48,9% em relação a [xilose]<sup>0</sup> de 5,0 g/L (Ensaio G<sub>x</sub>), 10,0 g/L (Ensaio H<sub>x</sub>) e 20,0 g/L (Ensaio I<sub>x</sub>), respectivamente. Igualmente, a cinética utilizando a glicose como fonte principal de carbono (Tabela 7), o Ensaio G<sub>x</sub> apresentou um percentual de consumo de substrato (S) significativamente igual ( $p > 0,05$ ) ao Ensaio D<sub>x</sub>, que utiliza o meio 2, ambos com mesma concentração inicial de xilose. Os ensaios E<sub>x</sub> (meio 2) e H<sub>x</sub> (meio 3) também apresentaram o mesmo percentual em consumo de xilose.

Com base na Tabela 7, observou-se menores resultados de  $Y_{x/s}$  e  $\mu_{m\acute{a}x}$  em comparação aos descritos na Tabela 6. Os valores de  $Y_{x/s}$  para o meio 3 foram de  $0,52 \pm 0,08$ ,  $0,59 \pm 0,09$  e  $0,65 \pm 0,03$  g.g<sup>-1</sup> para 5, 10 e 20 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, em um tempo de cultivo de 144 h (Figuras 20b, 21b e 22b), superior ao tempo de cultivo utilizando glicose (Figuras 20a, 21a e 22a).

A velocidade específica máxima ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) para o meio 3 foi de  $0,042 \pm 0,003$ ,  $0,048 \pm 0,002$  e  $0,059 \pm 0,004$  h<sup>-1</sup> para 5, 10 e 20 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os valores inferiores referentes aos da Tabela 7 mostram que o *A. lippii* URM-7547 apresenta dificuldade em consumir a xilose ao comparar com o consumo de glicose. Em geral, a metabolização da xilose e xilulose é mais lenta que a da glicose pois ocorre por meio de duas vias distintas: a via de um passo, catalisada pela enzima xilose isomerase (XI), típica de bactérias; e a via de dois passos, catalisada pelas enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), geralmente encontrada em fungos filamentosos e/ou leveduras. Após, a xilulose é fosforilada pela enzima xiluloquinase (XK) a

xilulose-5-fosfato, a qual é catabolizada pela via das pentoses fosfato (PPP) e subsequentemente pelas vias glicolíticas, no qual é realizado a conversão a piruvato, responsável por originar o etanol por meio de duas reações sequenciais – descarboxilação e redução (HERRERA, 2021; SILVA *et al.*, 2019a).

Segundo Gern (2005), a peptona e o extrato de levedura representam aproximadamente 45% a mais no valor do meio de cultivo, encarecendo-o quando se objetiva a transferência de tecnologia com menores custos para o setor industrial. Logo, por mais que o meio 3 tenha sido superior ao meio 2 em algumas condições operacionais e variáveis cinéticas, optou-se pelo segundo meio para a produção de celulasas e xilanases por FSm já que os seus resultados também foram favoráveis e significativos.

Assim, conforme apresentado, o *A. lipppiae* URM-7547 apresentou uma excelente adaptação ao cultivo em meio líquido, o que permite sua avaliação em FSm para produção de enzimas.

### 5.3 Caracterização lignocelulósica

No presente estudo, a fibra de coco verde foi utilizada após ser pré-tratada por explosão a vapor, para produção de celulasas e xilanase. Entretanto, inicialmente, efetuou-se a caracterização desse resíduo. A Figura 23 apresenta imagens da fibra de coco verde *in natura* e após o pré-tratamento com explosão a vapor.

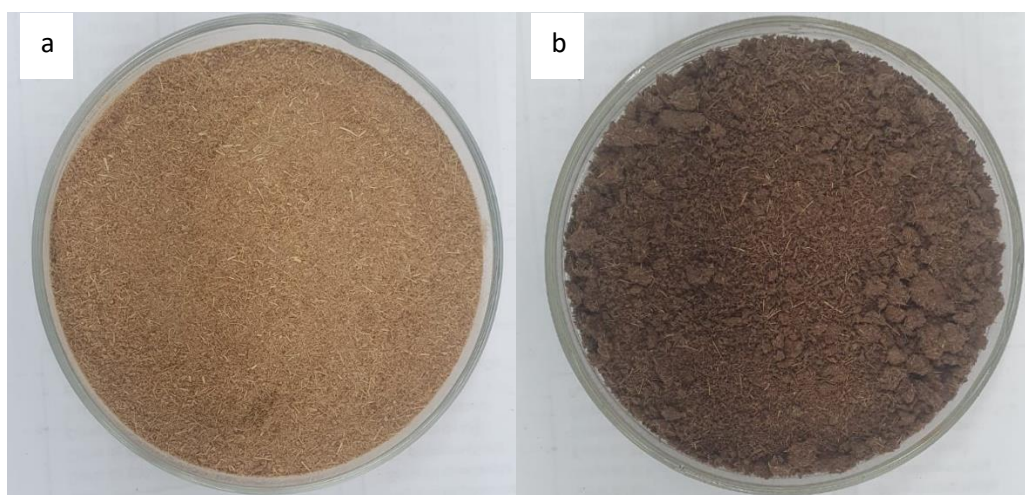


Figura 23 - Fibra de coco verde *in natura* (a) e após pré-tratamento com explosão a vapor (b).  
Fonte: A autora

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos na caracterização da fibra de coco *in natura* e pré-tratada por explosão a vapor.

Tabela 8 – Composição química da fibra da casca do coco verde *in natura* e pré-tratada por explosão a vapor (10 min a 210 °C). Valores em base seca, exceto a umidade.

Fonte: A autora.

Componentes	Composição mássica (%)	
	<i>in natura</i>	Pré-tratada por explosão a vapor
Umidade	6,39 ± 0,31 <sup>a</sup>	7,85 ± 0,71 <sup>b</sup>
Cinzas	3,46 ± 0,27 <sup>c</sup>	3,68 ± 0,41 <sup>c</sup>
Extraíveis	19,35 ± 0,93 <sup>d</sup>	5,77 ± 0,84 <sup>e</sup>
Celulose	31,71 ± 1,67 <sup>f</sup>	39,62 ± 1,23 <sup>g</sup>
Hemicelulose	16,45 ± 1,12 <sup>h</sup>	10,24 ± 0,78 <sup>i</sup>
Lignina	36,05 ± 1,96 <sup>j</sup>	34,54 ± 1,55 <sup>j</sup>

\*As letras sobrescritas representam os resultados do teste de Tukey. Resultados significativamente iguais (p > 0,05) possuem a mesma letra.

Ao observar os valores de composição mássica (%) obtidos, verifica-se que os teores de celulose e hemicelulose após o pré-tratamento são satisfatórios para a indução enzimática de celulasas e hemicelulasas bem como para fontes de açúcares fermentescíveis visando à produção de etanol de segunda geração. O baixo teor de cinzas para a amostra *in natura* e pré-tratada é vantajoso pois, segundo Pitarello (2013), o alto teor de cinzas está associado diretamente à diminuição do potencial energético da biomassa lignocelulósica.

Um dos maiores percentuais na composição mássica da fibra *in natura*, além dos polissacarídeos estão os extraíveis que compreendem uma grande variedade de substâncias químicas, tais como: terpenos/terpenóides, gorduras/ceras e vários compostos fenólicos. A soma destes componentes varia em cada espécie de material lignocelulósico e representa aproximadamente 5-20% de todo o material (NOGUEIRA, 2017).

O pré-tratamento por explosão a vapor atua principalmente removendo a hemicelulose, como pode se observar nos valores apresentados na Tabela 8 e, conseqüentemente, há um aumento da celulose, já que a fibra fica exposta, facilitando, posteriormente, o uso desse material para fins que envolvam o uso desse carboidrato. Além disso, a lignina tem uma pequena remoção, pois ela sofre um processo de rearranjo e se re-deposita. Assim, em processo visando à produção de etanol de segunda geração, sua remoção se dá combinando-se com pré-tratamento alcalino.

Com base na Tabela 8, o pré-tratamento com explosão a vapor removeu a hemicelulose da fibra de coco verde em torno de 40% em relação a seu valor inicial (*in natura*), obtendo um valor de composição mássica final igual a 10,24%. Com relação a celulose, houve um aumento

de 40% com relação ao valor da fibra *in natura* que estava com um teor inicial de 31,71%. Ressalta-se, ainda, que a remoção dos demais componentes da biomassa pré-tratada ocasionou uma diminuição no teor de extraíveis residuais em 70%, apresentando uma composição mássica ao final do pré-tratamento de 5,77%, menor que à fibra *in natura* que demonstrou um teor de 19,35%. Ressalta-se que, devido a metodologia utilizada, a biomassa *in natura* utilizada na determinação dos polímeros estava livre de extraíveis.

Teixeira *et al.* (2018), ao analisarem a eficiência do pré-tratamento por explosão a vapor da fibra do mesocarpo do coco com diferentes tempos de reação e temperatura, encontraram valores para composição mássica (%) da fibra do coco *in natura* de 45,50; 13,16; 45,44; 0,78 e 2,44% para celulose, hemicelulose, lignina, cinzas e extraíveis, respectivamente. Os resultados de extraíveis para a fibra *in natura* foi baixo pois o autor utilizou uma pré-lavagem na mesma antes de submetê-la ao pré-tratamento. Em condição semelhante à utilizada no presente estudo (10 minutos a 205 °C), estes autores reportaram valores para composição mássica da fibra do coco após pré-tratamento 58,03; 1,55; 48,42; 0,42 e 0,0% para celulose, hemicelulose, lignina, cinzas e extraíveis, respectivamente.

Nogueira (2017), em seu estudo sobre a avaliação do uso de tensoativos nos pré-tratamentos ácido e alcalino diluídos da casca do coco verde, encontrou resultados para composição mássica da casca do coco verde *in natura* de 32,79; 15,97; 35,70; 3,63 e 16,47% para celulose, hemicelulose, lignina, cinzas e extraíveis, respectivamente. Os valores encontrados por Nogueira (2017) foram semelhantes aos encontrados neste estudo.

No pré-tratamento com explosão a vapor ocorre a auto-hidrólise da biomassa através da penetração do vapor condensado no interior da fibra e logo após a descompressão promove a ruptura da fibra da biomassa lignocelulósica (TEIXEIRA *et al.*, 2018). A temperatura e o tempo de reação neste tipo de pré-tratamento são de suma importância, já que, ao mudar esses dois parâmetros, há uma mudança na composição mássica, físico-química e lignocelulolítica final da biomassa. Ribeiro *et al.*, (2019), em estudo com pré-tratamento de explosão a vapor utilizando casca de coco verde como biomassa, obtiveram diferentes resultados de celulose, hemicelulose e lignina ao testar três temperaturas (140, 175 e 210 °C) com 10 minutos de reação, sendo eles de 29,73, 16,53 e 30,83%, respectivamente, para 140 °C; 30,55, 13,24 e 32,81%, respectivamente, para 175 °C; e como melhor resultado, 34,61, 11,29 e 31,69%, respectivamente, para 210 °C.

#### 5.4 Avaliação da produção de celulases e xilanase da fermentação submersa (FSm)

Após a definição do meio salino de cultivo que apresentou o melhor rendimento e custo/benefício (meio 2) e, com o intuito de determinar a condição mais favorável para a produção de celulases e xilanase pelo *A. lippii* URM 7547 utilizando FSm, foram realizados ensaios variando-se a temperatura (°C), a concentração do inóculo (esporos/mL) e concentração (g/L) da fibra de coco verde pré-tratada em explosão a vapor (210 °C, 10 minutos).

As Figuras 24, 25, 26 e 27 apresentam os perfis cinéticos de produção de FPase, CMCase, celobiase e xilanase, respectivamente. Nota-se que há uma semelhança entre os perfis de FPase e CMCase e de celobiase e xilanase. Para FPase e CMCase, o tempo em que ocorreu a atividade enzimática máxima foi entre 120-144 h (5-6 dias) de fermentação, já para celobiase e xilanase, o tempo foi mais curto, em torno de 96-160 h (4-5 dias).

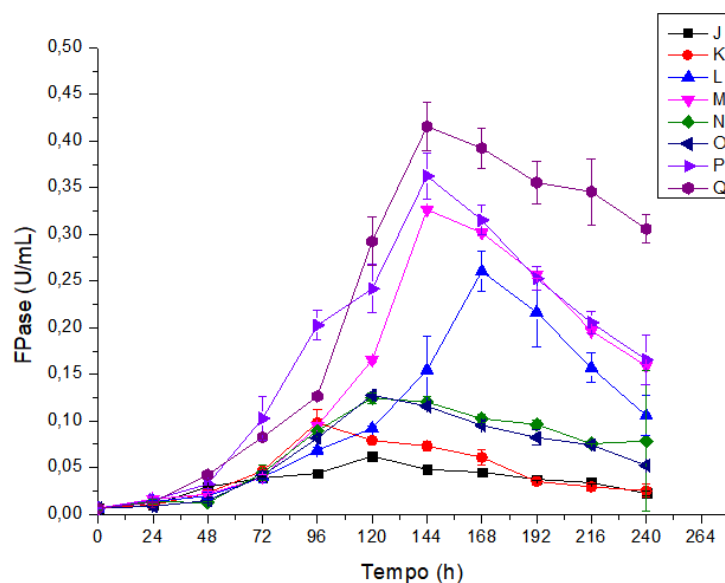


Figura 24 – Perfis cinéticos de produção de FPase pelo fungo *A. lippii* URM-7547 em fermentação submersa utilizando como substrato fibra de coco verde pré-tratada em explosão a vapor.

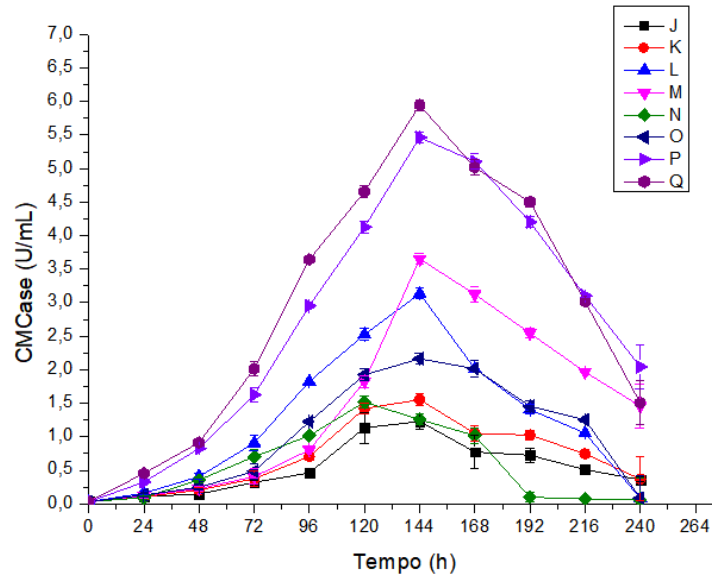


Figura 25 – Perfis cinéticos de produção de CMCase pelo fungo *A. lippii* URM-7547 em fermentação submersa utilizando como substrato fibra de coco verde pré-tratada em explosão a vapor.

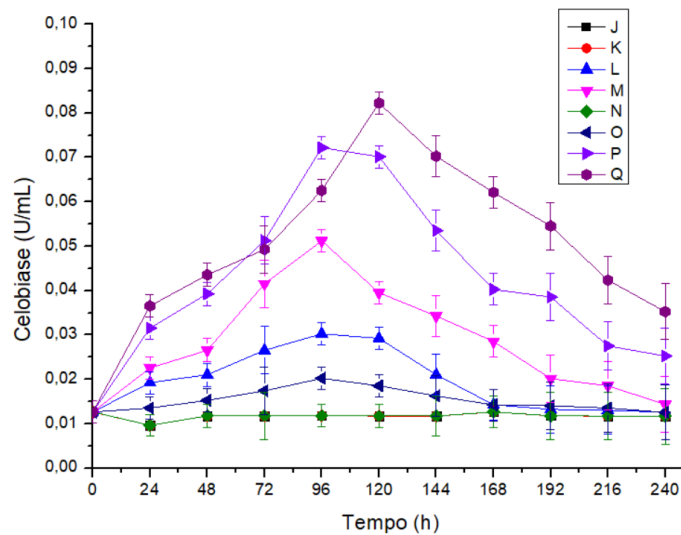


Figura 26 – Perfis cinéticos de produção de celobiase pelo fungo *A. lippii* URM-7547 em fermentação submersa utilizando como substrato fibra de coco verde pré-tratada em explosão a vapor.

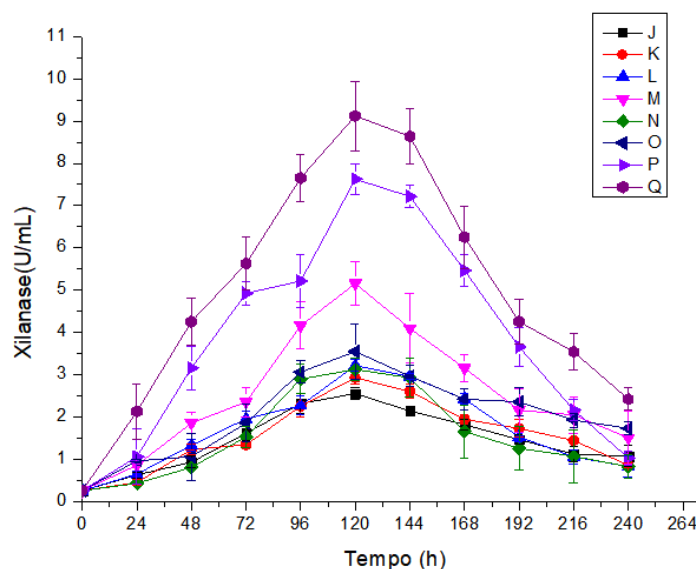


Figura 27 – Perfis cinéticos de produção de xilanase pelo fungo *A. lippii* URM-7547 em fermentação submersa utilizando como substrato fibra de coco verde pré-tratada em explosão a vapor.

Segundo Rigo *et al.*, (2021), o tempo de produção máxima de celulasas e xilanases está atrelado diretamente à rota que o fungo percorre no material lignocelulósico. Com a lignina modificada pós pré-tratamento por explosão a vapor, o fungo consegue atravessá-la com maior facilidade, entrando em contato, primeiramente, com a hemicelulose presente em cadeias complexas de açúcares, fazendo-se necessário a produção de enzimas xilanolíticas antes da produção de enzimas celulolíticas, logo, obtendo um tempo menor de produção para xilanase.

A Tabela 9 apresenta os resultados das atividades enzimáticas máximas (U/mL) para FPase, CMCCase, celobiase e xilanase.

Tabela 9 – Atividade enzimática máxima de FPase, CMCCase, celobiase e xilanase produzida por *A. lipppiae* URM-7547 em cultivo submerso variando-se as condições iniciais de temperatura (°C), concentração de inóculo (esporos/mL) e concentração de substrato (g/L).

Ensaio	T (°C)	[ ] (esporos/mL)	Substrato (g/L)	FPase (U/mL)	CMCase (U/mL)	Celobiase (U/mL)	Xilanase (U/mL)
J	28,0	1,0x10 <sup>5</sup>	10,0	0,06 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,23 ± 0,11 <sup>e</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>j</sup>	2,54 ± 0,18 <sup>l</sup>
K	28,0	1,0x10 <sup>5</sup>	30,0	0,09 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,54 ± 0,16 <sup>e</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>j</sup>	2,91 ± 0,24 <sup>m</sup>
L	<b>28,0</b>	<b>1,0x10<sup>9</sup></b>	<b>10,0</b>	<b>0,26 ± 0,14<sup>b</sup></b>	<b>3,13 ± 0,25<sup>f</sup></b>	<b>0,03 ± 0,01<sup>k</sup></b>	<b>3,21 ± 0,30<sup>m</sup></b>
M	<b>28,0</b>	<b>1,0x10<sup>9</sup></b>	<b>30,0</b>	<b>0,32 ± 0,10<sup>b</sup></b>	<b>3,65 ± 0,22<sup>f</sup></b>	<b>0,05 ± 0,02<sup>k</sup></b>	<b>5,15 ± 0,34<sup>n</sup></b>
N	33,0	1,0x10 <sup>5</sup>	10,0	0,12 ± 0,07 <sup>c</sup>	1,51 ± 0,26 <sup>g</sup>	0,01 ± 0,02 <sup>j</sup>	3,12 ± 0,26 <sup>m</sup>
O	33,0	1,0x10 <sup>5</sup>	30,0	0,21 ± 0,08 <sup>c</sup>	2,16 ± 0,34 <sup>h</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>j</sup>	3,54 ± 0,32 <sup>m</sup>
P	<b>33,0</b>	<b>1,0x10<sup>9</sup></b>	<b>10,0</b>	<b>0,36 ± 0,06<sup>d</sup></b>	<b>5,46 ± 0,48<sup>i</sup></b>	<b>0,07 ± 0,03<sup>k</sup></b>	<b>7,62 ± 0,66<sup>o</sup></b>
Q	<b>33,0</b>	<b>1,0x10<sup>9</sup></b>	<b>30,0</b>	<b>0,41 ± 0,08<sup>d</sup></b>	<b>5,94 ± 0,31<sup>i</sup></b>	<b>0,08 ± 0,04<sup>k</sup></b>	<b>9,12 ± 0,28<sup>p</sup></b>

\*As letras sobrescritas representam os resultados do teste de Tukey. Resultados significativamente iguais ( $p > 0,05$ ) possuem a mesma letra.

Os melhores resultados para FPase e CMCCase foram os apresentados nos Ensaio P e Q, sendo ambos significativamente iguais ( $p > 0,05$ ), com valores de  $0,36 \pm 0,06$ ,  $0,41 \pm 0,08$  U/mL para FPase, respectivamente; e  $5,46 \pm 0,48$  e  $5,94 \pm 0,31$  U/mL para CMCCase, respectivamente.

Para a celobiase, os melhores resultados foram dos ensaios L, M, P e Q, sendo eles equivalentes ( $p > 0,05$ ) com valores de  $0,03 \pm 0,01$ ,  $0,05 \pm 0,02$ ,  $0,07 \pm 0,03$  e  $0,08 \pm 0,04$  U/mL, respectivamente. Já para a xilanase, o Ensaio Q se sobressaiu com um valor obtido de  $9,12 \pm 0,28$  U/mL, estatisticamente diferente de todos os outros ensaios ( $p < 0,05$ ). Ressalta-se ainda que, o Ensaio Q foi realizado na condição de 33°C que é a temperatura mais próxima de um interior vegetal onde estão os endofíticos.

Reporta-se que foi realizado um cultivo submerso com a condição do Ensaio Q, utilizando como substrato a fibra de coco verde *in natura*, porém, não foi quantificada atividade enzimática (U/mL) para nenhuma das quatro enzimas estudadas. Esse resultado afirma a importância de um pré-tratamento antecedendo demais processos fermentativos para o *A. lipppiae* URM 7547.

A produção de enzimas por fungos em cultivos submersos é influenciada por fatores como tipo e concentração de substrato (fonte de carbono), de nitrogênio no meio, temperatura e pH. Além disso, o tempo de fermentação para produção de enzimas depende da facilidade

que o fungo tem em degradar o substrato, resíduo lignocelulósico, hidrolisando-os em açúcares fermentescíveis (SALOMÃO, 2017). Por exemplo, Li *et al.* (2003) utilizaram o *Chaetomium thermophilum* CT2, isolado na China, para produção, caracterização e purificação de CMCase em FSm e obtiveram o melhor resultado em 216 horas, 60 °C e pH 4,0; com uma atividade enzimática de 2,77 U/mL em um meio contendo 2% de celulose, 1% de amido e 0,4% de extrato de levedura. Salienta-se tal valor é um pouco mais baixo que o habitualmente encontrado na literatura para CMCase, e pode estar relacionado às concentrações que os autores usaram de fontes de carbono e nitrogênio

As espécies do gênero *Chaetomium/Achaetomium* desempenham uma variedade de funções biológicas e papéis biotecnológicos em áreas como; a médica, taxonomia, estudos moleculares (DARWISH *et al.*, 2020; ABDEL-AZEEM *et al.* 2016) e de biotecnologia, na produção de enzimas termotolerantes por serem fungos que alcançam altas temperaturas de operação (WANMOLEE *et al.*, 2016; KATAPODIS *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2003; RAMESH *et al.*, 1989). Segundo Abdel-Azeem *et al.* (2016), a habilidade do fungo em produzir enzimas extracelulares os torna candidatos ideais para a indústria de catalisadores e farmacêuticas.

Wanmolee *et al.* (2016) estudaram sobre a caracterização bioquímica e sinergismo do sistema enzimático celulolítico do *Chaetomium globosum*. As enzimas foram produzidas através de FSm (30 °C, 200 rpm, pH 5,8) em um meio que utilizou 2% (p/v) de celulose microcristalina (avicel), 1% (p/v) de cachos de frutas de palmeira vazios; 0,1% de lactose e 1% de farelo de soja. Os resultados obtidos de FPase, CMCase, celobiase e xilanase em (U/mL) foram de 0,40, 15,70, 1,50 e 28,20, respectivamente, superiores aos encontrados no presente, porém destaca-se que o meio estava completamente otimizado e favorável ao crescimento enzimático celulolítico.

Florencio *et al.* (2016) estudaram o efeito dos processos de fermentação submersa (FSm) e sobre a produção de enzimas utilizando como substrato o bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (concentração de 1%) e glicose (10 g/L) e obtiveram atividades de xilanase utilizando o *Trichoderma reesei* Rut C30 de 7,9 U.mL<sup>-1</sup>, e usando o fungo *Aspergillus niger* A12, as máximas atividades de xilanase foram de 7,8 U.mL<sup>-1</sup>. Valores para a FSm inferiores ao encontrado, por exemplo, para o ensaio Q (Tabela 9) do presente estudo.

AL-Kharousi (2015) investigou a produção de celulases com o fungo *Chaetomium* sp. em uma FSm (30 °C, 150 rpm, 10<sup>10</sup> esporos/mL) com duração de 10 dias (240 h). O meio utilizado foi um caldo contendo 10 g/L de carboximetilcelulose (CMC) e meio salino comum suplementado com 0,5 g/L de extrato de levedura. Por estar em um meio com CMC comercial,

os resultados obtidos foram altos, chegando a aproximadamente 160 U/mL de CMCase em 144 h de fermentação.

Katapodis *et al.* (2007) utilizaram o *Chaetomium thermophilum* IMI-291753 para produção de xilanase em FSm (50 °C; 200 rpm; pH 5,0) usando-se um meio de cultura simples com ingredientes baratos, a fim de reduzir os custos para a produção das enzimas. O meio utilizado continha 3,0 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,0 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 g/L de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,1 g/L de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0,005 g/L de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,0016 g/L de MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O; 0,0014 g/L de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e 0,0002 g/L de CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, semelhantemente ao escolhido no presente estudo, e variaram as fontes de carbono (espigas de milho, farelo de trigo, palha de trigo e polpa de beterraba) e nitrogênio (extrato de levedura, licor de maceração de milho, fosfato de amônio, sulfato de amônio, nitrato de sódio e nitrato de amônio) em um planejamento experimental a fim de otimizar os resultados. Os melhores resultados obtidos por eles para xilanase foi de 9,6 ± 1,3 U/mL utilizando palha de trigo como fonte de carbono e de 39,1 ± 1,2 U/mL utilizando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio.

Com relação à temperatura, desde que o ensaio Q (33 °C; 10<sup>9</sup> esporos/mL; 30 g/L de substrato) foi realizado com a maior temperatura avaliada, Gomes *et al.* (2007) comentam que uma das mais surpreendentes propriedades dos fungos filamentosos é sua habilidade em adaptar-se a ambientes extremos, nos quais fatores como pH, temperatura, pressão e concentração de sal ultrapassam os valores considerados como padrões para a maioria dos seres vivos. A temperatura influencia a função das biomoléculas e a manutenção das estruturas biológicas. Destacando-se que, embora o *A. lippiae* URM-7547 seja endofítico, o mesmo foi isolado de planta cultivada em ambiente semiárido (VIANNA *et al.*, 2017).

Por fim, conforme os resultados apresentados, a nova espécie fúngica, *A. lippiae* URM 7547 mostra-se como potencial produtor de celulases e, principalmente, de xilanases.

---

**CAPÍTULO VI**  
**CONCLUSÕES**

---

## 6 Conclusões

*Neste capítulo, são relacionadas as principais conclusões obtidas através dos resultados, análises e discussões realizadas durante todo o desenvolvimento desse trabalho.*

O *A. lippiae* URM-7547 apresentou-se com potencial produtor de enzimas hidrolíticas ao testá-lo em meios de cultivo sólidos com substratos indutores para amilase, lipase, protease, pectinase, celulase e xilanase. Seus resultados mostraram-se superiores ( $p < 0,05$ ) aos da cepa *T. reesei* CCT 2768 para protease, celulase, xilanase e pectinase.

O *A. lippiae* URM-7547 ao ser cultivado em três meios nutrientes diferentes (1, 2 e 3) se adaptou bem aos dois últimos. No meio 1 o crescimento e rendimento de conversão de substrato em biomassa celular foi comprometido pelo reduzido valor de pH no meio, que dificulta o crescimento de fungos do gênero *Chaetomium/Achaetomium*. Ressalta-se ainda que, o *A. lippiae* URM 7547 é um fungo fastidioso, sendo necessário uma alta concentração de inóculo para ter uma produção de biomassa vantajosa.

O pré-tratamento com explosão a vapor atuou na fibra de coco verde, principalmente na remoção de 40% da hemicelulose do total da inicial presente, deixando a fibra mais exposta, facilitando o ataque fúngico no cultivo submerso para a produção enzimática.

*A. lippiae* URM 7547 se destacou como um bom produtor de FPase, CMCase, celobiase e xilanase, reportando como melhores resultados os valores obtidos no Ensaio Q, ao qual foram de  $0,41 \pm 0,08$ ,  $5,94 \pm 0,31$ ,  $0,08 \pm 0,04$  e  $9,12 \pm 0,28$  U/mL, para as quatro enzimas respectivamente, semelhantes aos encontrados na literatura para os demais fungos como *Trichoderma* e *Aspergillus*, considerados grandes produtores celulolíticos e xilanolíticos.

*A. lippiae* URM-7547, endofítico, se adequou bem até a máxima temperatura estudada (33 °C), que, coincidentemente, é a temperatura que mais se aproxima ao interior de uma planta.

Ao longo da dissertação notou-se que algumas lacunas sobre *A. lippiae* URM 7547 não tinham sido preenchidas. Por ser endofítico e compreender a uma espécie fúngica que se adapta bem em regiões áridas e semiáridas, e pelo gênero *Chaetomium* estar na literatura com algumas cepas termotolerantes, viu-se a oportunidade e necessidade de mais estudos futuros sobre a temperatura limitante máxima que esta cepa pode suportar, já que a maior temperatura testada na dissertação foi 33°C e não houve perda de atividade nela.

## Conclusões

Por ser um endofítico e ter sido encontrado no interior da planta *Lippia Gracilis*, tem-se também que, seu crescimento é inteiro em condições de oxigênio bem amenas, valendo-se de estudos específicos que aprofundem o teor de aeração que o meio deve conter para o crescimento de *A. lippiae* URM 7547, compreendendo que, talvez, grande quantidade de oxigênio limite seu crescimento.

Por fim, esta dissertação é o início dos estudos sobre a espécie nova fúngica *A. lippiae* URM 7547, ao qual, diferentemente de demais espécies e cepas já consolidadas, não se sabe tantas informações sobre este endofítico, aumentando, nos pesquisadores e cientistas, a ânsia e estímulos por uma bioprospecção mais avançada que possibilite mais respostas e a produção de maiores quantidades de bioativos e metabólitos secundários.

---

**CAPÍTULO VII**  
**REFERÊNCIAS**

---

## Referências

ABDEL-AZEEM, A. M., ZAKI, S. M., KHALIL, W. F., MAKHLOUF, N. A., & FARGHALY, L. M. Anti-rheumatoid activity of secondary metabolites produced by endophytic *Chaetomium globosum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1477, 2016.

ADELOYE, Jumoke Bukola; OSHO, Halimat; IDRIS, Lydia Olayemi. Defatted coconut flour improved the bioactive components, dietary fibre, antioxidant and sensory properties of nixtamalized maize flour. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 2, p. 100042, 2020.

ADRIO, J.L.; DEMAIN, A.L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117-139, 2014.

AL-KHAROUSHI, M.M; SIVAKUMAR, N; ELSHAFIE, A. Characterization of cellulase enzyme produced by *Chaetomium* sp. isolated from books and archives. **EurAsian Journal of BioSciences**, v. 9, 2015.

ALMEIDA, M A; COLOMBO, R. Construction of green roofs via using the substrates made from humus and green coconut fiber or sugarcane bagasse. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 22, p. 100477, 2021.

ALVES, R.C. **Influência da granulometria do bagaço de cana-de-açúcar na solubilização de hemicelulose e produção de açúcares fermentáveis**. Dissertação (Mestrado). universidade Estadual Paulista. 2018. 64f.

ANTONIOLLI, G.T.U. **Potencial catalítico de amilases produzidas por cultivo em estado sólido dos fungos ‘*Monilia sitophila*’ e ‘*Fusarium verticillioides*’**. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral/Bioprospecção) – Faculdade de Ciências Biológicas. Universidade Federal da Grande Dourados. 2018. 30f.

ARAÚJO J.A, FERREIRA A.S.C, ALVEZ Y.F.M, SILVA C.L, FERREIRA N.R, LOPES A.S. **Avaliação do potencial celulolítico de fungos filamentos isolados da fermentação de cacau em Tucumã, Pará**. Trabalho apresentado no 56º Congresso Brasileiro de Química (CBQ). Belém/PA, 2016.

ARAÚJO, N. L., AVELINO, K. V., HALABURA, M. I. W., MARIM, R. A., KASSEM, A. S. S., SANTANA, T. T., DO VALLE, J. S. Produção de biomassa micelial e enzimas lignocelulolíticas de *Pleurotus* spp. em meio de cultivo líquido. **Research, Society and Development**, 10(1), e6810111406-e6810111406. 2021.

ATALLA, S.M.M; EL GAMAL, N.G. Production and characterization of xylanase from pomegranate peel by *Chaetomium globosum* and its application on bean under greenhouse condition. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 44, n. 1, p. 1-11, 2020.

AZEVEDO<sup>1</sup>, G. B., NOVAES, Q. S., AZEVEDO<sup>1</sup>, G. T. D. O. S., SILVA, H. F., SOBRINHO, G. G. R., & DE NOVAES, A. B. “Efeito de *Trichoderma* spp. no crescimento de mudas clonais de *Eucalyptus camaldulensis*”. **Scientia Forestalis**, vol. 45, n° 114, julho de 2017.

BACCHIN, A., da CUNHA, F. M., ZANFIROLAMI, T., & FARINAS, C. **Quantificação indireta do crescimento de *Aspergillus niger* em meio contendo sólidos visando à produção de celulases.** In: Embrapa Instrumentação-Artigo em anais de congresso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA-COBEQ, 18., 2010, Foz do Iguaçu, PR. Anais... Maringá: UEM, p. 8755-8764., 2010.

BARBOSA, K. L., SILVA, J. D. S., DOS SANTOS, T. V., & DOS SANTOS-ROCHA, M. PRÉ-tratamento de explosão a vapor, caracterização química e morfológica do bagaço da cana-de-açúcar usado para produção de Etanol 2G. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 1, 2020.

BCC Research. **Global markets for enzymes in industrial applications.** Disponível em <<https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/global-markets-for-enzymes-in-industrial-applications.html>>. (2018). Acessado em 02 de dezembro de 2021.

BCC RESEARCH – MARKET FORECASTING. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. (2020). Disponível em: <<https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-report-bio030j.html>>. Acesso em: 15 de dezembro de 2021.

BCC Research. **Global markets for enzymes in industrial applications.** Disponível em <<https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/global-markets-for-enzymes-in-industrial-applications.html>>. (2020). Acessado em 15 de dezembro de 2021.

BENEVIDES, M., SOARES, M., ARAUJO, A., VALENÇA, R., & PINHEIRO, A. Potencial da utilização de frutas típicas do semiárido potiguar como fonte de substrato na fermentação alcoólica. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 49-54, 2015.

BEZERRA, P. K. S. B., SILVA, O. L., OLIVEIRA JÚNIOR, S. D., PADILHA, C. E., SANTOS, E. S. Cellulolytic enzymes behavior in delignified green coconut residues and enzymatic hydrolysis with enzyme recovery. **Industrial Crops and Products**, v. 172, 114037. 2021.

BOAS, D. F. V., LUIZ, J. H. H., MALPASS, G. R. P., OKURA, M. H., DE SOUZA, C. P., & GRANATO, A. C. . Microrganismos endofíticos como fonte de compostos de interesse medicinal—uma breve revisão. **Revista Brasileira de Ciência, Tecnologia e Inovação**, v. 5, n. 1, p. 70-86, 2020.

BRITO, A.K.P de. **Caracterização parcial de proteases produzidas por espécies de *Penicillium*.** TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2018. 33f.

CARMO, C.C. **Purificação parcial e caracterização da enzima xilanase produzida pelo fungo amazônico *Pycnoporus sanguineus* I. F.(murr).** Tese (doutorado) – Universidade Federal do Amazonas.2011.73f.

CARVALHO, D. D., ALVES, E., BATISTA, T. R., CAMARGOS, R. B., & LOPES, E. A.. COMPARISON OF METHODOLOGIES FOR CONIDIA PRODUCTION BY *ALTERNARIA ALTERNATA* FROM CITRUS. **BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY**, v. 39, n.

## Referências

4, p. 792-798, 2008.

CARVALHO, T. **Avaliação do efeito de isoforma de lacase produzida por fungos endofíticos na formação de ligações cruzadas em córneas.** Trabalho de produção intelectual – UNIFESP. 2021.59f.

CARVALHO, W., CANILHA, L., FERRAZ, A., MILAGRES, A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 8, 2191-2195, 2009.

CASCIATORI, P.A. **Produção de enzimas celulolíticas pelos fungos *Trichoderma reesei* e *Myceliophthora thermophila* e aplicação na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar.** Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. 2015. 99f.

CAVALCANTE, P. A. W., COÊLHO, D. F., SILVA, C. F., DE SOUZA ABUD, A. K., & SOUZA, R. R. UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS lignocelulósicos na produção de celulasas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. **Scientia Plena**, v. 14, n. 6, 2018.

CERQUEIRA, K. S., DA SILVA RODRIGUES, J. R., DE SOUZA, R. R., & LOBATO, A. K. D. C. L. Mapeamento das tendências de patenteamento de enzimas celulolíticas Mapping of cellulolytic enzyme patenting trends. **Brazilian Journal of Development**, 7(7), 65632-65653. 2021.

CHAPLA, V.M; BIASSETTO, C.R; ARAUJO, A.R. Endophytic Fungi: An Unexplored and Sustainable Source of New and Bioactive Natural Products. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.421-437, 2013.

CINTRA, F. L. D.; FONTES, H. R.; PASSOS, E. E. M. et al. (Ed.). Fundamentos tecnológicos para a revitalização das áreas cultivadas com coqueiro gigante no nordeste do Brasil. Aracaju: **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, 232 p. p. 37-60. 2009.

COELHO, G. D., SOUSA, J. P., DE AZEVEDO LIMA, C., & DA SILVA LINS, S. A.. Potencial de fungos da Caatinga para produção de enzimas amilolíticas. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 7, n. 2, p. 286-297, 2018.

COMPANT, S., CLÉMENT, C., & SESSITSCH, A . The PLANT endosphere world–bacterial life within plants. **Environmental Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 1812-1829, 2021.

CROCHE, S.R.C. **Obtenção de celulose a partir da casca de arroz para aplicação em materiais compósitos.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Pelotas. 2018. 54f.

CUNHA, V. A. B. **Estudo experimental e modelagem do crescimento de fungos filamentosos termorresistentes em sucos tropicais.** Universidade de Santa Catarina, 2003. 134f.

D'ELIA, G.M.A et al. **Prospecção de metabólitos de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. da coleção de fungos da Amazônia (CFAM) para atividade antimicrobiana e produção de proteases.** 2021. 42f.

DABA, G. M., ELKHATEEB, W. A., & THOMAS, P. W. THIS ERA OF BIOTECHNOLOGICAL TOOLS: AN INSIGHT INTO ENDOPHYTIC MYCOBIOTA. **EGYPTIAN PHARMACEUTICAL Journal**, v. 17, n. 3, p. 121, 2018.

DARWISH, Amira MG; ABDEL-AZEEM, Ahmed M. *Chaetomium* enzymes and their applications. In: **Recent Developments on Genus Chaetomium**. Springer, Cham, p. 241-249. 2020.

DENTI, A.F. Tecnologia enzimática: classificação, imobilização, suportes e aplicações. **Revista Perspectiva**, v. 45, n. 171, p. 97-110, 2021.

DUDEK, D.N. **Deleção parcial do fator de transcrição ACE1 para otimização da produção de celulases por *Trichoderma reesei* RUT-C30**. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2017. 56f.

EICHLER, P.; SANTOS, F.; TOLEDO, M.; ZERBIN, P.; SCHMITZ, G.; ALVES, C.; RIES, L.; GOMES, F. Biomethanol Production via Gasification of Lignocellulosic Biomass. **Química Nova**, v. 38, n. 6, p. 828–835, 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Food and Agriculture Data (FAOSTAT), 2020. Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Access on: 6 Sep. 2020.

FATIMA. N.; MUHAMMA, S.A.; KHAN, I.; QAZI, M.A.; SHAHZADH, I.; MUMTAZ, A.; HASHMI, M.A.; KHAN, A.K.; Ismail, T.; *Chaetomium* endophytes a repository of pharmacologically active metabolites. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 136, p 1-6, 2016.

FÉLIX, T. **Fungos endofíticos em espécies agrícolas de importância econômica**. Monografia apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 2019. 54f.

FERNANDES A.P, **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras. 2009. 58f.

FERNANDES, A.I. **Avaliação da atividade antifúngica dos metabólitos secundários dos fungos endofíticos da *Anadenanthera macrocarpa* (Bnth) Brenan**. Trabalho de conclusão de curso – Universidade Federal de Campina Grande. 2019. 58f.

FERREIRA, PF DE O. Pré-tratamento da biomassa do coco usando líquidos iônicos próticos para produção de nanocelulose e posterior aplicação como estabilizante de emulsões. **Embrapa Agroindústria Tropical**-Tese/dissertação, 2021. 91f.

FIGUEIREDO, R et al. Mapeamento Prospectivo das Tecnologias envolvidas na produção de bioetanol. **Cadernos de Prospecção**, v. 11, n. 1, p. 127-127, 2018.

FLORENCIO, C.; CUNHA, F. M. BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. XIMENES, E.; LADISCH, M. R. Secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated

## Referências

by submerged sequential fermentation process: enzyme production for sugarcane bagasse hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 90, p. 53-60, 2016.

FRAGA, M. E., FRANCISCO, M. R., MORA, M. A. E., Chacón-Orozco, J. G., & Harakava, R. Bioprospecção de *Trichoderma spp.* com potencial enzimático. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 37, n. 2, 2021.

FRANÇA, E.S et al. Detecção de esterase e lipase produzidas por fungos filamentosos isolados de solos da Caatinga. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 91693-91709, 2020

FUGANHOLI, N.S. **Análise técnico-econômica para a produção de biofármacos de L-asparaginase**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2020. 98f.

GAETE, A. V., DE SOUZA TEODORO, C. E., & MARTINAZZO, A. P. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de celulase: uma revisão. **Research, Society and Development**, 9(8). 2020.

GERN, R.M.M. **Estudo de Meios de Cultivo para Produção de Biomassa e Polissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 em cultivo submerso**. Tese (doutorado) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina. 2005. 156f.

GERVÁSIO, D.K.L. **Utilização do resíduo do coco verde para a produção de enzimas por fermentação em estado sólido**. Monografia (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Paraíba – João Pessoa, 2017. 57f.

GHOSE T. K. Measurement of cellulose activities (recommendation of commission on biotechnology IUPAC). **Pure Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.

GOES, G.V.C et al. **Análise de alcaloides indólicos antitumorais produzido por *Penicillium chrysogenum* guiada por Espectrometria de massas e Molecular Networking**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Amazonas. 2021. 124f.

GOMES, E. et al. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química nova**, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

GOMES, H.A.R. et al. Influência de diferentes fontes de carbono sobre a produção de celulases por cepas de *Penicillium e Talaromyces*. In: Embrapa Agroenergia-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: **ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA**, Brasília, DF. 2020.

GRACIOLI, M.R. **Purificação e caracterização de uma xilanase halotolerante de *Aspergillus hortai* CRM 1919 e aplicação na hidrólise de subprodutos agroindustriais**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. 2018. 130f.

GUILHERME, A.A.; PINTO, G.A.S.; RODRIGUES, S. Optimization of trace metals concentration on citric acid production by *Aspergillus niger* NRRL 2001. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, p. 246-253, 2008.

GUILHERME, A. A. **Estudo experimental e modelagem do processo de sacarificação e fermentação simultânea utilizando bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol.** Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2014. 268f

HAMIN-NETO, Y.A.A. **Fermentação, purificação, caracterização bioquímica e microencapsulação da protease produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum*.** Dissertação de mestrado - Universidade de São Paulo. 2012. 76f

HANAFAI, F. N. A.; KAMARUDING, N. A.; SHAHARUDDIN, S. Influence of coconut residue dietary fiber on physicochemical, probiotic (*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014) survivability and sensory attributes of probiotic ice cream. **LWT**, v. 154, p. 112725, 2022.

HARDOIM, P. R., VAN OVERBEEK, L. S., BERG, G., PIRTTILÄ, A. M., COMPANT, S., campisano, a. the hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015.

HERRERA, C.R.J. **Engenharia metabólica de *Zymomonas mobilis* para a produção de ácidos orgânicos a partir de xilose.** Tese de Doutorado - Departamento de Biologia, Universidade de Brasília. 2021. 154f.

HUA, C., LI, W., HAN, W., WANG, Q., BI, P., HAN, C., & ZHU, L. Characterization of a novel thermostable GH7 endoglucanase from *Chaetomium thermophilum* capable of xylan hydrolysis. **International journal of biological macromolecules**, v. 117, p. 342-349, 2018.

ISHIZAWA, T.A. **Microrganismos endofíticos e associados de melancia e aplicação biotecnológica.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins. 2017. 111f.

JESUS J.R, MOURA J.C.S, GUERRA O.G, SILVA M.H.R, MACHADO A.M. Potencial enzimático de fungos endofíticos isolados de folhas de *Duptyryx alata*. **Colloquium Vitae**, vol. 10, n. 5, p.158-164, 2018.

KARIMI K; TAHERZADEH M.J. A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: Composition, imaging, and crystallinity. **Bioresource Technology**, v.200,p.1008-1018,2020.

KARP, S. G., WOICIECHOWSKI, A. L., SOCCOL, V. T., & SOCCOL, C. R. Pretreatment Strategies for Delignification of Sugarcane Bagasse: A Review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [S. l.], v. 56, p. 679-689. 2013.

KATAPODIS, P., CHRISTAKOPOULOU, V., KEKOS, D., & CHRISTAKOPOULOS, P.. Optimization of xylanase production by *Chaetomium thermophilum* in wheat straw using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, n. 2, p. 136-141, 2007.

KUSARI, S., HERTWECK, C., & SPITELLER, M. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. **Chemistry & Biology**, v.19, n.7, p.792-798, 2012.

LEDWITCH, K.; OGBURN, R.; COX, J.; GRAHAM, R.; FRITZSCHE, A.; GOSNELL, D.; MANNING, T. Taxol: Efficacy Against Oral Squamous Cell Carcinoma. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 13, n. 4, p. 509–521, 2013.

LEE, H. V.; HAMID, S. B. A.; ZAIN, S. K.. Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: structure and chemical process. **The Scientific World Journal**, [S.L.], v. 2014, p. 1-20, 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/631013>.

LEONEL, T. F. **Estudo de hemicelulases através de RT-qPCR e expressão heteróloga**. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp. 2021. 90f.

LI, D. C., LU, M., LI, Y. L., & LU, J. Purification and characterization of an endocellulase from the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum* CT2. **Enzyme and microbial technology**, v. 33, n. 7, p. 932-937, 2003.

LI, W., JI, P., ZHOU, Q., HUA, C., & HAN, C. . Insights into the synergistic biodegradation of waste papers using a combination of thermostable endoglucanase and cellobiohydrolase from *Chaetomium thermophilum*. **Molecular biotechnology**, v. 60, n. 1, p. 49-54, 2018.

LISBOA, H.C.F. **Fungos endofíticos: prospecção de atividade biocatalítica e aplicação biotecnológica**. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química. 2015. 222f.

LÓCIO, C.J.F. **Avaliação das atividades antibióticas e antiparasitária de metabólitos secundários de fungos endofíticos da *Anadenanthera macrocarpa***. Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido 2019. 48f.

MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent advances in cellulases technology. **J. Ferment Technol.**, v. 54, p. 267-286, 1976

MARCHIORO, M.L.K. **Influência da concentração do substrato e pH inicial sobre a produção microbiana de lasiodiplodana em meio a base de melaço de soja**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2018. 47f.

MARROQUES, J.C. **Aplicação de enzimas na indústria têxtil**. Monografia de graduação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia. 2020. 47f.

MARTINS, C.Z. **Avaliação da produção de etanol de segunda geração**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018. 50f.

MATTOS, A. L. A.; ROSA, M. F.; CRISÓSTOMO, L. A.; BEZERRA, F. C.; CORREIA, D.; VERAS, L. G. C. **Beneficiamento da casca de coco verde**. EMBRAPA, 2021.

MENEZES A.C.M.A, SILVA V.M.A, VASCONCELOS L.R.A, MARTINS S.C.S, MARTINS C.M. Perfil enzimático de cepas de rizóbios isolados do semiárido. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.13 n.24; p. 1263, 2016.

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

MINGOTE, R. G. M. **Produção e caracterização parcial da xilanase produzida por *Aspergillus sp.*** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - UNESP. 2015. 52 f.

MONTEIRO, M. C. P., et al. “Antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants”. **Bioscience Journal**, p. 381–89. 2017. doi:10.14393/BJ-v33n2-34494

MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G. S.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77-93, 2013.

MORAIS, K.O **Avaliação do potencial inseticida e metabólica microbiana de extratos orgânicos de isolados de fungos *Entomopatogênicos metarhizium spp.*** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2019. 55f.

MOURA, I.A.A et al. Biomassa proveniente da casca da banana *Musa sapientum*: pre-tratamento e hidrólise ácida para análise da viabilidade na produção de bioetanol. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 1, p. 1975-1987, 2020.

NAIR, D. N.; PADMAVATHY, S. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. **The Scientific World Journal**, v. 2014.

NAKAEMA, H. **Estratégias de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica para melhorar a produção de biogás e bioquímicos em biorrefinarias.** Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos. 2021. 82f

NASCIMENTO, A. R. B. D.. **Deslignificação do bagaço da casca do coco verde para aplicação em processos biotecnológicos.** Monografia apresentada ao curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos. Universidade Federal de Campina Grande. 2018 60f.

NOGUEIRA, C. C. **Avaliação do uso de tensoativos nos pré-tratamentos ácido e alcalino diluídos da casca do coco verde e quantificação de água na pós-lavagem.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 2017. 97f.

NOGUEIRA, C. C. **Produção de etanol celulósico sob elevadas concentrações de polímeros à base de óxido de etileno.** Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 2021. 302f.

NOGUEIRA, C.C., PADILHA, C.A. SANTOS, E. S. **Boosting second-generation ethanol titers from green coconut fiber by using high-concentration polyethylene glycol.** **Industrial Crops and Products**, 166, 113494. 2021.a.

NOGUEIRA, C.C; PADILHA, C.E.C. and fermentation of green coconut fiber under high concentrations of ethylene oxide-based polymers. **Renewable Energy**, v. 163, p. 1536-1547, 2021.b.

OGEDA, Thais Lucy; PETRI, Denise FS. Biomass enzymatic hydrolysis. **Quimica Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OLIVEIRA JR, S.D. Pectinases produzidas por *Penicillium chrysogenum* através da fermentação em estado sólido utilizando o pedúnculo de caju como substrato. **Congresso brasileiro de Engenharia Química**, São Paulo. 2018a.

OLIVEIRA JR, S.D. **Produção de celulases por *Aspergillus fumigatus* através da fermentação em estado sólido e recuperação e purificação por extração micelar em duas fases aquosas**. 2018b. 144f.

OLIVEIRA, D.C. **Estudo de caso–aproveitamento do resíduo de coco verde no ambiente da grande Vitória, norte e sul do Espírito Santo. Estudo de caso**. UFF. 2016. 11f.

OLIVEIRA, I.S. Estudo bibliográfico sobre o pré-tratamento de explosão a vapor no bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração. **Revista de Trabalhos Acadêmicos da FAM**, v. 6, n. 1, 2021.

OLIVEIRA, J.V.G. Comparação do potencial da enzima lipase frente a catalisadores homogêneos na reação de transesterificação para produção de biodiesel. **Revista Integralização Universitária**, n. 21, p. 158-171, 2019a.

OLIVEIRA, J.P.B; FREITAS, A.L.P. Immobilized enzymes applied in food technology: a technological propection. **Revista INGI-Indicação Geográfica e Inovação**, v. 5, n. 4, p. 1363-1373, 2021.

OLIVEIRA, R. M. **Produção de hidrolases por leveduras isoladas do trato digestório de insetos aquáticos**. Monografia (graduação) - Universidade Federal do tocantins. 2019b. 39f.

OLIVEIRA, T. **Avaliação da produção de enzimas celulolíticas por fungos isolados da região dos Campos Gerais**. Dissertação de Mestrado – Departamento de Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Ponta Grossa/PR, 2020. 70f.

OLIVEIRA, T.I.S. **Biomassa de cascas de banana como fonte de matéria-prima na obtenção de filmes bionanocompósitos com potencial aplicação em embalagens biodegradáveis**. Tese (Doutorado) - Departamento de Pós-Graduação em Química. Fortaleza. 2018c. 173f.

OLIVEIRA, J.A.R. **Extração de polifenóis das folhas do murucizeiro (*byrsonima crassifolia*) por via enzimática**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Pará. 2009. 105f.

OLIVEIRA, J.A.R; DOS SANTOS OLIVEIRA, L; CASSIANO, K.S. Hidrólise enzimática da casca da pupunha para produção de etanol de segunda geração. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 19317-19327, 2020.

OMORI, W.P. **Composição funcional e taxonômica de enzimas carbohidrases que atuam na desconstrução da lignocelulose de torta de filtro**. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP. 2018. 100f.

OSÉS, R.; VALENZUELA, S.; FREER, J.; BAEZA, J.; RODRÍGUEZ, J. Evaluation of fungal endophytes for lignocellulolytic enzyme and wood biodegradation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 57, n. 2, p. 129-135, Mar. 2006.

PADILHA, C. E. D. A., SOUZA, D. F. D. S., NOGUEIRA, C. D. C., OLIVEIRA, J. A. D., & SANTOS, E. S. D. Valorization of green coconut fibre: Use of the black liquor of organosolv pretreatment for ethanol production and the washing water for production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583. **Industrial Crops and Products**, v. 140, p. 111604, 2019.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25-33, 2000.

PAZ-CEDENO, F.R. **Hidrólise enzimática da fração polissacarídica do resíduo oriundo do processamento de carragena de *Kappaphycus alvarezii***. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista. 2017. 126f.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; RUBIA, T, L.; MARTINEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53-63, 2002.

PITARELLO, A. P. **Produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná, 2013. 127f.

PRESTES, I. D., ROCHA, L. O., NUÑEZ, K. V., & SILVA, N. C.. Principais fungos e micotoxinas em grãos de milho e suas consequências. **Scientia Agropecuaria**, v. 10, n. 4, p. 559-570, 2019.

PUTRINO, F. M., TEDESCO, M., BODINI, R. B., & DE OLIVEIRA, A. L.. Study of supercritical carbon dioxide pretreatment processes on green coconut fiber to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose. **Bioresource Technology**, v. 309, p. 123387, 2020.

QUEIROZ, C., & DE SOUSA, A. C. B. Produção de enzimas hidrolíticas por fungos filamentosos em diferentes substratos sólidos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 51849-51860, 2020.

RABELO, S.C; DA CRUZ PRADELLA, J.G; IENCZAK, J.L. Produção de etanol de segunda geração. **Biociencia Industrial-Vol. 3: Processos fermentados e enzimáticos**, v. 3, p. 107, 2019.

RAMADAN, B. M. M. L., FISCHER, J., FILHO, U. C., & LUIZ, V. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* coletado no cerrado brasileiro. **XIX Jornada em Engenharia Química**. 2014.

RAMESH, M. V.; LONSANE, B. K. End product profiles of starch hydrolysis by bacterial alpha-amylases at different temperature and pH values. **Biotechnology letters**, v. 11, n. 9, p. 649-652, 1989.

REGINATTO, C., NORONHA, F. P., ROSSI, C., CARRA, S., MENEGHEL, L., SILVEIRA, M., & MALVESSI, E. Efeito do inóculo na obtenção de pectinases por *Aspergillus fumigatus*. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 1043-1050, 2015.

RIBEIRO V.T; COSTA W.A; CAMPOLINA, A.C; SANTOS, E.S. Ethanol from green coconut fiber using alkaline combined steam explosion pretreatment. *Otimización de los procesos de extracción de biomasa sólida para uso energético - Cuadernos de la RED IBEROMASA*. v. 1497. p.267-283. 2019.

Ribeiro, M. B. M. **Bioadsorção dos inibidores gerados no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica em biorrefinarias**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Triângulo Mineiro. 2020, 94f

RIGO, D., GAYESKI, L., TRES, G. A., CAMERA, F. D., ZENI, J., VALDUGA, E., ... & BACKES, G. T. Produção microbiológica de enzimas: uma revisão. **Brazilian Journal of Development**, 7(1), 9232-9254. 2021.

RODRIGUES, C. P.; CAMARGO, J. A. **Bagaço de cana-de-açúcar como potencial para cogeração de energia elétrica e etanol celulósico**. São Joaquim da Barra: Iara Coimbra. 2008. 25f.

RODRIGUES, T.M.C. et al. **Produção de Etanol de segunda geração a partir do resíduo Industrial de palmito pupunha**. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Engenharia de Alimentos - PUC Goiás. 2020. 42f

RODRIGUEZ, K; STCHIGEL, A.M.; CANO, J.F; GUARRO.J. A new species *Achaetomium* from Indian Soil. **Studies in Mycology**, n. 50, p. 77-82, 2004.

ROSA, I.Z. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de celulases, xilanases e celobiose desidrogenase com potencial para sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista. 2014. 77f.

ROSATELLA, Andreia A.; AFONSO, Carlos A. M.. CHAPTER 2. The Dissolution of Biomass in Ionic Liquids Towards Pre-Treatment Approach. **Green Chemistry Series**, [s.l.], p.38-64, set. 2015. Royal Society of Chemistry. <http://dx.doi.org/10.1039/9781782622598-00038>.

SAIKKONEN, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S. H. Evolution of endophyte-plant symbioses. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 6, p. 275-280, June 2004.

SALAZAR, L. N.; DAL MASO, S. S.; OGIMBOSVSKI, T. A.; DARONCH, N. A.; ZENI, J.; VALDUGA, E.; BACKES, G. T.; CANSIAN, R. L. Production, Partial Characterization and Application of Cellulases by Newly Isolated *Penicillium* sp. Using Agro-Industrial Substrate Solid-State Fermentation. **Industrial Biotechnology**, v.15, n. 2, p. 79-88, DOI: 10.1089/ind.2018.0029. 2019.

SALOMÃO, G. S. B. **Análise da produção de celulases por fungos utilizando bagaço de cana como substrato**. Dissertação (Mestrado em Energia) – Centro Universitário Norte do Espírito Santo 2017. 82f.

SANTOS E.M.S, MORAIS A.A, LIRA I.R.S, GUIMARAES D, LUNA J.M. Avaliação do potencial biotecnológico de microrganismos isolados de amostras alimentares e produção de enzimas hidrolíticas. **Trabalho apresentado no III Congresso Brasileiro e Ciências da Saúde (CONBRACIS)**. Campina Grande/PB, 2018.a.

SANTOS, F.A et al. **Produção de celulases por *Penicillium sp.* FSDE15 e hidrólise enzimática do sabugo de milho**. Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT. João Pessoa, 2021. 87f.

SANTOS, P. S. D., SOLIDADE, L. S., SOUZA, J. G. B., SAMPAIO, G., BRAGA Jr, A. C. R., ASSIS, F. G. D. V. D., & LEAL, P. L. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences** – JCEC, Vol. 04 N. 02 (2018.b).

SANTOS, R. S. et al. Seleção de fungos filamentosos para produção de hidrolases lignocelulolíticas por fermentação submersa com uso de resíduos da agroindústria de óleos vegetais como fonte de carbono. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 1551-1558, 2015.

SCHMIDELL NETTO, W; LIMA, U.A; AQUARONE, E. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica** v. 2, 94-114p. 2001.

SCHNEIDER, W. D. H.; GONÇALVES, T. A.; UCHIMAB, C. A.; DOS REIS, L.; Fontana, R. C.; SQUINAC, F. M.; DILLONA, A. J. P.; CAMASSOLAA, M. Comparison of the production of enzymes to cell wall hydrolysis using different carbon sources by *Penicillium echinulatum* strains and its hydrolysis potential for lignocelulosic biomass. **Process Biochemistry**, v. 66, p. 162–170.2018.

SHARMA, H. K.; XU, C.; QIN, W. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuels and Bioproducts: An Overview. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 2, p. 235–251, 2019.

SILVA, D.R.M da. **Valorização de subprodutos da indústria do arroz no desenvolvimento de bebidas de origem vegetal como alternativas ao leite convencional**. Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Coimbra. 2018. 62f.

SILVA, E.T da. **Estabilização de proteases para aplicação tecnológica**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2013. 70 f.

SILVA, F.S.G; GOMES, W.P.C; NASCIMENTO, D.D. do. Avaliação da fermentação de leveduras visando produção de etanol de segunda geração. **Bioenergia em Revista: Diálogos (ISSN: 2236-9171)**, v. 9, n. 2, 2019.

SILVA, L.R.I da. **Produção de celulase por fermentação e estado sólido empregando resíduo de coco verde (Mesocarpo) sob a ação de um fungo isolado na fase termofílica de um processo de compostagem.** Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia. Sumé - PB, 2016. 61f

SILVA, M.D. **Aproveitamento de resíduos agroindustriais como substratos para produção de enzimas.** Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade de Uberlândia. 2020. 34f.

SILVA, S.I.S. **Aproveitamento da biomassa de coco verde para produção de biocombustíveis sustentáveis.** Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Paraíba. 2019a. 74f.

SILVA, R.A. **Comparação de alternativas de pré-tratamentos em biomassa lignocelulósica.** Trabalho de conclusão de curso (Monografia)-Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2019b. 38f

SILVA, R.S.M da. **Avaliação do potencial do uso da hemicelulose como matéria prima para a indústria de materiais.** Trabalho de Conclusão de curso. Universidade Federal de São Paulo campus São José dos Campos. 2019c. 37f.

SIMÕES, A.L.C.. **Produção de amilases por cultivo em estado sólido e hidrólise enzimática de resíduos de mandioca.** Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT. João Pessoa, 2021. 73f.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., AND TEMPLETON, D. “Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass,” **Technical Report NREL/TP-510-42618. National Renewable Energy Laboratory**, Golden, Colorado, 2008a.

SLUITER, A., HAMES, B., HYDMAN, D.; PAYNE, C.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.;SLUITER, J.;TEMPLETON, D.; WOLFE, J. “Determination of Total solids in Biomass and total solids in liquid process sample,” **Technical Report NREL/TP-510-42621. National Renewable Energy Laboratory**, Golden, Colorado, 2008b.

SLUITER, A., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., AND TEMPLETON, D. “Determination of extractives in biomass,” **Technical Report NREL/TP-510-42619. National Renewable Energy Laboratory**, Golden, Colorado, 2005a.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., AND TEMPLETON, D. “Determination of ash in biomass,” **Technical Report NREL/TP-510-42622. National Renewable Energy Laboratory**, Golden, Colorado 2005b.

SOARES, A. K., MAGALHÃES, W. L. E., ZANATTA, P., & GATTO, D. Capacidade antifúngica de suspensões estáveis de lignina e timol contra o fungo *Ganoderma applanatum*. In *Embrapa Florestas-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: **CONGRESSO INTERNACIONAL DE BIOMASSA**, 4., 2019, Pinhais. Anais. Curitiba: Grupo FRG, 2019. p. 718-723. 2019.

SOBRINHO, Dávila Caroline Guedes. **Análise qualitativa das enzimas quitinase, lipase e protease associadas a fungos entomopatogênicos.** Monografia apresentada a Universidade do Estado da Bahia. 2020. 27f.

SOUZA, R. B. A. **Estudo do pré-tratamento hidrotérmico e hidrólise enzimática da palha de cana de açúcar**. Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2016. 124 f.

SOUZA, R. A. D. **Fungos endofíticos em folhas de cafeeiro: diversidade e potencial entomopatogênico sobre a broca do café**. Dissertação (mestrado) – Instituto biológico de aência paulista de tecnologia dos agronegócios. 2019. 85f.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreanae*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. **Science, Washington**, v. 260, n. 5105, p. 214–216, 1993.

SUN JY, KEPLINGER C, WHITESIDES GM, SUO Z. Ionic skin. **Adv Mater** 26:7608–7614. 2014.

TAVARES, A. S. **Os desafios da produção de etanol no Brasil**. Monografia (graduação) - Universidade Federal de Uberlândia. 2019. 45f.

TEIXEIRA G.M, SANTANA L.S.F, ALVES Y.A, CAMPOS L.M.A. Análise da eficiência do pré-tratamento por explosão a vapor da fibra do mesocarpo do coco. **XVII SEPA - Seminário Estudantil de Produção Acadêmica**, UNIFACS, 2018.

TELES, A. M., EVERTON, G. O., MOUCHREK, A. N., TELLIS, C. J. M., DE BARROS BEZERRA, G. F., DE SOUZA, F. A., ... & NASCIMENTO, M. D. D. S. B. Fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato obtido do fungo *Penicillium purpurogenum* advindo de ambiente marinho poluído do Maranhão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e576986205-e576986205, 2020.

TORRE, C.L.D. **Purificação da xilanase de *Thermomyces lanuginosus* e suas propriedades estruturais e catalíticas**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2017. 65f.

TORRES, F. L., BOGAS, A. C., DE ANDRADE, P. H. M., DE SOUSA, C. P., & LACAVA, P. T.. Bioprospecção e potencial biotecnológico de fungos endofíticos associados a plantas do cerrado. **Concilium**, v. 19, n. 1, 2019.

VAZ M.R.F, **Estudo de cultivo de dois clones de *Escherichia coli* recombinantes (eIF, LACK) para expressão de antígenos de *Leishmania chagasi***. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2008. 66f.

VIANA M.G, **Isolamento de microrganismos endofíticos de *Lippia gracilis* Schauer (*Verbenaceae*), avaliação do óleo essencial da planta e dos metabólitos dos endofíticos sobre a corrosão microbiologicamente induzida (CMI) em aço carbono AISI 1020**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2017. 217f.

VIANA M.G; ALBUQ, C.C; SANTOS, E.S; BEZERRA, J.D.P; PAIVA L.M. *Achaetomium lippiae*. **Fungal Planet** description sheets: 625-715. **PERSOONIA**, v. 39, p. 282-283, 2017.

## Referências

WANG, X. W., HOUBRAKEN, J., GROENEWALD, J. Z., MEIJER, M., ANDERSEN, B., NIELSEN, K. F., ... & SAMSON, R. A. Diversity and taxonomy of *Chaetomium* and *chaetomium*-like fungi from indoor environments. **Studies in mycology**, v. 84, p. 145-224, 2016.

WANMOLEE, W., SORNLAKE, W., RATTANAPHAN, N., SUWANNARANGSEE, S., LAOSIRIPOJANA, N., & CHAMPREDA, V. Biochemical characterization and synergism of cellulolytic enzyme system from *Chaetomium globosum* on rice straw saccharification. **BMC biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 1-12, 2016.

YANG, X.; ZHANG, J.; LUO, D. The taxonomy, biology and chemistry of the fungal *Pestalotiopsis* genus. **Natural Products Reports**, v. 29, n. 6, p. 622-641, 2012.

YU, Jing et al. High-level expression and enzymatic properties of a novel thermostable xylanase with high arabinoxylan degradation ability from *Chaetomium* sp. suitable for beer mashing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 168, p. 223-232, 2021.

ZANCHETTA, A. **Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido e submersa utilizando biomassa lignocelulósica**. Dissertação de mestrado - Universidade Estadual Paulista. 2012. 100f.

ZHAO, J.; SHAN, T.; MOU, Y.; ZHOU, L. Plant-Derived Bioactive Compounds Produced by Endophytic Fungi. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 11, n. 2, p. 159–168, 2011.